



THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par *Institut National Polytechnique de Toulouse*

Discipline ou spécialité : *Ecotoxicologie*

Présentée et soutenue par *Pourrut Bertrand*

Le *04 juillet 2008*

Titre : *Implication du stress oxydatif dans la toxicité du plomb sur une plante modèle, Vicia faba*

JURY

M. Jean-Philippe Biolley, Professeur à l'Université de Poitiers, Président

Melle Paule Vasseur, Professeur à l'Université de Metz, Rapporteur

M. Jean-Luc Montillet, Directeur de recherche au CEA de Cadaraches, Rapporteur

M. Laury Gauthier, Maître de Conférence à l'Université Paul Sabatier, Membre

M. Jérôme Silvestre, Ingénieur d'étude à l'ENSAT, Membre

M. Eric Pinelli, Professeur à l'ENSAT, Membre

Ecole doctorale : *Sciences Ecologiques Vétérinaires Agronomiques et Bioingénieries*

Unité de recherche : *EcoLab, UMR 5245*

Directeur(s) de Thèse : *Eric Pinelli*

Rapporteurs : *Paule Vasseur et Jean-Luc Montillet*

*A mes parents,
A Gaëlle.*

*«Des millions de gens ont vu tomber une pomme,
Newton est le seul qui se soit demandé pourquoi.»*

Bernard Baruch

Remerciements

Faire les remerciements... Ce devrait être la partie la plus facile à écrire après avoir rédigé un pavé tel que la thèse. Pourtant, il y a tant de personnes à remercier, qui ont participé de près ou de loin à ce travail. Il faut à la fois n'oublier personne et trouver les mots justes. Je vais essayer de faire de mon mieux.

Tout d'abord, je tiens à remercier Paule Vasseur, Professeur à l'Université de Metz, et Jean-Luc Montillet, Directeur de Recherche du CEA, pour avoir évalué ce travail en tant que rapporteur, et ce malgré des délais plus que courts. Je voudrais également remercier les autres membres du jury, Laury Gauthier et Jérôme Silvestre, respectivement Maître de Conférence à l'Université Paul Sabatier et Ingénieur d'Etude à l'ENSAT. Evidemment, un remerciement spécial à Jean-Philippe Biolley, Professeur de l'Université de Poitiers, pour avoir présidé ce jury. Vous avez ainsi bouclé la boucle, vous qui par vos cours à l'UPPA et le stage que j'ai effectué sous votre direction, m'avez orienté (moi, pauvre étudiant tout juste sorti de la puberté) vers le domaine de la recherche et de l'écotoxicologie, et ce, malgré vos constantes remarques xénophobes sur mes ascendances basques ! Je n'oublie pas non plus Louis Leitao, qui par sa disponibilité et sa motivation m'a vraiment donné le goût pour la recherche.

Pour finir, le dernier membre du jury et également mon encadrant de thèse : le professeur Eric Pinelli. Six ans de vie commune (en comptant le DEA et l'année « sabbatique ») et on ne s'est pas trop tapé dessus ! Il y eu quelques joutes verbales, sur le plan scientifique j'entends, qui au final nous ont fait pas mal avancer sur ce projet. Merci pour m'avoir laissé énormément d'autonomie et pour m'avoir fait confiance quant à l'avancée des recherches malgré des phases de présence en pointillé au labo. Merci également pour avoir partagé avec moi des relations allant au-delà de celles de directeur de thèse/doctorant. J'ai en mémoire toutes les musiques approximatives que tu m'as fait écouter, les fous rires avec des vieux sketches (On va tous... !), et toutes les affiches qui ont fleuri dans le labo au cours de ces quatre années, et qui n'auraient pas eu leur place dans la plupart des labos de recherche ! Merci enfin pour m'avoir permis de garder la forme pendant tout ce temps, du fait d'avoir traversé 459876 fois le laboratoire à ta recherche alors qu'on avait rendez-vous !

Je tiens également à exprimer toute mon amitié et ma gratitude aux personnes qui m'ont permis de financer cette thèse. Par ordre chronologique : Charles-Henry Lavielle du CFA d'Anzeville, merci pour toutes nos discussions et pour ta vision du monde (« voir le monde avec des yeux d'enfants ») ; Camille Dumat de l'ENSAT pour le projet BAPPET, sans toi, je n'en serais pas là maintenant ; Othmane Merah de l'IUT d'Auch (et Jane Roche-Eyheraguibel pour avoir pensé à moi et m'avoir laissé ta place), merci pour les vacances, une vrai bouffée d'air frais au cours de la thèse malgré tes sarcasmes permanents (merci au passage à tous les gens de l'IUT d'Auch pour votre accueil lors de mes passages, et spécialement à Monique Ras et Isabelle Ribéra, la super technicienne de luxe !) ; Maritxu Guiresse pour le poste d'ATER à l'ENSAT, merci pour ta bonne humeur, cela vraiment été un plaisir de bosser avec toi !

Remerciements

Je vais maintenant remercier toutes les personnes ayant participé à la thèse de près ou de loin. Eric, c'est fait. Un énorme merci à Jérôme Silvestre, le Mc Gyver du labo, avec qui j'ai passé des heures à refaire le monde de la physiologie végétale. Merci pour tous les conseils avisés, les astuces et bidouillages en tout genre, pour votre énorme disponibilité et pour vos blagues en toute circonstance !

Merci à tous les stagiaires que j'ai martyrisés durant ces années et sans qui je n'aurais pas pu avancer autant sur ce vaste sujet : Elodie, Williboy, Seb, Laure, Alessandro et Marion. Merci également à Sylvie Cotelle de m'avoir accueilli au laboratoire LIEBE de Metz pour mes dosages de phytochélatines, ainsi qu'à Eric Béraud pour m'avoir consacré autant de temps durant et après mon séjour ! Merci également à Séverine Jean et Florence Mouchet, pour tous vos conseils et toutes nos discussions.

I would also thank Amaia Azqueta and Sabine Langie for your collaboration and assistance throughout this past year to develop the Comet assay on Vicia faba.

Un ENORME merci pour Annick Corrège (également appelée Jannique Corégèsse). Que serait le labo sans toi ? Une seconde maman pour tous les thésards et stagiaires du labo, toujours prête à rendre service, n'hésitant même pas à interrompre ses interminables pauses-café... ;-).

Boris Eyberaguibel, merci pour tout. Je te dois beaucoup, tu n'as pas été avare en temps avec moi avant, pendant et maintenant, après ma thèse. Merci pour ta disponibilité, ton esprit scientifique critique et le temps passé à corriger mes articles. Merci pour toutes nos discussions musicales, cinématographiques, scientifiques, philosophiques, métaphysiques, rugbystiques, footballistiques, concert-iques, et beaucoup d'autres en -ique !

Un grand merci à tous ceux qui m'ont donné un coup de main dans la dernière ligne droite, au cours de la rédaction et ce, malgré des emplois du temps déjà bien occupés. Merci à Nico, Karen et Boris pour l'anglais, Tim pour les mises en forme de dernière minute, Gaëlle, Jès, Annick et ma môman pour les relectures du pavé de thèse.

Enfin un grand grand merci à mon frère Jérôme pour ton assistance informatique 24/24h 7/7j, pour tous les moments passés à réparer tout le Pétanos que j'avais pu mettre !

Un remerciement spécial également pour Anne Probst pour m'avoir chaperonné durant mon premier congrès international, en Suisse. Merci pour tous tes conseils et ton soutien, cela m'a permis d'aborder ma présentation orale avec une certaine sérénité (toute relative !)...

Je veux également remercier toutes les personnes du labo pour m'avoir supporté au cours de ces années, et en particulier ceux qui ont dû le faire dans un espace de 8 m² : Aurore, CEM par intermittence, Marie, Tim, Tom et spécialement toi, Geff, mon partenaire de crime dans le déversement intempestif de plusieurs dizaines de kilos de confettis et autres chips dans des bureaux, voitures et appartements ; les soirées qui nous ont, à tous, portés préjudice à la suite de nos soutenances respectives ; les envois de mail sur la liste ENSAT (évidemment pas depuis son propre ordi) ; les chansons chantées en canon (la Californie !) ; l'utilisation douteuse de la Carboglace ; et j'en passe. Désolé les filles de vous avoir fait subir tout ça ! Et puis que dire de ce cri si particulier, impossible à

Remerciements

transcrire, et qui permet une communication inter-doctorants d'un bout à l'autre de l'ENSAT... Tim merci pour toutes les couffes que tu as faites ! Sans toi, cette dernière année de thèse aurait moins drôle. Merci également à toi et Tom pour m'avoir flambé mon ordi à 4 jours de remettre le manuscrit, en essayant de le pirater.

Merci à toute l'équipe du BFCC (Baby-Football Club de Castanet), vous n'avez pas fait avancer ma thèse dans la dernière ligne droite ! Mais grâce à vous j'ai compris que ce jeu n'était pas fait pour moi.

Une pensée à toutes les thésardes et doctresses « d'en face » : Anne, Agnès, Delphine, Muriel, Anne-Claire et Gwen. Maintenant place aux plus jeunes, et comme l'avait fait Boris avant moi, je passe la balle à Anne-Claire, Arshad, Guzu et Laure (les fofolles du 1^{er}), Gwen, Lobat, Matthieu, Momo, Thierry (Ti'Tim), Shahid, Sylvain, Tom et... Bala !

Je voudrais maintenant remercier les personnes qui n'ont pas participé à cette thèse mais sans qui ces quatre années auraient été très très longues. Tout d'abord, un remerciement à tous les membres de l'association sINPThèse présents (Caroline, Matthieu, Philippe, Pierre et Pauline) et anciens qui m'ont démontré qu'il n'existe (-ait, non maintenant ?) pas que des doctorants ne s'intéressant qu'à eux et leurs manips. Merci pour toutes ces soirées apéro-repas-travail qui ont légèrement dérivé vers les deux premiers termes sur la fin.

Pour qu'une thèse se déroule bien, il faut savoir décompresser. D'aucuns diront que de ce côté-là, je n'ai pas eu de problème. Autant faut-il être (bien ?) accompagné. Merci donc aux pintades Marie et Marion, à ceux qui les supportent Gilles et Jès, CC et CC, Passpat et surtout à tous les béarnais, en particulier les membres de la Peña Charles Bronson et des Pédocs on Tour 2006/2008 : Bonbon, Cass, Crampon, Gaymuso, Gilou, Goffer (merci Richard Anthony), Hélène, Karen, Max, Pette, Peypey, Sanka, et Tortue, et tous les autres... Vous avez assuré pour la soirée de la soutenance ! Un clin d'œil spécial à la cantoch « Chez Pats et Caro » qui m'a permis d'économiser pas mal de repas (maouhhhhh), bien que la qualité se soit dégradée avant sa délocalisation sur Pau.

Evidemment, un remerciement spécial à Seb et Nico pour les deux voyages touristique-houbloniques en Europe et dans la perfide Albion, pour les soirées « intéressantes » à refaire le monde (ou à savoir qui a tué Cannelle !). Seb, après deux ans de coloc, je crois qu'on peut tirer le bilan et affirmer que tu n'as pas fait avancer ma thèse. Par contre, maintenant, j'assure à la Play et Fouque est le meilleur attaquant d'Europe, que dis-je, du monde ! Merci à ton mental impressionnant grâce à qui, d'un simple « Allez ! », j'ai pu t'entraîner dans des plans plus foireux le uns que les autres. Cette caractéristique, tu la partages avec Doyen, qui est toujours prêt à traverser la France entière A/R, juste pour une bouffe ou une bringue. Merci à toi (ou pas !) le Bigourdan pour nous avoir pris sous ton aile lors de la 1^{ère} année de DEUG et ce, malgré ton grand âge. Depuis, on ne se quitte plus et on se demande bien pourquoi !

Remerciements

Maintenant, les remerciements les plus importants. Je voudrais remercier ma famille et en particulier mes parents M & M'S pour m'avoir toujours soutenu et de m'avoir porté jusque là.

Pour finir, un énorme merci à Gaëlle pour m'avoir soutenu, engueulé, corrigé, motivé et avoir fait la « Tony Danza » dans la dernière ligne droite.

P.S. : Un remerciement spécial à l'école doctorale SEVAB. Merci de ne pas m'avoir accordé une bourse ministérielle, mon sujet n'étant pas suffisamment intéressant et plutôt démodé. Vous avez vu juste, seulement quatre publications issues de cette thèse... Alors pourquoi vous remercier ? Tout d'abord, parce qu'ayant un caractère têtu (hérité de mon ascendance basco-béarnaise), ce refus m'a donné un surplus de motivation pour mener à bien cette thèse. Ensuite, parce qu'ayant été obligé de travailler pendant ma thèse, j'ai rencontré des personnes très intéressantes. J'ai notamment participé à un programme scientifique qui m'a permis d'obtenir, seulement deux mois après la fin de la thèse, un poste d'enseignant-chercheur. Merci SEVAB !

Table des matières

<i>Table des matières</i>	<i>1</i>
<i>Liste des figures</i>	<i>1</i>
<i>Liste des tableaux</i>	<i>3</i>
<i>Liste des abréviations</i>	<i>4</i>
<i>Introduction générale</i>	<i>9</i>
<i>Chapitre I : Revue bibliographique</i>	<i>15</i>
<i>A. Le stress oxydatif chez les plantes</i>	<i>16</i>
1 Le statut redox cellulaire	16
1.1 Les Espèces Réactives de l'Oxygène	16
1.1.1 ERO ou radicaux libres ?.....	16
1.1.2 Les différents types d'ERO	18
1.1.2.1 Les ERO primaires	18
1.1.2.2 Les ERO secondaires.....	20
1.2 Potentiel redox intracellulaire	21
2 Les prooxydants	23
2.1 Production d'ERO lors des principaux processus métaboliques	23
2.1.1 Les chloroplastes et l'appareil photosynthétique.....	23
2.1.2 Les mitochondries et la chaîne respiratoire	25
2.1.3 Les peroxysomes	27
2.1.3.1 La β -oxydation	27
2.1.3.2 La photorespiration	28
2.1.3.3 La chaîne de transport des électrons peroxysomale	29
2.2 Les principales sources enzymatiques.....	30
2.2.1 Les NADPH-oxydases	30
2.2.2 Les peroxydases extracellulaires	33
2.2.3 Les oxalate-oxydases.....	35
2.2.4 Les amine-oxydases	36
2.2.5 Les oxydases peroxysomales.....	37

3	Les mécanismes antioxydants.....	39
3.1	Les oxydases alternatives (AOX).....	39
3.2	Les antioxydants.....	39
3.2.1	Définition	39
3.2.2	Les principaux systèmes non enzymatiques	39
3.2.2.1	L'ascorbate ou vitamine C	39
3.2.2.2	Le glutathion	40
3.2.2.3	La vitamine E	42
3.2.2.4	Les caroténoïdes	43
3.2.3	Les principales enzymes antioxydantes.....	43
3.2.3.1	Les superoxyde dismutases (SOD).....	44
3.2.3.2	Les catalases (CAT)	45
3.2.3.3	Les enzymes du cycle Asada-Halliwell-Foyer	46
3.2.3.4	Les peroxydases (POX).....	47
3.2.3.5	Les peroxyredoxines	48
4	Les ERO : Dr Jekyll et Mr Hyde cellulaires ?	49
4.1	Importance physiologique des ERO et signalisation oxydative	49
4.1.1	Rôles physiologiques.....	49
4.1.2	Signalisation oxydative	50
4.2	Le stress oxydatif	51
4.2.1	Définition	51
4.2.2	Conséquences	52
4.2.2.1	Altérations de la structure des protéines.....	52
4.2.2.2	Altération de la structure des lipides	53
4.2.2.3	Altérations de la structure des acides nucléiques	56
	<i>B. Le plomb et les plantes.....</i>	58
1	Problématique du plomb dans l'environnement	58
1.1	Propriétés physico-chimiques du plomb	58
1.2	Le plomb dans l'environnement.....	58
1.2.1	Histoire de l'utilisation du plomb.....	58
1.2.2	Cycle biogéochimique.....	60
1.3	Phytodisponibilité du plomb	61
1.3.1	Notion de phytodisponibilité	62
1.3.2	Distribution du plomb au niveau du sol	62
1.3.3	Facteurs influençant la phytodisponibilité du plomb.....	64
2	Impact du plomb sur les végétaux.....	66
2.1	Absorption du plomb par la plante	66

Table des matières

2.1.1	Cas de l'absorption foliaire	66
2.1.2	Mécanismes d'adsorption sur les racines	66
2.1.3	Mécanismes d'absorption racinaire	67
2.2	Le plomb dans la racine et sa translocation vers les parties aériennes	68
2.2.1	Diffusion radiale dans la racine	69
2.2.1.1	Voie apoplastique	69
2.2.1.2	Voie symplastique	71
2.2.2	Mécanismes de détoxification	72
2.2.2.1	Mécanismes constitutifs	72
2.2.2.2	Mécanismes inductibles	73
2.2.3	Translocation vers les parties aériennes	76
2.3	Effets généraux du plomb sur les plantes	78
2.3.1	Effets sur la germination et la croissance	79
2.3.2	Effets sur les constituants cellulaires	80
2.3.2.1	Effets sur les enveloppes cellulaires	80
2.3.2.2	Effets sur les protéines	81
2.3.2.3	Action antimitotique et génotoxique du plomb	85
2.3.3	Statut hydrique	87
2.3.4	Nutrition minérale	88
2.3.5	Photosynthèse	90
2.3.6	Respiration	92
2.4	Plomb et stress oxydatif	93

***Synthèse et objectifs de l'étude*** 97

***Chapitre II : Matériel et Méthodes*** 103

1	Choix de l'espèce végétale	104
2	Condition de culture et échantillonnage	104
3	Principes d'étude de l'impact du plomb sur la fève	105
3.1	Minéralisation des végétaux et dosages du plomb	105
3.2	Evaluation de la peroxydation lipidique	106
3.3	Extraction et dosage des pigments foliaires	107
3.4	Extraction, dosage des protéines et activités enzymatiques	108
3.5	Evaluation des phytochélatines et du glutathion	108
3.5.1	Extraction des thiols et dérivation	108
3.5.2	Analyse HPLC des groupements thiols dérivés	110
3.6	Evaluation de la production d'ERO par chimioluminescence	111
3.7	Détection histochimique des ERO	111

Table des matières

3.8	Test des micronoyaux.....	112
3.8.1	Principe	112
3.8.2	Analyse des résultats	113
3.9	Comet assay	114
3.9.1	Principe	114
3.9.2	Précisions techniques	115
3.9.3	Analyse des résultats	116
 <i>Chapitre III : Impact du plomb sur la fève</i>		<i>119</i>
<i>Synthèse de phytochélatines et défenses antioxydantes chez Vicia faba en réponse à une exposition de courte durée au plomb</i>		<i>121</i>
Abstract		124
1	Introduction	125
2	Materials and methods.....	126
3	Results and discussion.....	128
4	Conclusions	138
 <i>Chapitre IV : Mécanismes oxydatifs impliqués dans la toxicité du plomb</i>		<i>147</i>
<i>A. Rôle potentiel joué par la NADPH-oxydase dans les premières étapes de flambée oxydative induite par le plomb dans les racines de Vicia faba</i>		<i>149</i>
Abstract		151
1	Introduction	152
2	Material and methods	153
3	Results.....	156
4	Discussion	163
5	Conclusion.....	166
 <i>B. Induction du stress oxydatif dans les racines de Vicia faba au cours d'une exposition de courte durée au plomb : implication de la NADPH-oxydase</i>		<i>171</i>
Abstract		173
1	Introduction	174

Table des matières

2	Materials and methods.....	175
3	Results.....	180
4	Discussion	186
<i>Chapitre V : Impact génotoxique du plomb.....</i>		<i>197</i>
<i>Dommages sur l'ADN induits par le plomb : implication des espèces réactives de l'oxygène</i> <i>199</i>		
Abstract		201
1	Introduction	202
2	Materials and Methods	203
3	Result and Discussion.....	207
4	Conclusion.....	213
<i>Chapitre VI : Discussion Perspectives.....</i>		<i>219</i>
1	Absorption du plomb et translocation vers les parties aériennes.....	220
2	Effets du plomb sur <i>Vicia faba</i> : implication des ERO.....	222
2.1	Toxicité dans le système racinaire.....	222
2.2	Toxicité dans les parties aériennes	225
3	Rôle de la NADPH-oxydase dans la toxicité du plomb	227
3.1	Induction de la NOX	227
3.2	Implication de la NOX dans la toxicité du plomb	230
4	Rôle du glutathion dans la défense de la plante	232
5	Conclusion et perspectives	234
<i>Références bibliographiques</i>		<i>239</i>
<i>Annexes</i>		<i>281</i>

Liste des figures

<i>Figure 1 : Version simplifiée de la structure électronique de la molécule de dioxygène et de quelques dérivés.</i>	17
<i>Figure 2 : Schématisation de la transformation énergétique ou chimique (réductions successives) de la molécule de dioxygène dans un système biologique.</i>	18
<i>Figure 3 : Réaction d'Haber-Weiss conduisant à la formation du radical hydroxyle.</i>	19
<i>Figure 4 : Production d'oxygènes singulets au niveau du PSII et d'anions superoxydes au niveau des PSI et PSII des thylakoïdes chloroplastiques.</i>	25
<i>Figure 5 : Représentation de la chaîne respiratoire d'une mitochondrie.</i>	27
<i>Figure 6 : Caractéristiques principales du métabolisme de la photorespiration.</i>	29
<i>Figure 7 : Régulation du complexe enzymatique de la NOX chez les mammifères.</i>	31
<i>Figure 8 : Représentation schématique d'une protéine Rboh.</i>	32
<i>Figure 9 : Formes redox de l'ascorbate.</i>	40
<i>Figure 10 : Oxydation de deux molécules de GSH conduisant à l'établissement d'un pont disulfure et la formation de GSSG.</i>	41
<i>Figure 11 : Représentation de la localisation des différentes voies enzymatiques de détoxification des ERO au niveau d'une cellule végétale.</i>	44
<i>Figure 12 : Cycle Asada-Halliwell-Foyer.</i>	46
<i>Figure 13 : Schématisation de la balance entre les ERO et les antioxydants.</i>	51
<i>Figure 14 : Nature de quelques modifications des chaînes latérales d'acides aminés des protéines après attaque radicalaire.</i>	52
<i>Figure 15 : Schématisation du cycle d'autoperoxydation d'un AGPI (LH).</i>	54
<i>Figure 16 : Représentation très simplifiée des mécanismes enzymatiques ou non-enzymatiques se déroulant à la suite d'une peroxydation lipidique.</i>	55
<i>Figure 17 : Lésions de l'ADN formées suite à un stress oxydant.</i>	57
<i>Figure 18 : Evolution de la production mondiale de plomb.</i>	59
<i>Figure 19 : Cycle biogéochimique du plomb dans les années 1970.</i>	60
<i>Figure 20 : Dynamique du plomb dans le système sol-plante.</i>	63
<i>Figure 21 : Interactions au niveau de la rhizosphère entre le sol, la plante et les microorganismes, influençant la phytodisponibilité.</i>	64
<i>Figure 22 : (a) Représentation schématique de cellules; (b) Dessin d'une coupe transversale de racine, avec la diffusion radiale des ions selon les voies symplastique et apoplastique.</i>	69
<i>Figure 23 : (a) Représentation schématique de l'espace intercellulaire; (b) Coupe transversale de cellules végétales.</i>	70
<i>Figure 24 : Représentation schématique d'une cellule végétale, avec représentées, les zones impliquées dans la séquestration du plomb (1 à 4).</i>	72
<i>Figure 25 : Structure d'une phytochélatine.</i>	74
<i>Figure 26 : Représentation schématique d'une coupe de racine et des flux de plomb à l'intérieur des tissus racinaires.</i>	77

Liste des figures

<i>Figure 27 : Représentation des liens avérés (flèches pleines) et potentiels (flèches pointillées) entre le plomb, la mitose et la génotoxicité.....</i>	<i>85</i>
<i>Figure 28 : Aberrations chromosomiques et fragmentation nucléaire dans des cellules de racines</i>	<i>86</i>
<i>Figure 29 : Représentation schématique et simplifiée de la chaîne photosynthétique et d'un chloroplaste.....</i>	<i>92</i>
<i>Figure 30 : Représentation des différents niveaux d'évaluation des risques pour les écosystèmes.....</i>	<i>99</i>
<i>Figure 31 : Conditions de cultures de Vicia faba.</i>	<i>105</i>
<i>Figure 32 : Réaction entre le MDA et l'acide thiobarbiturique.....</i>	<i>107</i>
<i>Figure 33 : Dérivation des groupements thiols par l'ABD-F</i>	<i>109</i>
<i>Figure 34: Profil du gradient de phases.</i>	<i>110</i>
<i>Figure 35 : Mécanisme de production de lumière par interaction entre le luminol et les ERO.</i>	<i>111</i>
<i>Figure 36 : Cellules racinaires de Vicia faba après préparation selon le protocole normalisé.....</i>	<i>113</i>
<i>Figure 37 : Représentation schématique d'un noyau subissant les étapes de dénaturation et d'électrophorèse du Comet assay. A droite : exemple de plusieurs niveaux de dégâts observés</i>	<i>115</i>
<i>Figure 38 : Coupes transversales de racines de Vicia faba (a) témoins ou exposées au plomb pendant vingt-quatre heures (b).....</i>	<i>223</i>
<i>Figure 39 : Représentation schématique des différentes voies potentielles de régulation des NOX végétales suite à une exposition à un métal.....</i>	<i>230</i>
<i>Figure 40 : Formation de micronoyaux dans des cellules racinaires de Vicia faba exposées à divers traitements.</i>	<i>231</i>
<i>Figure 41 : Teneur foliaire en pigments photosynthétiques dans des plantes témoins, traitées uniquement au plomb pendant huit heures ou co-traitées au DPI pendant la même durée.</i>	<i>232</i>
<i>Figure 42 : Coupes de racines de Pelargonium (A et B) et de Vicia faba (C) exposées à 10 µM de plomb.....</i>	<i>235</i>

Liste des tableaux

<i>Tableau 1 : Présentation de quelques espèces réactives de l'oxygène (ERO) et de l'azote (ERA) radicalaires ou non.</i>	<i>20</i>
<i>Tableau 2 : Valeur des potentiels redox et gamme de concentration des principaux couples redox rencontrés dans les cellules végétales.....</i>	<i>22</i>
<i>Tableau 3 : Principales propriétés physico-chimiques du plomb.</i>	<i>58</i>
<i>Tableau 4 : Effets du plomb sur les activités d'enzymes intervenant dans différents processus métaboliques.....</i>	<i>83</i>
<i>Tableau 5 : Effets du plomb sur la concentration en éléments minéraux des parties aériennes et racinaires.....</i>	<i>89</i>

Liste des abréviations

ABA = Acide abscissique
ABC = ATP Binding Cassette
ABD-F = 7-fluoro-2, 1, 3-benzoxadiazol-4-sulfonamide
ADN = Acide desoxyribonucléique
AGPI = Acide Gras Polyinsaturés
AIA = Acide Indole Acétique
AJ = Acide Jasmonique
ALAD = δ -aminolevulinate déshydratase
AO = Amine-Oxydases
AOX = Oxydase Alternative
AP = Acide Phosphatidique
APX = Ascorbate Peroxydase
AS = Acide Salicyclique
ASC = Ascorbate ou Acide L Ascorbique
ATP = Adénosine Tri Phosphate
ATP = Adénosine Tri Phosphatase
BSO = Buthionine Sulfoximine
CAM = Crassulacean Acid Metabolism
Cam = Calmoduline
Cam K = Calmoduline K
CAT = Catalase
CDF = Cation Diffusion Facilitator
Chlo = Chlorophylle
Chlo a = Chlorophylle
Chlo b = Chlorophylle
Chlo a* = Chlorophylle a excitée
CNGC = Cyclic Nucleotide Gated ion Channel
CTE = Chaîne de Transport d'Electrons
CsCl = Chlorure de Césium
CuAo = Amine oxydase à cuivre
CuZnSOD = SOD à cuivre et à zinc

Liste des abréviations

Cytb6/f = Cytochrome b6/f

DAG = Diacyl Glycérol

DHA = Dehydroascorbate

DHAR = Déhydroascorbate Reductase

DKG = acide 2,3-diketoglutonique

DMF = N, N-Dyméthylphormamide

DPI = Diphenylène Iodonium

DTPA = Diéthylène-Triamine-PentaAcétate

E° = Potentiel Redox

ERA = Espèces Réactives à l'azote

ERO = Espèces Réactives à l'oxygène

ETM = Eléments Traces Métalliques

FAD = Flavine Adénine Dinucléotide oxydée

FADH₂ = Flavine Adénine Dinucléotide réduite

FapyGua = 2,6 diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine

Fd = ferredoxine

Fd ox = Ferrédoxine oxydée

Fd red = Ferrédoxine réduite

FeSOD = SOD à fer

FNR = Ferrédoxine NADP réductase

GPX = Gluthion Peroxydase

GPOX = Gaiacol Peroxydase

GR = Glutathion Reductase

GSH = Glutathion réduit

GSSG = Glutathion oxydé

GST = Glutathion S transférase

H₂O₂ = Peroxyde d'hydrogène

HPLC = Chromatographie liquide à haute performance

HTB = Hydroxytoluène Butylé

IP₃ = Inositol triphosphate

IM = Indice Mitotique

L' = radical lipidique

LCT = Low Affinity Cation Tranporter

Liste des abréviations

LH = acide gras polyinsaturés
LOO' = lipoperhydroxyle
LOOH = Hydroxyperoxyde lipidique
LOX = Lipoxygénase
MDA = Malondialdehyde
MDHA = radical mondehydroascorbate
MDHAR = mondehydroascorbate réductase
MN = Micronoyaux
MnSOD = SOD à manganèse
MOS = Matière Organique du Sol
MT = Metallothionéines
NADH déshydrogénase = Nicotinamide Adenine Dinucléotide réduite déshydrogénase
NAD (P) = Nicotinamide Adenine Dinucléotide phosphate
NADH (P) = Nicotinamide Adenine Dinucléotide réduite phosphate
NBT = Nitro Blue Tétrazolium
NOX = NADPH Oxydase
NO = Oxydenitrique
NRAMP5 = Natural Resistance Associated Macrophage Protein
O₂ = Oxygène
O₂ ·⁻ = Anion radical superoxyde
O₂²⁻ = Ion peroxyde
¹O₂ = oxygène singulet
O₂⁻ = ion oxyde
OH⁻ = anion hydroxyle
OH · = radical hydroxyle
OxO = Oxalate oxydase
PAO = Polymine Oxydase
PC = Phytochélatines
PCS = Phytochélatines Synthétase
Pheo = Pheophytine
PK = Protein kinase
PKC = Protein Kinase C
PLA₂ = Phospholipase A₂

Liste des abréviations

PLC = Phospholipase C
PLD = Phospholipase D
POX = Peroxydase
PQ = Plastoquinone
PQH₂ = Plastoquinol
PRX = Peroxyredoxine
PS = Photosystème
PSI= Photosystème I
PSII = Photosystème II
Q = Quinones
ROP = Rho-like Protein
Rboh = Respiratory burst oxydase homolog
-SH = groupement thiol (ou sulfhydrile)
SOD = Superoxyde Dismutase
SSA = Acide sulfosalicylique
TBARS = Thiobarbituric Reactive Species
TBF = Tri-n-butylphosphine
TFA = acide trifluoroacétique
TPA = O-tétradecanoylphorbol-13-acetate
TPB = tri-n-butylphosphine
TPQ = Trihydroxyphenylalanine quinone
TRX_{ox} = Thiorédoxine oxydée
TRX_{red} = Thiorédoxine réduite
Vit E = Vitamine E
XDH = Xanthine Deshydrogénase
XO = Xylénol Orange
XOD = Xanthine Oxydase
8-oxogua = 8-oxo 7,8-hydroxyguanine
4HNE = 4-Hydroxynonéal

Introduction générale

L'histoire de l'utilisation du plomb est très fortement liée à l'histoire de l'homme moderne. Le plomb est l'un des métaux le plus anciennement utilisé par l'homme. On retrouve des traces de son utilisation comme pigments dans des sépultures préhistoriques datées de plus de 40 000 ans avant JC ainsi que des bijoux en plomb vieux de plus de 6 500 ans. Le problème de la contamination de l'environnement par le plomb date de son utilisation massive par les civilisations antiques. En effet, de par ses propriétés physico-chimiques intéressantes (malléabilité, ductilité, bas point de fusion) et sa facilité d'extraction, les Egyptiens, les Grecs et les Romains l'ont utilisé en très grandes quantités. Le plomb a ensuite connu une utilisation constante jusqu'à ce que sa consommation explose au cours de la Révolution Industrielle. Au cours de l'histoire, le plomb a été utilisé pour de nombreuses applications telles que les verreries, les peintures, les céramiques, l'essence et les accumulateurs. De nos jours, il continue à être massivement employé dans de nombreux processus industriels comme la fabrication des accumulateurs (environ 72 % de sa consommation mondiale). En raison de sa toxicité avérée, son utilisation a été fortement restreinte et, du moins dans les pays les plus développés économiquement, les sources de contamination en plomb (notamment atmosphériques) ont considérablement diminué. Cependant, le plomb étant un élément peu mobile, il a une très forte persistance dans les sols (Bourrelier and Berthelin, 1998).

La toxicité du plomb est connue depuis l'Antiquité. Hippocrate (460-377 av. J.C.) rapportait, il y a 2 400 ans, que les vaches paissant à proximité des mines de plomb de Laurion, près d'Athènes, encouraient la mort (Lessler, 1988). Chez l'Homme, Hippocrate a également décrit les symptômes d'un empoisonnement par le plomb : diarrhées, fatigue, perte d'appétit et de poids, pâleur et irritabilité. Malgré cela, et du fait de ses nombreuses potentialités d'utilisation, le plomb a continué à être utilisé et à polluer de façon importante l'environnement. Les effets délétères du plomb sur la santé humaine et animale ont été étudiés, dès le XIX^{ème} siècle, et de façon importante dès le début du XX^{ème} siècle, notamment en raison des pathologies induites par le plomb comme le saturnisme (Aub *et al.*, 1926). La contamination de l'environnement a été très peu considérée. Il faut attendre les années 1960 et 1970 pour que se développent des études sur le sujet, la majorité concernant des plantes cultivées en raison des risques de contamination de la chaîne trophique et de la baisse de rendements observée sur les parcelles polluées par le plomb.

Ces trente dernières années, de nombreux chercheurs se sont intéressés à l'impact du plomb sur les végétaux. Plusieurs revues bibliographiques lui ont été consacré (Singh *et al.*,

1997; Seregin and Ivanov, 2001; Patra *et al.*, 2004; Sharma and Dubey, 2005). La majorité des travaux en champ, effectués en conditions « réelles », traitent presque exclusivement des transferts sol-plante du plomb. Il est dommageable de constater qu'une large partie des études traitant des effets du plomb sur les végétaux ait été réalisée à des concentrations en plomb très importantes. Ces études (environ deux publications sur trois) utilisent des concentrations en Pb^{2+} souvent létales ou sublétales, de l'ordre du millimolaire, et quasi exclusivement en culture hydroponique. Il est évident qu'à de telles concentrations, les effets observés sont multiples et très significatifs. Cependant, d'un point de vue environnemental, ces résultats n'ont que peu de significativité, car ces teneurs dépassent largement celles qui peuvent se retrouver dans la solution du sol, même dans des sites fortement contaminés (Jopony and Young, 1994). Il est donc important de développer des expérimentations sur plantes entières avec des concentrations en plomb « réalistes » d'un point de vue environnemental.

Si l'on exclut les zones proches d'industries métallurgiques, d'usines de recyclage ou de mines de plomb où les retombées atmosphériques de plomb peuvent être importantes, la contamination des plantes s'effectue majoritairement par les racines. Le plomb étant un élément relativement peu mobile dans le sol, seule une faible proportion contenue dans la solution du sol est disponible pour les plantes (Jopony and Young, 1994). En fonction des conditions du milieu, les plantes peuvent absorber une partie du plomb présent dans le sol. Les ions Pb^{2+} diffusent dans la racine, mais sont bloqués par la barrière physique que représente l'endoderme, ce qui limite fortement leur translocation vers les parties aériennes. Bien que les plantes possèdent de nombreux systèmes de détoxification pour limiter l'interaction de ces ions avec les molécules biologiques, ces derniers induisent tout un éventail d'effets délétères pour les organismes. Le plomb perturbe ainsi les structures membranaires et pariétales, modifie le statut hydrique, perturbe l'absorption et/ou la translocation des éléments minéraux essentiels (calcium, manganèse, zinc, fer...) ou encore réduit la photosynthèse (Seregin and Ivanov, 2001; Sharma and Dubey, 2005). A l'échelle macroscopique, l'exposition des plantes au plomb induit une réduction de la croissance, de la biomasse produite, des rendements et, lorsque le stress est trop sévère, conduit à l'apparition de nécroses racinaires et foliaires, de chloroses, voire à la mort de la plante (Seregin and Ivanov, 2001; Sharma and Dubey, 2005).

Malgré tout l'intérêt porté au plomb par la communauté scientifique, les mécanismes d'action de ce métal, de même que ceux qui conditionnent sa pénétration dans la plante ou dans les cellules, sont peu connus. Les chercheurs ont mis en avant la forte affinité du plomb

pour les molécules biologiques comme raison principale de sa toxicité. Il a la particularité de se fixer aux membranes biologiques ainsi qu'aux parois cellulaires, ce qui expliquerait la perturbation des ultra-structures et les problèmes de croissance. Il présente également une forte affinité pour les protéines qui possèdent des groupements thiols ou des cofacteurs métalliques (métallo-enzymes). Cependant, malgré la toxicité certaine de ces deux types d'interactions, cela ne suffit pas pour expliquer la très grande variété d'effets délétères observés dans les plantes traitées avec du plomb, et notamment la génotoxicité induite par ce métal.

La présence de plomb dans les plantes induit la production d'Espèces Réactives de l'Oxygène (ERO) perturbant le statut redox des cellules, ce qui occasionne un stress oxydatif (Seregin and Ivanov, 2001; Sharma and Dubey, 2005). Cette caractéristique est connue pour être une des causes principales de la toxicité des métaux lourds. Cependant, ni les mécanismes de génération d'ERO par le plomb, ni l'importance relative de ce phénomène dans la toxicité du plomb n'ont été évalués.

Au cours de ce travail de thèse, nous avons choisi d'étudier les effets d'une pollution au plomb « réaliste » sur les plantes, et les relations qui existent entre le stress oxydatif et les effets observés. Du fait de la quasi inexistence de littérature concernant la réponse précoce d'une plante à une exposition à de faibles concentrations en plomb, nous nous sommes attachés dans un premier temps, à déterminer les effets de ce métal sur des temps courts d'exposition, en considérant plus particulièrement (i) l'absorption du plomb et sa translocation vers les parties aériennes ; (ii) l'évolution de trois marqueurs de stress (teneur en pigments photosynthétiques, peroxydation lipidique et activités des enzymes antioxydantes qui sont des marqueurs indirects du stress oxydatif) ; (iii) la réponse de la plante à cette exposition (concentration en glutathion et en phytochélatines intervenant dans la détoxification/séquestration du métal). Le choix de la plante s'est naturellement porté sur la fève (*Vicia faba*), une plante de plus en plus utilisée en écotoxicologie, pour laquelle le laboratoire possède une certaine expertise et qui s'est avérée sensible à de faibles concentrations en plomb (Loudes, 2002; Pourrut, 2003).

Parallèlement à cette étude, nous nous sommes intéressés à la génération d'ERO par le plomb. En utilisant une approche pharmacologique, nous avons tenté de déterminer les

sources d'ERO dans les racines, puisqu'elles sont les premières à être en contact avec le métal et sont exposées aux plus fortes concentrations en plomb.

Enfin, dans une dernière étude, nous nous sommes intéressés à un cas particulier et peu étudié de la toxicité du plomb : sa génotoxicité. Nous avons évalué la génotoxicité induite par une faible concentration en plomb et avons essayé d'élucider les mécanismes induisant cette génotoxicité et, en particulier, les liens unissant cette dernière aux ERO.

Quatre parties composent ce mémoire. La première partie présente une synthèse bibliographique du stress oxydatif dans les plantes et des effets du plomb sur ces dernières. Une présentation du matériel végétal et des techniques utilisées pour répondre à nos objectifs est effectuée dans une seconde partie. La troisième partie présente nos résultats sous la forme de quatre publications rédigées en langue anglaise. La première publication permet d'aborder les effets sur la fève, d'une exposition de courte durée à une concentration réaliste en plomb. Les deux articles suivants rendent possible l'identification dans les racines de la source enzymatique responsable de la production d'ERO et l'estimation de son importance dans la toxicité du plomb. Le dernier article se focalise sur les effets du plomb sur l'ADN des cellules racinaires de fèves et permet d'élucider, en partie, les mécanismes conduisant à cette génotoxicité. La dernière partie du manuscrit, qui propose une synthèse et une discussion de l'ensemble de ces résultats, suggère quelques perspectives à ce travail.

Chapitre I :

Revue

bibliographique

A. Le stress oxydatif chez les plantes

Le stress oxydatif chez les plantes fait l'objet de très nombreuses revues bibliographiques (Bartosz, 1997; Bolwell and Wojtaszek, 1997; Van Breusegem *et al.*, 2001; Potters *et al.*, 2002; Schutzenobel and Polle, 2002; Blokhina *et al.*, 2003; Apel and Hirt, 2004; Foyer and Noctor, 2005a; Pitzschke *et al.*, 2006; Wormuth *et al.*, 2007) et de plusieurs livres (Inze and Montagu, 2001; Smirnoff *et al.*, 2005). Ainsi, le but de cette première partie bibliographique n'est pas de faire un point totalement exhaustif sur ce vaste sujet, mais de réaliser un aperçu des différents processus prooxydants et antioxydants se déroulant dans les cellules végétales, permettant de comprendre les mécanismes conduisant à la génération d'un stress oxydatif.

1 Le statut redox cellulaire

Commencée il y a plus de 1,8 milliards d'années, l'augmentation progressive de la teneur en dioxygène dans l'atmosphère terrestre a permis le développement du métabolisme aérobie. L'apparition de ce métabolisme aérobie est une adaptation à une nouvelle contrainte environnementale. Il possède également un avantage important par rapport aux métabolismes anaérobies puisqu'il permet d'augmenter de façon très significative la quantité d'énergie (ATP) produite. L'évolution positive de l'efficacité du mécanisme de production énergétique a contribué au développement d'organismes multicellulaires complexes. Toutefois, le dioxygène n'est pas un gaz neutre, et sa réactivité conduit à la formation d'espèces réactives de l'oxygène pouvant réagir avec les composés biologiques et induire certains dommages.

1.1 Les Espèces Réactives de l'Oxygène

1.1.1 ERO ou radicaux libres ?

Les ERO sont souvent associées aux radicaux libres. Le terme de radical libre renvoie à n'importe quelle espèce capable d'une existence indépendante (d'où le terme de libre) contenant un ou plusieurs électrons non appariés (Halliwell, 2006). Un électron non apparié est un électron qui occupe seul, une orbitale atomique ou moléculaire. L'exemple le plus simple de radical libre est l'hydrogène qui possède un seul électron non apparié sur sa couche

orbitale externe. Ainsi, si les radicaux libres ne sont pas forcément associés à des espèces dérivant de l'oxygène, la notion de réactivité n'est pas forcément relative aux radicaux.

Les ERO désignent à la fois des espèces radicalaires de l'oxygène (O_2 , $O_2^{\cdot-}$) et des espèces non radicalaires (O_2^{2-} , 1O_2 ; Figure 1). Ainsi, tous les radicaux oxygénés sont des ERO, mais tous les ERO ne sont pas des radicaux.

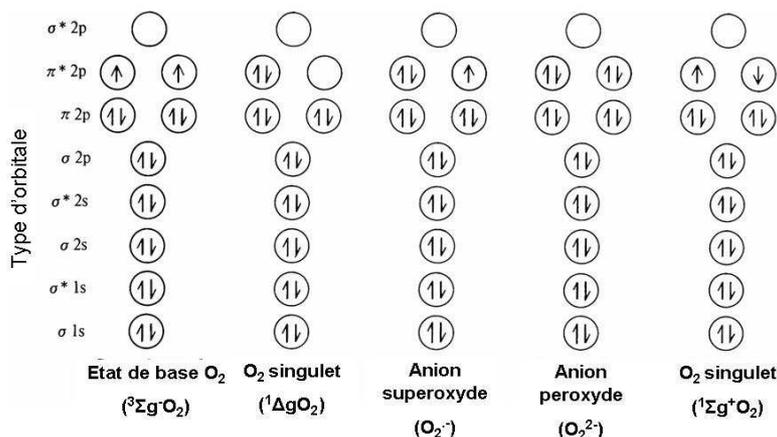


Figure 1 : Version simplifiée de la structure électronique de la molécule de dioxygène et de quelques dérivés (d'après Halliwell, 2006).

La forme stable de dioxygène que nous connaissons, dite triplet, est un biradical libre possédant deux électrons non appariés avec des spins parallèles. Sous cette forme, le dioxygène est un puissant agent oxydant. Cependant, en vertu des règles de restriction de spin de Wigner, et du fait de sa structure électronique, l'oxygène fondamental possède une forte inertie vis-à-vis des molécules biologiques, pour la plupart non radicalaires. Sa réactivité est limitée aux molécules capables d'apporter un ou deux électrons non appariés, et dont le spin est antiparallèle aux siens.

La réactivité des espèces chimiques qui dérivent de ce dioxygène est, elle aussi, relative. En effet, l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) sont très sélectifs dans leurs réactions avec les molécules biologiques et ne vont, par exemple, interagir qu'avec quelques enzymes. Au contraire, le radical hydroxyle ($\cdot OH$) réagit avec toutes les molécules présentes à proximité.

1.1.2 Les différents types d'ERO

1.1.2.1 Les ERO primaires

Différents types d'ERO, plus réactifs que l' O_2 , peuvent être formés dans les organismes vivants. Certaines, directement dérivées de la molécule de dioxygène, sont appelées ERO primaires. Dans un premier temps, un apport énergétique réorganise les électrons de la molécule de dioxygène pour former une des deux formes du dioxygène singulet (Foote *et al.*, 1985 ; Figure 1). Cependant, l'état singulet $^1\Sigma_g^+O_2$ est très instable et se transforme rapidement en $^1\Delta_gO_2$ (Figure 2). Cette dernière forme singulet qui peut se retrouver dans les tissus biologiques, est plus communément écrite sous la forme 1O_2 . Le passage à la forme singulet enlève la contrainte de restriction de spin, et 1O_2 peut réagir directement avec les composants cellulaires. La réactivité du dioxygène singulet étant très importante, sa concentration cellulaire peut être considérée comme négligeable (Foyer and Noctor, 2005b).

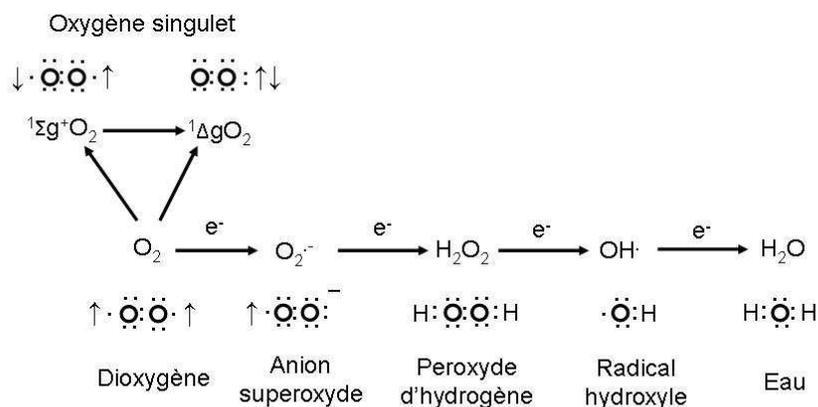


Figure 2 : Schématisation de la transformation énergétique ou chimique (réductions successives) de la molécule de dioxygène dans un système biologique.

Au cours de divers processus physiologiques, un électron peut également être transféré au dioxygène, ce qui conduit à la formation de l'anion radical superoxyde $O_2^{\cdot -}$ (Figure 1 et Figure 2). Le potentiel redox du couple $O_2^{\cdot -} / H_2O_2$ est de + 0,94 V (Foyer and Noctor, 2005b). Sa réactivité est limitée et spécifique à certaines molécules biologiques comme les ènes et diènes, certains acides aminés comme le tryptophane, l'histidine ou la méthionine ou les lipides, avec qui il peut former des hydroperoxydes (Van Breusegem *et al.*, 2001). L'anion superoxyde possède une demi-vie courte, d'environ 2 à 4 μs , et ne peut pas réellement diffuser dans la cellule (Van Breusegem *et al.*, 2001). Sa concentration cellulaire est inférieure à 1 nM (Foyer and Noctor, 2005b).

L'addition d'un nouvel électron au radical superoxyde permet de former l'ion peroxyde (O_2^{2-}) avec un affaiblissement de la liaison O-O. Dans les systèmes biologiques, les réactions ne s'enchaînent pas de la même manière, et la réduction de l' O_2 par deux électrons ou la réduction d' $O_2^{\cdot-}$ conduit à la formation d' H_2O_2 plutôt que d' O_2^{2-} (Figure 2). Le potentiel redox du couple H_2O_2/OH est de + 0,54 V (Foyer and Noctor, 2005b). La réactivité du peroxyde d'hydrogène est faible et due essentiellement à sa capacité à oxyder les groupements thiols (-SH). Cette molécule relativement stable possède une durée de vie d'environ 1 ms, permettant une diffusion sur une certaine distance à partir du site de production (Van Breusegem *et al.*, 2001). La concentration moyenne intracellulaire en H_2O_2 est de l'ordre de 0,5 μM (Mittler, 2002) mais peut varier de 0,1 à 100 μM (Foyer and Noctor, 2005b).

L'addition de deux nouveaux électrons élimine la liaison O-O et conduit à la formation de deux ions oxydes (O^{2-}). De la même manière, dans les systèmes biologiques, la réduction de l' O_2 par quatre électrons ou celle de l' H_2O_2 par deux électrons conduit à la formation d'eau (Figure 2).

Compte-tenu de leurs relatives faibles réactivités, la toxicité de l'anion superoxyde et du peroxyde d'hydrogène est essentiellement due à leur capacité à générer une autre ERO, le radical hydroxyle (Figure 2). Toutefois, cette génération est catalysée par la présence de métaux de transition comme le cuivre ou le fer. Dans un premier temps, $O_2^{\cdot-}$ réduit un ion métallique qui va, par la suite, pouvoir être oxydé par H_2O_2 , via la réaction de Fenton (Figure 3). La somme de ces deux réactions, appelée réaction d'Haber-Weiss, aboutit à la formation d' $\cdot OH$.

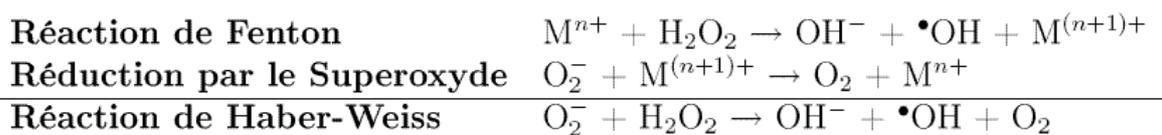


Figure 3 : Réaction d'Haber-Weiss conduisant à la formation du radical hydroxyle.

M correspond à un métal de transition (essentiellement le cuivre et le fer).

Si les auteurs ne s'accordent pas sur le temps de demi-vie de ce radical hydroxyle (<1 μs à <1 ns), tous s'entendent sur son extrême réactivité et son très fort pouvoir oxydant ($E \cdot OH/H_2O = + 2,20V$). Il interagit fortement et très rapidement avec toutes les molécules biologiques. Ainsi, sa concentration cellulaire est considérée comme négligeable (Foyer and Noctor, 2005b).

1.1.2.2 Les ERO secondaires

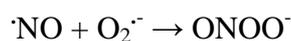
Les ERO secondaires correspondent aux ERO formées par réactions entre les ERO primaires et les composés biochimiques de la cellule. Le Tableau 1 présente quelques ERO secondaires. Contrairement aux ERO primaires, produites de façon régulière et en quantité importante par les cellules végétales, les ERO secondaires sont seulement formées dans des conditions particulières. Mis à part certains peroxydes organiques, très peu d'études se sont intéressées à ces ERO, et leur importance biologique est discutable.

Les Espèces Réactives de l'Azote (ERA) sont également présentées dans ce Tableau 1. Ces espèces particulières, possédant à la fois des capacités oxydantes et nitrifiantes, devraient plutôt être dénommées Espèces Réactives de l'Oxygène et de l'Azote.

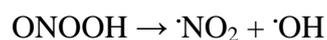
Espèces radicalaires	Espèces non radicalaires
ERO :	ERO :
Carbonate, $\text{CO}_3^{\cdot-}$	Acide hypobromeux, HOBr
Peroxyl, RO_2^{\cdot}	Acide hypochloreux, HOCl
Alkoxyl, RO^{\cdot}	Peroxydes organiques, ROOH
Radical dioxyde de carbone, $\text{CO}_2^{\cdot-}$	Peroxynitrite, ONOO^{\cdot}
	Peroxynitrate, $\text{O}_2\text{NOO}^{\cdot}$
	Acide peroxyditreux, ONOOH
	Peroxomonocarbonate, $\text{HCOOCO}_2^{\cdot-}$
ERA :	ERA :
Oxyde nitrique, $\cdot\text{NO}$	Acide nitrique, HNO_2
Dioxyde nitrique, $\cdot\text{NO}_2$	Cation et anion nitrosyle, NO^+ et $\text{NO}^{\cdot-}$
Radical nitrate, $\cdot\text{NO}_3$	Tétraoxyde et trioxyde d'azote, N_2O_4 et N_2O_3
	Peroxynitrite, ONOO^{\cdot}
	Peroxynitrate, $\text{O}_2\text{NOO}^{\cdot}$
	Acide peroxyditreux, ONOOH
	Cation nitronium, NO_2^+
	Chlorure de nitrile, NO_2Cl

Tableau 1 : Présentation de quelques espèces réactives de l'oxygène (ERO) et de l'azote (ERA) radicalaires ou non (adapté d'après Halliwell, 2006).

Ces dix dernières années, le rôle physiologique de l'oxyde nitrique (NO) a été particulièrement étudié chez les plantes (Crawford and Guo, 2005; Delledonne, 2005; Shapiro and Gerald, 2005; Yamasaki and Cohen, 2006; Arasimowicz and Floryszak-Wieczorek, 2007). Il apparaît que le NO joue un rôle essentiel en tant que molécule de signalisation. L'oxyde nitrique peut également interagir avec $O_2^{\cdot-}$ pour former du peroxy-nitrite (Beckman and Koppenol, 1996) :



A un pH physiologique, le peroxy-nitrite se protone rapidement pour former de l'acide peroxy-nitreux. Ce puissant agent nitrifiant et oxydant peut altérer directement de nombreuses molécules biologiques. Il peut également générer des dommages indirects en subissant une fission homolytique produisant deux puissants agents oxydants, le dioxyde nitrique et le radical hydroxyle (Beckman and Koppenol, 1996) :



Ainsi, les voies de production d'ERO et d'ERA primaires sont fortement interconnectées. C'est pour cette raison qu'une partie des ERA est considérée comme des ERO par certains auteurs (Tableau 1). Néanmoins, la quantité d' $\cdot\text{OH}$ provenant de cette voie, ainsi que la quantité d'ERA produite, est faible dans les tissus végétaux. En effet, la quantité de $\cdot\text{NO}$ générée est de l'ordre de quelques $\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ (Vanin *et al.*, 2004), alors que la quantité d' $O_2^{\cdot-}$ produite est de l'ordre de plusieurs centaines de $\mu\text{M}\cdot\text{s}^{-1}$ (Mittler, 2002) ; la teneur moyenne des cellules végétales en H_2O_2 est de l'ordre de plusieurs micromolaires (Foyer and Noctor, 2005b). Pour cette raison, la suite de cette revue bibliographique sera uniquement consacrée aux ERO primaires.

1.2 Potentiel redox intracellulaire

Les organismes aérobies les plus évolués ont dû développer des systèmes de conduction des nutriments mais également de l'oxygène, pour s'assurer de sa distribution dans l'ensemble de l'organisme (systèmes vasculaires). Posséder de tels systèmes de distribution est un avantage, car ils permettent de réguler les flux de dioxygène parvenant aux cellules. Cependant, les systèmes de régulation n'empêchent pas la production d'ERO au niveau cellulaire. La quantité d' H_2O_2 produite est assez importante, conduisant à une concentration moyenne de l'ordre du micromolaire. Cette concentration non négligeable de molécules

oxydantes a conduit à des adaptations au niveau cellulaire. Toutes les cellules d'organismes aérobie contiennent des concentrations importantes de molécules possédant un fort pouvoir réducteur, comme les couples GSH/GSSG (glutathion réduit/glutathion oxydé), NAD(P)/NAD(P)H (nicotinamide adénine dinucléotide (phosphate) oxydé/réduit), TRX_{ox}/TRX_{red} (thiorédoxine oxydée/réduite) et Fd_{ox}/Fd_{red} (ferrédoxine oxydée/réduite) (Tableau 2). Contrairement aux cellules animales, les cellules végétales, et en particulier les cellules chlorophylliennes, contiennent de très grandes quantités d'ascorbate (Déhydroascorbate/Ascorbate).

Couple redox	Potentiel redox (V)	Gamme de concentration cellulaire (μ M)
DHA/ASC	- 0,10	10000-20000
GSSG/GSH	- 0,24	2000-5000
NAD(P)/NAD(P)H	- 0,32	200-500
TRX _{ox} /TRX _{red}	- 0,33	10-100
Fd _{ox} /Fd _{red}	- 0,42	10-100

Tableau 2 : Valeur des potentiels redox et gamme de concentration des principaux couples redox rencontrés dans les cellules végétales (adapté d'après Foyer and Noctor, 2005b).

Le potentiel redox intracellulaire, ou statut redox, est la résultante de l'état redox des couples oxydo-réducteurs présents dans la cellule. Cette notion peut s'apparenter à la notion de pH cellulaire associée aux couples acido-basiques. En pratique, les conditions redox régnant dans la cellule sont évaluées par le rapport des concentrations des formes oxydées et réduites des couples redox prépondérants, comme ceux du glutathion et de l'ascorbate (Noctor, 2006). Du fait de leurs fortes concentrations cellulaires, les deux couples GSSG/GSH et DHA/ASC agissent comme des tampons redox, à l'instar des tampons acido-basiques.

Il existe une très forte interconnexion entre les ERO et les molécules réductrices. Par exemple, le GSH et l'ascorbate sont capables de réduire directement l'anion superoxyde et le peroxyde d'hydrogène. Ils servent également de co-substrats aux enzymes antioxydantes détoxiquant les ERO. Ainsi, de part leur potentiel oxydant et via leurs interactions avec les couples redox majoritaires, les ERO contribuent à l'établissement potentiel redox

intracellulaire. Il résulte, de ces diverses interactions, une homéostasie redox cellulaire. Le potentiel redox cellulaire détermine les proportions relatives des espèces oxydées ou réduites de chaque couple redox. Ces proportions dépendent des potentiels redox (E°) de ces couples. Cette fonction du potentiel redox cellulaire est particulièrement importante, car l'activité de nombreuses protéines, et en particulier de nombreux facteurs de transcription, est régulée par leur état redox (Foyer and Noctor, 2005b, Noctor, 2006). Ainsi, dans des conditions normales, le cytoplasme cellulaire est un milieu très réducteur, ce qui a pour conséquence de maintenir la grande majorité des groupements thiols à l'état réduit (Foyer and Noctor, 2005b).

2 Les prooxydants

Chez les plantes, il existe de nombreuses sources cellulaires d'ERO, localisées à divers endroits de la cellule. Les trois sources principales sont les chaînes de transport d'électrons (CTE) des chloroplastes et mitochondries, certaines enzymes comme les peroxydases et oxydases et enfin, les molécules photosensibilisatrices comme la chlorophylle (Dat *et al.*, 2000; Blokhina *et al.*, 2003).

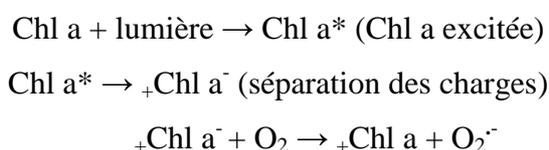
2.1 Production d'ERO lors des principaux processus métaboliques

2.1.1 Les chloroplastes et l'appareil photosynthétique

Les cellules chlorophylliennes, du fait de leur production d' O_2 au cours du processus photosynthétique, sont particulièrement exposées à la génération d'ERO. Le chloroplaste est souvent considéré comme étant la principale source d'ERO chez les organismes photosynthétiques (Foyer and Noctor, 2003; Edreva, 2005; Asada, 2006). Le processus photosynthétique est à l'origine de la formation directe d' 1O_2 et d' $O_2^{\cdot-}$ et indirecte d' H_2O_2 (par dismutation de l' $O_2^{\cdot-}$) et d' $\cdot OH$. Il y a encore peu de temps, le photosystème I (PSI) était considéré comme la source principale des ERO chloroplastiques. Dans des conditions physiologiques normales, le flux d'électrons du PSI est dirigé vers le NADP qui est réduit en NADPH par la ferrédoxine NADP réductase (FNR). Lors d'un stress (par exemple, une luminosité trop importante), la chaîne d'électrons peut se saturer. Une partie du flux d'électrons peut être alors dérivée par la ferrédoxine vers l'oxygène (Figure 4). Cette réaction est connue sous le nom de réaction de Mehler. En plus de la ferrédoxine, d'autres accepteurs

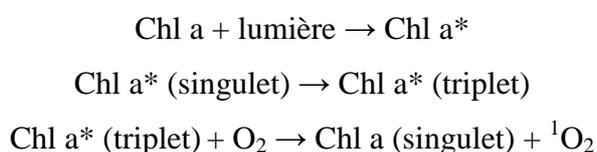
d'électrons du PSI possèdent un potentiel redox suffisamment négatif pour réduire le dioxygène en anion superoxyde (Mehler, 1951; Asada *et al.*, 1974).

Ces dix dernières années, il est apparu que le PSII était également un site de génération d'O₂⁻ (Cleland and Grace, 1999; Dat *et al.*, 2000). Les quinones A et B du PSII seraient impliquées dans la perte d'électrons conduisant à la réduction de l'O₂ (Figure 4). Certains auteurs ont même suggéré que la production chloroplastique d'anions superoxydes serait majoritairement le fait de cette perte d'électrons du PSII, en particulier au niveau des quinones B (Zhang *et al.*, 2003). La chlorophylle a (Chl a) du PSII possède également la capacité de transmettre directement un électron à l'oxygène, en cas de saturation de la CTE (Hippeli *et al.*, 1999). Cette réaction dite photodynamique de classe I est caractérisée par les réactions suivantes :



Une fois produits, les ions O₂⁻ peuvent se retrouver dans le lumen où ils se protonent pour former des HO₂⁻ susceptibles d'initier une peroxydation lipidique. Les anions superoxydes sont aussi produits dans le stroma où ils sont rapidement pris en charge par la superoxyde dismutase (SOD), responsable de leur dismutation en H₂O₂ (Foyer *et al.*, 1994; Edreva, 2005).

La saturation de la CTE peut également conduire la Chl a du PSII à interagir avec le dioxygène, via une réaction photodynamique de classe II, induisant à la formation d'¹O₂ et non d'O₂⁻ (Hippeli *et al.*, 1999; Niyogi, 1999). Dans ce cas, la Chl a excitée ne trouve pas d'accepteur d'électrons et perd progressivement de son excitation par des dégagements de chaleur et un réarrangement des électrons sur sa couche orbitale externe. Ce réarrangement fait passer la Chl a de l'état singulet à triplet, le tout accompagné d'une inversion de spins. La Chl a, sous forme triplet, peut alors transmettre une partie de son énergie à une molécule de dioxygène dont la couche externe d'électrons se réorganise, conduisant à la formation d'oxygène singulet (Figure 4):



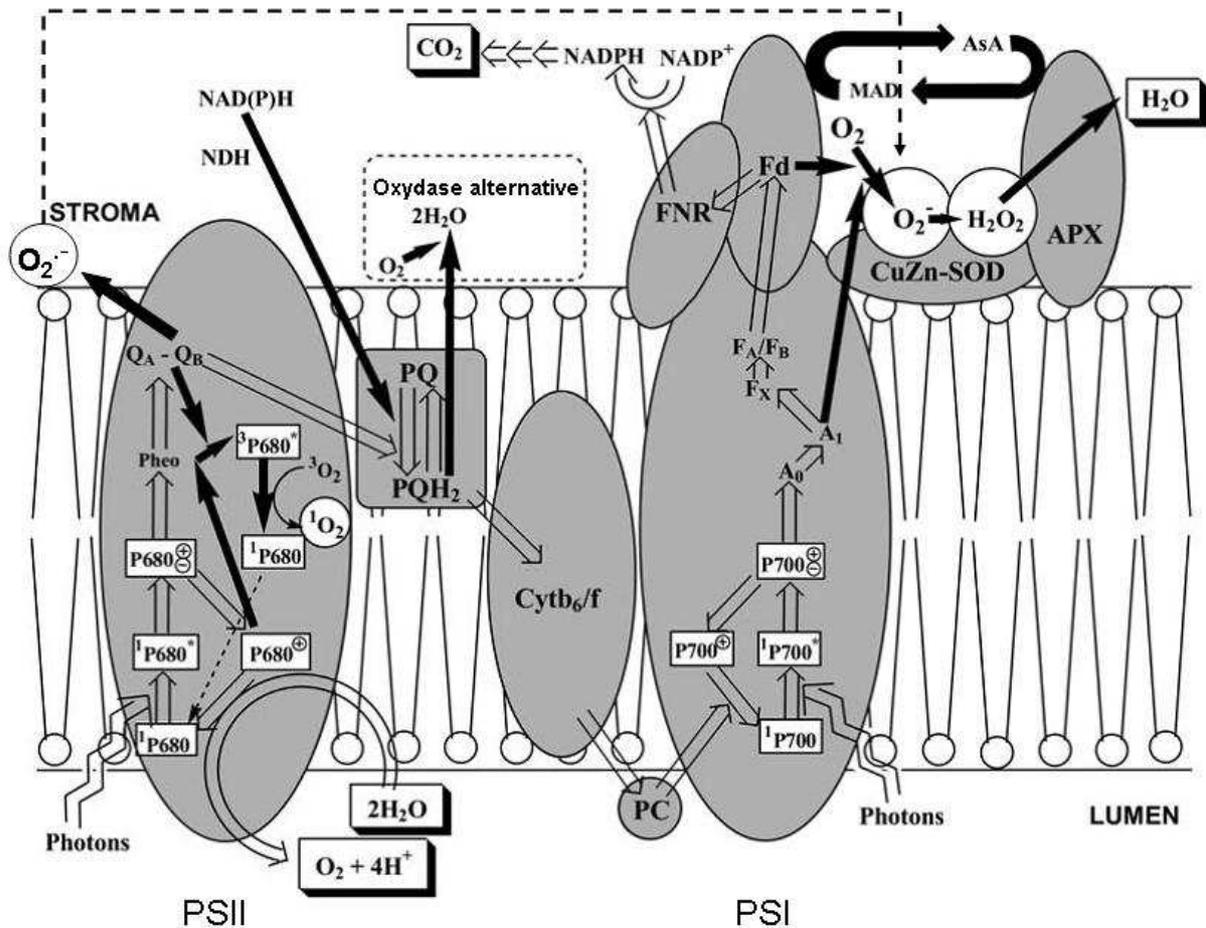


Figure 4 : Production d'oxygènes singlets au niveau du PSII et d'anions superoxydes au niveau des PSI et PSII des thylakoïdes chloroplastiques.

Les flèches claires représentent la photoexcitation au niveau des PS et les flux d'électrons dans les CTE, en condition physiologiques optimales. Les flèches noires représentent les évènements se déroulant lorsque le flux de photons ou d'électrons excède la capacité d'assimilation en CO₂. A₀, A₁, F_A, F_B, F_X, accepteurs d'électrons ; APX, ascorbate peroxydase, AsA, ascorbate ; Cytb₆/f, cytochrome b₆/f ; Fd, ferrédoxine, FNR, ferrédoxine NADP Réductase ; P680, molécule piège de chlorophylle du PSII ; P700, molécule piège de chlorophylle du PSI ; PC, plastocyanine ; Pheo, phéophytine ; PQ, plastoquinone ; PQH₂, plastoquinole ; Q, quinones ; CuZnSOD, superoxyde dismutase à zinc (adapté d'après Asada, 2006).

2.1.2 Les mitochondries et la chaîne respiratoire

De la même manière que chez les autres organismes aérobies, les mitochondries constituent une source importante d'ERO chez les plantes. Néanmoins, chez ces dernières, la part de la production d'ERO due aux mitochondries, est variable en fonction de l'organe considéré et des conditions du milieu (en particulier l'ensoleillement). Ainsi, elles constituent

la source principale d'ERO dans les cellules non-chlorophylliennes, alors qu'elles ne représentent qu'une faible part dans les cellules chlorophylliennes exposées à la lumière (Foyer and Noctor, 2003). Les mitochondries des végétaux diffèrent de leurs homologues animales par une chaîne de transport d'électrons différentes, et des fonctions supplémentaires comme la participation au cycle de la photorespiration (Noctor *et al.*, 2007). De plus, les mitochondries des cellules photosynthétiques évoluent dans un environnement particulier, riche en oxygène et en carbohydrates.

Dans des conditions physiologiques normales, environ 2 % du dioxygène total consommé par la mitochondrie est transformé en ERO (Boveris and Chance, 1973). De la même façon que pour la CTE des chloroplastes, c'est une saturation de la CTE mitochondriale qui semble être la cause des pertes d'électrons vers l'O₂ (Figure 5). Les composés intermédiaires radicalaires d'ubisemiquinones, formés par la réduction du pool d'ubiquinones par les complexes I et III de la CTE, seraient les principaux donneurs d'électrons au dioxygène (Moller, 2001; Rhoads *et al.*, 2006). Cependant, les flavoprotéines du complexe II pourraient également contribuer à cette production d'O₂⁻ (Young *et al.*, 2002).

La production d'ERO à proximité des CTE peut générer des dégâts membranaires (cf. 4.2.2), induisant une diminution accrue de l'efficacité de la CTE et une perte plus importante d'électrons. La résultante est une augmentation de la génération d'ERO diminuant d'autant plus l'efficacité de la CTE. Ainsi, lors de stress importants, la génération initiale d'ERO peut conduire à un cycle délétère de production de ces espèces toxiques pour l'organisme. Ce cycle de production d'ERO mitochondriales est notamment considéré comme l'une des causes principales du vieillissement cellulaire (Loeb *et al.*, 2005).

Bien qu'il existe des photosensibilisateurs potentiels (précurseurs hémiques) au niveau des mitochondries, la production d'oxygène singulet n'y a pas été mise en évidence (Noctor *et al.*, 2007).

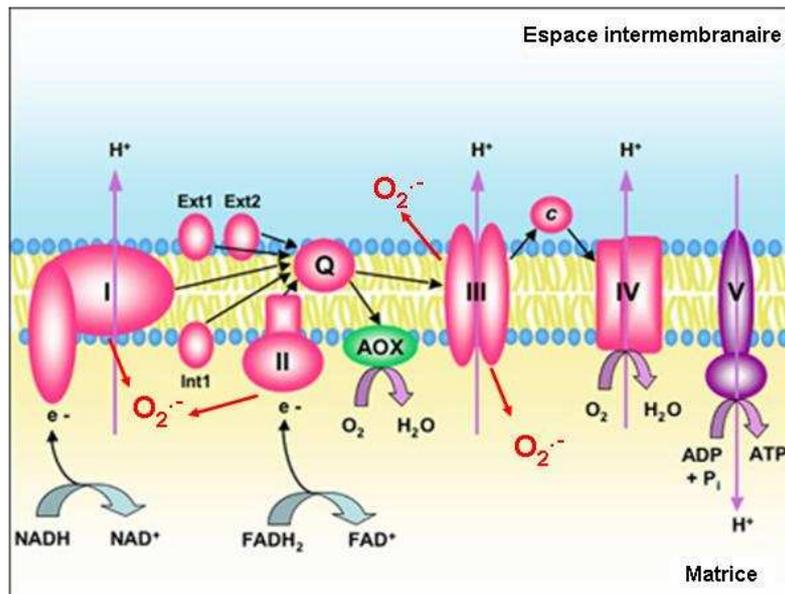


Figure 5 : Représentation de la chaîne respiratoire d'une mitochondrie.

Les flèches rouges représentent les « fuites » d'électrons vers l'O₂ permettant de former des anions superoxydes. Complexe I: NADH déshydrogénase, complexe II: succinate déshydrogénase, complexe III: cytochrome bc1, complexe IV: cytochrome c oxydase, complexe V: ATPase, Q: pool d'ubiquinone, AOX: oxydase alternative, c: cytochrome c, Ext1 and Ext2: NAD(P)H déshydrogénases externes.

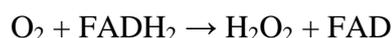
2.1.3 Les peroxysomes

Les peroxysomes possèdent une structure simple, une taille réduite et une très grande quantité de catalases. En raison de ces caractéristiques, les peroxysomes ont longtemps été considérés comme des organites spécialisés dans la détoxification du peroxyde d'hydrogène. Les peroxysomes sont en fait le siège d'une forte activité métabolique très centrée sur le métabolisme oxydatif (Corpas *et al.*, 2001; Nyathi and Baker, 2006). Ils possèdent de nombreux systèmes antioxydants et prooxydants. Les deux principales sources d'ERO peroxysomales sont la β -oxydation des acides gras et la photorespiration (Corpas *et al.*, 2001; Nyathi and Baker, 2006).

2.1.3.1 La β -oxydation

La β -oxydation est un processus fondamental pour les animaux, les levures mais encore plus pour les plantes. En effet, en dehors de leurs utilisations cataboliques, les composés dérivés de cette β -oxydation sont impliqués dans un très grand nombre de processus cellulaires (Baker *et al.*, 2006; Nyathi and Baker, 2006; Poirier *et al.*, 2006). En particulier,

cette fonction peroxysomale permet la synthèse de molécules telles que l'acide jasmonique (AJ), l'acide indole acétique (AIA) ou l'acide salicylique (AS). Cependant, une étape de ce processus, l'oxydation de l'acyl CoA par la l'acyl CoA-oxydase, entraîne la réduction du FAD en FADH₂ (Baker *et al.*, 2006). La régénération du cofacteur s'effectue par la réduction d'une molécule d'O₂ entraînant la formation d'H₂O₂ (Foerster *et al.*, 1981; Baker *et al.*, 2006).



2.1.3.2 La photorespiration

La photorespiration est un processus vital pour les plantes. Bien qu'il apparaisse comme un mécanisme coûteux en énergie et peu rentable, ce mécanisme physiologique remplit le rôle de « soupape de sécurité » du photosystème, en évitant la saturation de la CTE chloroplastique (Wingler *et al.*, 2000). La photorespiration est un processus complexe illustrant bien les échanges de métabolites entre les différents composants cellulaires. En effet, il implique des réactions métaboliques dans le chloroplaste, la mitochondrie et le peroxysome (Foyer and Noctor, 2000 ; Figure 6). La réaction de transamination du glycolate, effectuée dans le peroxysome, conduit à la formation de glyoxylate et d'H₂O₂ (Foyer and Noctor, 2000; Wingler *et al.*, 2000; Nyathi and Baker, 2006).

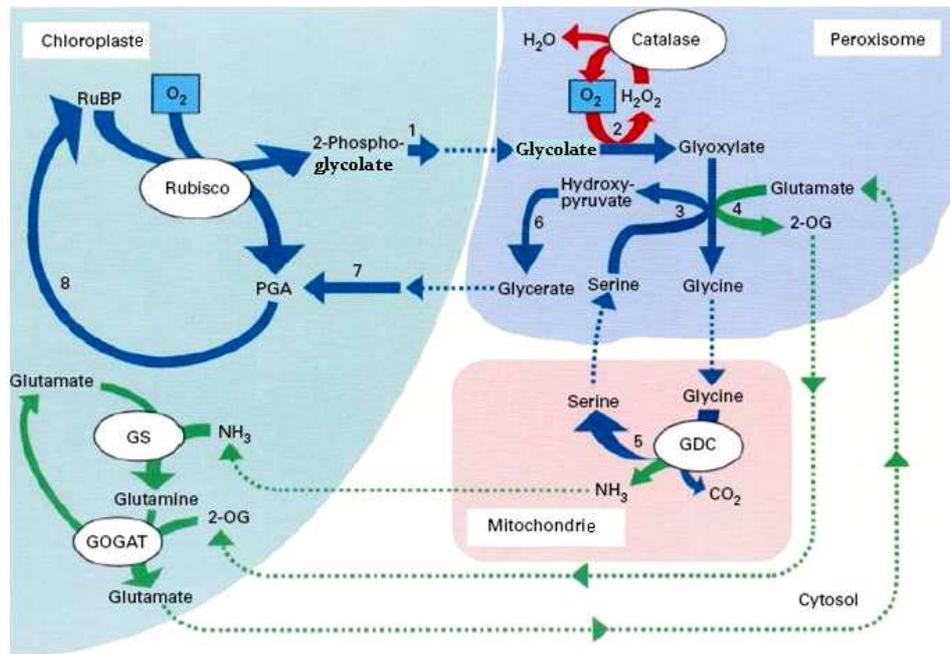


Figure 6 : Caractéristiques principales du métabolisme de la photorespiration (d'après Foyer and Noctor, 2000).

Les flèches pleines montrent des conversions métaboliques, les flèches pointillées, des mouvements entre compartiments. Les flèches bleues présentent des réactions qui impliquent le recyclage du carbone, les vertes l'utilisation de l'azote et les rouges la production et détoxication de l'H₂O₂. Les enzymes impliquées dans ce métabolisme sont : 1, phosphoglycolate phosphatase ; 2, glycolate oxydase ; 3, sérine:glyoxylate aminotransférase ; 4, glutamate:glyoxylate aminotransférase ; 5, sérine hydrométhyl transférase ; 6, hydroxypyruvate réductase ; 7. glycérate kinase ; 8, enzymes réductrices de la voie des pentoses phosphates. GDC : glycine décarboxylase ; GOGAT : glutamate synthase ; GS : glutamine synthétase ; 2-OG :2-oxoglutarate ; PGA : 3-phosphoglycérate.

2.1.3.3 La chaîne de transport des électrons peroxysoxale

Les peroxysoxomes possèdent également la capacité de générer de l'O₂⁻, via leur CTE (Fang *et al.*, 1987). Cette CTE, de taille réduite par rapport à celle des chloroplastes ou des mitochondries, serait un système à trois composantes, formé par une protéine homologue à la monodéhydroascorbate réductase, une protéine homologue au cytochrome b₅ et une protéine inconnue de 29 kD (Fang *et al.*, 1987; del Río *et al.*, 1992; Lopez-Huertas *et al.*, 1997; del Río *et al.*, 1998). Le rôle de cette CTE serait de régénérer du NAD⁺ et du NADP⁺ nécessaire au métabolisme du peroxysoxe. De la même façon que pour les autres CTE, l'O₂ est un accepteur potentiel d'électrons en cas de saturation de la CTE (del Río *et al.*, 1998).

2.2 Les principales sources enzymatiques

Les plantes possèdent plusieurs enzymes ou complexes enzymatiques responsables d'une production d'ERO plus ponctuelle que celle induite par les grandes fonctions métaboliques. Cependant, ces générations ponctuelles sont à l'origine de « flambées oxydatives » (oxidative burst) pouvant être impliquées dans des processus physiologiques bien spécifiques comme la croissance cellulaire, mais surtout dans la réponse aux stress biotiques et abiotiques.

2.2.1 Les NADPH-oxydases

Le phénomène de flambées oxydatives est un phénomène bien connu chez les mammifères, participant à la lutte contre les infections par des microorganismes. Les NADPH-oxydases (NOX), en particulier celles associées aux macrophages, sont les principales sources d'ERO à l'origine de cette flambée oxydative (Segal and Abo, 1993; Lambeth, 2004; Segal, 2008). Les NOX forment une famille multigénique de sept membres chez l'Homme (Sagi and Fluhr, 2006). Ce complexe enzymatique est constitué par deux protéines membranaires gp91^{phox} et p22^{phox} (phox pour phagocyte oxydase) formant un flavocytochrome b₅₅₈ hétérodimérique (Lambeth, 2004; Figure 7). L'activation de ce complexe nécessite la translocation vers la membrane plasmique de trois composants régulateurs cytosoliques, les protéines p40^{phox}, p47^{phox} et p67^{phox}, se liant aux protéines membranaires pour former le complexe actif de la NOX (Bokoch, 1994). Deux petites protéines, rap1A et p21^{rac}, appartenant à la famille des GTPases Rho, complètent ce complexe. Il semblerait que l'activation de la NOX soit initiée par la phosphorylation des composants cytosoliques, par une protéine kinase C (PKC). Chez les mammifères, l'association des composants membranaires et cytosoliques est indispensable au fonctionnement du complexe enzymatique réduisant l'O₂ en O₂⁻ (Bokoch, 1994; Lambeth, 2004).

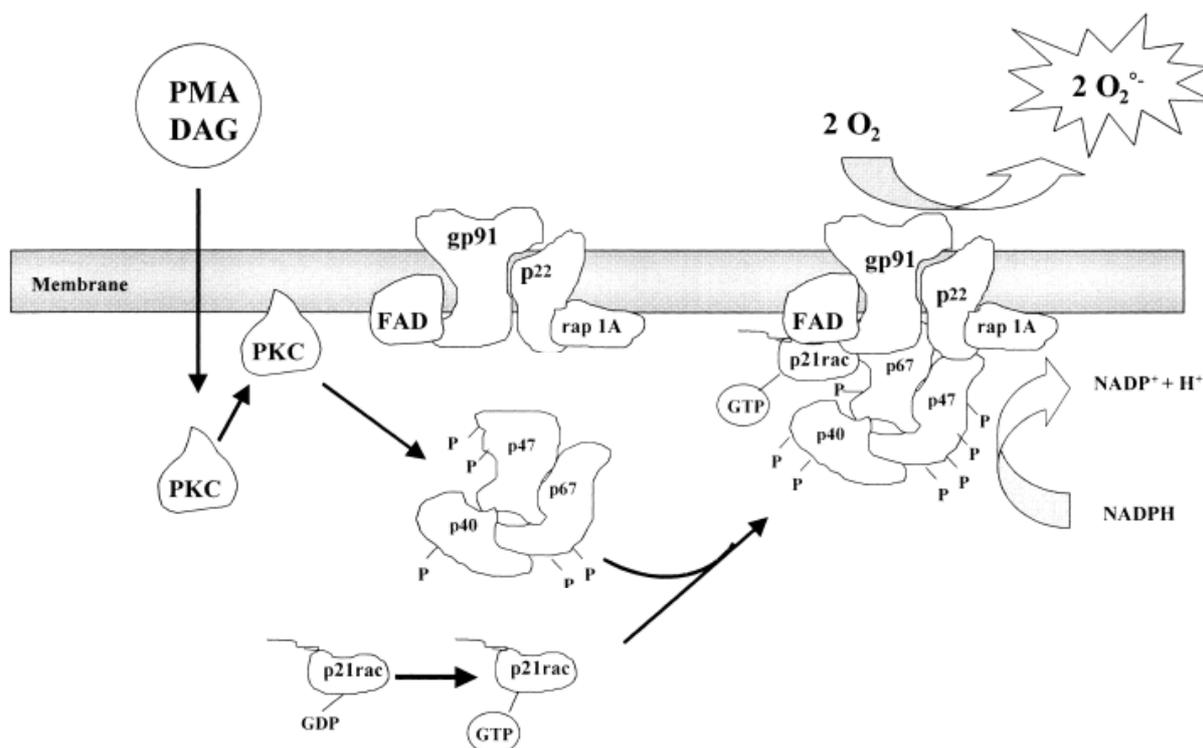


Figure 7 : Régulation du complexe enzymatique de la NOX chez les mammifères (d'après Morena *et al.*, 2002).

La brusque production d'ERO n'est pas une exclusivité animale puisqu'elle a également été détectée chez les plantes, en particulier lors d'interactions plantes-microorganismes (Low and Merida, 1996). Par analogie avec le mode de production d'ERO dépendant de la NOX chez les mammifères, de nombreux scientifiques ont recherché des homologues de ce complexe enzymatique chez les plantes. L'utilisation de diphénylène iodonium (DPI), un inhibiteur pharmacologique de la NOX, a permis de mettre en évidence son implication dans la flambée oxydative induite lors d'une infection par des pathogènes (Levine *et al.*, 1994; Desikan *et al.*, 1996). L'utilisation d'anticorps dirigés vers les protéines humaines p40^{phox}, p47^{phox}, et p67^{phox} a révélé l'existence de protéines homologues, de tailles comparables, chez les plantes (Desikan *et al.*, 1996; Xing *et al.*, 1997; Razem and Bernards, 2003). Il n'existe pas d'homologue de la protéine GTPase p21^{rac} participant à la régulation des NOX animales (Sagi and Fluhr, 2006). Cependant, d'autres GTPases, homologues des GTPases Rho animales et nommées ROP (pour Rho-like protein), semblent tenir ce rôle (Jones *et al.*, 2007).

Des techniques de clonage moléculaire ont été utilisées, en particulier pour caractériser la protéine gp91^{phox} contenant le site catalytique du complexe de la NOX. Les différentes études menées ont identifié une famille multigénique, codant pour des protéines d'environ 105 kD nommées Rboh (pour respiratory burst oxidase homolog). Ces protéines contiennent

une région C-terminale montrant des similitudes prononcées avec celle de la protéine gp91^{phox} (Sagi and Fluhr, 2001; Torres *et al.*, 2001). Les protéines Rboh, comme leurs homologues gp91^{phox}, contiennent six domaines transmembranaires ainsi que des domaines de liaison au FAD et NADPH dans leur partie C-terminale (Figure 8). Les troisième et cinquième domaines transmembranaires lient, par quatre liaisons avec de l'histidine, deux groupes hémiques indispensables à la réduction du dioxygène en anion superoxyde. De plus, les Rboh végétales présentent des analogies plus prononcées avec la protéine gp91^{phox} de la NOX5 humaine qu'avec celle des autres NOX, en possédant un large domaine hydrophile N-terminal qui contient deux motifs « EF hand » de liaison au calcium (Torres *et al.*, 1998; Amicucci *et al.*, 1999).

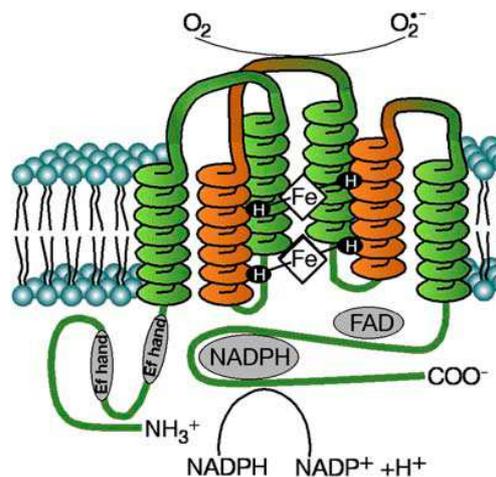


Figure 8 : Représentation schématique d'une protéine Rboh (d'après Sagi and Fluhr, 2006).

Bien que les différents composants cytosoliques aient été identifiés chez les plantes, il semble que leur association aux protéines membranaires ne soit pas indispensable à l'activité de la NOX et qu'un afflux de calcium suffise à activer la protéine Rboh (Sagi and Fluhr, 2001). Toutefois, les composants cytosoliques permettraient de réguler l'activité de cette dernière comme l'ont démontré Xing et collaborateurs (1997) dans des cultures cellulaires de tomates. Ces auteurs ont également démontré l'importance de la phosphorylation des composants cytosoliques dans cette régulation. Cependant, la PKC ne serait pas impliquée dans cette phosphorylation. Bien qu'une activité PKC ait été détectée chez la pomme de terre (Subramaniam *et al.*, 1997), les gènes codant pour cette protéine n'ont pas encore été identifiés. Il semblerait qu'un autre type de protéine kinase (PK) soit impliqué dans la régulation de l'activité NOX chez les plantes.

La famille multigénique des Rboh est composée d'au moins dix membres chez *Arabidopsis thaliana* (Sagi and Fluhr, 2006). Leur expression dans l'organisme n'est pas uniforme. Seules les Rboh D et F s'expriment dans toute la plante alors que cinq autres (A, B, C, G et I) s'expriment spécifiquement dans les racines (Zimmermann *et al.*, 2004). Contrairement aux NOX animales, les NOX végétales ne semblent pas cantonnées à la défense de l'organisme contre les pathogènes (Zimmermann *et al.*, 2004; Sagi and Fluhr, 2006). Elles sont notamment impliquées dans la génération d'ERO nécessaires à l'élongation pariétale ou la subérisation, mais aussi dans la production d'ERO en réponse à de nombreux stress abiotiques comme les stress hydrique, salin, ozoné ou anoxique (Orozco-Cardenas *et al.*, 2001; Langebartels *et al.*, 2002; Blokhina *et al.*, 2003; Razem and Bernards, 2003; Sagi and Fluhr, 2006; Kumar *et al.*, 2007; Rodriguez *et al.*, 2007; Hao *et al.*, 2008). Les NOX sont également responsables de la flambée oxydative induite par certains métaux lourds comme le cadmium ou le cuivre (Olmos *et al.*, 2003; Romero-Puertas *et al.*, 2004; Garnier *et al.*, 2006; Maksymiec and Krupa, 2006; Maksymiec, 2007).

2.2.2 Les peroxydases extracellulaires

Les peroxydases végétales (POX) appartiennent à la superfamille des peroxydases, extrêmement répandue dans le monde vivant et composée de trois classes différentes (Welinder, 1992):

- les POX classe I sont des enzymes intracellulaires,
- les POX de classe II sont des POX libérées par les champignons,
- les POX de classe III correspondent aux peroxydases sécrétées par les cellules végétales.

En dehors de l'ascorbate peroxydase (APX ; POX de classe I), les POX de classes III correspondent à la classe de POX la plus importante et de loin la plus étudiée chez les plantes. Elles sont présentes dans tous les végétaux, mis à part les algues vertes unicellulaires (Passardi *et al.*, 2004a). Cette omniprésence dans la lignée verte s'accompagne d'une complexification et d'une diversification de l'usage des POX au cours de l'évolution. En effet, la classe III est un groupe multigénique dont le nombre de copies par plante semble être corrélé à la complexité de la plante et de son biotope (Duroux and Welinder, 2003; Passardi *et al.*, 2004a). Ainsi, 73 gènes codant pour des POX sont présents dans le génome d'*Arabidopsis thaliana* (Tognolli *et al.*, 2002), et 138 copies ont été découvertes dans celui d'*Oriza sativa*

(Passardi *et al.*, 2004a). Cette redondance apparente cache, en réalité, une diversité très importante au sein de ces POX, puisqu'elles présentent entre elles des homologies allant de 93 %, pour les plus proches, à 28 %, pour les plus éloignées.

Une telle diversité ne peut s'expliquer que par de très nombreuses fonctions au sein de la plante et certains auteurs n'hésitent pas à les qualifier de véritables « couteaux suisses » (Passardi *et al.*, 2005). Les POX s'expriment tout au long de la vie de la plante, de la germination à la sénescence, interviennent dans tous les processus physiologiques et participent à la réponse aux différents stress. Des études d'expression génique chez *Arabidopsis thaliana* et *Oriza sativa* ont montré une grande spécificité spatiale et temporelle dans leurs profils d'expression (Hiraga *et al.*, 2000; Valério *et al.*, 2004). Au vue de la diversité des rôles endossés par les POX chez les plantes, il ne sera pas fait, dans cette étude, un inventaire exhaustif. Par ailleurs, plusieurs auteurs ont déjà publié des revues bibliographiques sur le sujet (Welinder, 1992; Bolwell and Wojtaszek, 1997; Hiraga *et al.*, 2001; Bolwell *et al.*, 2002; Kawano, 2003; Passardi *et al.*, 2004a; Passardi *et al.*, 2004b; Passardi *et al.*, 2005). Nous nous intéresserons seulement à leurs fonctionnalités liées aux ERO.

Les POX III sont présentes sous la forme soluble dans l'apoplaste, ou liées de façon covalente ou ionique à la paroi cellulaire (Passardi *et al.*, 2005). Elles possèdent une ferriprotoporphyrine IX comme groupe prosthétique et deux résidus d'acides aminés très conservés au niveau du site catalytique. Ces enzymes catalysent la réduction d'un composé oxydé, en arrachant un électron à une grande variété de substrat allant des composés phénoliques aux précurseurs des lignines, en passant par l'auxine (Hiraga *et al.*, 2001). Cependant, leur rôle principal est de réduire l'H₂O₂ :



Paradoxalement, les POX possèdent également la capacité de générer des ERO (Kawano and Muto, 2000; Kawano, 2003; Liskay *et al.*, 2003; Passardi *et al.*, 2004b; Passardi *et al.*, 2005). Cette production d'ERO NAD(P)-dépendante intervient en particulier dans la réponse aux stress. Toutefois, dans la plupart des cas cette induction est transitoire. En effet, le profil d'induction des POX présente souvent une forte induction au début d'un évènement particulier (stress, initiation de la croissance cellulaire...) puis une diminution au cours du temps. Dans certains cas, comme les interactions plante-microorganismes, les POX de classe III sont considérées comme les sources principales d'H₂O₂ lors de la flambée oxydative (Bolwell and Wojtaszek, 1997; Bolwell *et al.*, 2002; Kawano, 2003; Passardi *et al.*,

2005). Elles seraient également impliquées dans la réponse oxydative à certains métaux lourds. Cependant leurs réponses varient considérablement d'une étude à l'autre, en fonction de l'espèce considérée, du métal utilisé, de la dose et de la durée du traitement.

2.2.3 Les oxalate-oxydases

Les oxalate-oxydases (OxO ; EC 1.2.3.4) sont une famille de protéines apparentées aux germines (Germin-like) se retrouvant aussi bien chez les Angiospermes que les Bryophytes et Gymnospermes (Bernier and Berna, 2001; Langebartels *et al.*, 2002). Cependant, les OxO sont présentes de façon bien plus importante chez les Monocotylédones. Ces protéines, très hétérologues entre elles, possèdent quelques caractéristiques communes comme d'être solubles dans l'eau, thermostables et résistantes aux protéases (Bolwell and Wojtaszek, 1997). Elles catalysent la conversion de l'oxalate en CO₂ et H₂O₂ :



Les OxO sont présentes en majorité à la surface des graines en formation, mais également dans l'apoplaste de tissus âgés de racines et de gaines vasculaires (Dumas *et al.*, 1995). La localisation bien spécifique des OxO dans l'organisme, laisse penser que ces enzymes participent à la mise en place de tissus définitifs en libérant du peroxyde d'hydrogène. Cette libération permet de « terminer » la croissance cellulaire en favorisant les liaisons covalentes entre les différents constituants pariétaux (Caliskan and Cuming, 1998; Lane, 2000). Elles pourraient également jouer un rôle dans la mort cellulaire programmée, induite dans les couches superficielles des graines, constituant ainsi une barrière protectrice entre la graine et les pathogènes (Lane, 2000).

En dehors de ces rôles physiologiques pour la plante, le rôle des OxO semble être principalement la défense contre les microorganismes. En effet, de nombreuses études ont mis en évidence une augmentation de l'activité OxO ou de la transcription des gènes codants pour ces protéines dans des plantes infectées par des microorganismes (Dumas *et al.*, 1995; Zhang and Collinge, 1995; Hurkman and Tanaka, 1996). Il apparaît logique que la plante possède des OxO apoplastiques, car de nombreux champignons, comme *Sclerotinia sclerotinium*, sécrètent de l'acide oxalique lorsqu'ils pénètrent dans les tissus végétaux. Cette sécrétion leur permet de séquestrer le calcium et d'acidifier les parois, ce qui facilite l'action des enzymes de dégradation fongiques (Bolwell and Wojtaszek, 1997). L'action des OxO permet alors de

ralentir la pénétration de ces champignons, mais également de générer de l'H₂O₂ toxique pour ces microorganismes.

Les OxO pourraient également participer à la réponse à l'auxine ou à des stress abiotiques comme certains métaux lourds (Berna and Bernier, 1999). Cependant, l'expression génique de l'OxO n'est pas régulée de la même manière pour tous les éléments traces métalliques (ETM). Le cadmium, le cuivre et le cobalt activent son expression contrairement au zinc ou au nickel (Berna and Bernier, 1999).

2.2.4 Les amine-oxydases

Les amine-oxydases (AO) sont des enzymes ubiquitaires catalysant la désamination oxydative d'une grande variété d'amines :



Les AO des plantes ne forment pas un groupe homogène, mais plutôt deux groupes distincts : les AO contenant du cuivre (CuAO) et les polyamine-oxydases contenant une flavine (PAO). Les CuAO (EC 1.4.3.6) sont des homodimères dont chaque sous-unité contient un ion cuivre et une 2,4,5-trihydroxyphenylalanine quinone (TPQ) servant de cofacteur (Cona *et al.*, 2006). Leurs substrats sont des diamines, essentiellement la putrescine et la cadavérine (Pietrangeli *et al.*, 2007). Les CuAO se retrouvent essentiellement chez les Dicotylédones, et en particulier chez les légumineuses (Federico and Angelini, 1991). Au niveau cellulaire, les CuAO sont généralement associés à la paroi.

Les PAO (EC 1.4.3.4) sont liées de façon non covalente à une molécule de FAD jouant le rôle de cofacteur (Cona *et al.*, 2006). Ces enzymes catalysent l'oxydation de polyamines comme la spermidine (triamine) ou la spermine (tetraamine). Elles sont exprimées essentiellement chez les Monocotylédones et se retrouvent localisées au niveau des parois cellulaires (Sebela *et al.*, 2001). Cependant, certaines PAO, comme la BPAO2 de l'orge, sont cytosoliques (Cervelli *et al.*, 2004).

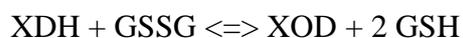
Les AO ne sont pas seulement un moyen de dégrader les amines cellulaires. Elles interviennent dans de nombreux processus physiologiques, en particulier dans la croissance et le développement (Cona *et al.*, 2006). Les CuAO et PAO sont régulées par des facteurs externes, comme la lumière, ou internes, comme certaines hormones, et participent aux modifications des structures membranaires et pariétales (Angelini *et al.*, 1990; Rea *et al.*, 1998; Laurenzi *et al.*, 2001; Cona *et al.*, 2005; Paschalidis and Roubelakis-Angelakis, 2005).

Certains auteurs ont trouvé une corrélation positive entre la lignification de la paroi, l'activité peroxydasique et l'activité des CuAO (Angelini *et al.*, 1990; Rea *et al.*, 1998). La présence de grande quantité de CuAO ou de PAO dans les trachéides en formation et les cellules de la coiffe racinaire suggère l'idée que les AO pourraient aussi jouer un rôle dans la mort cellulaire programmée (Moller and McPherson, 1998; Cona *et al.*, 2005).

Les AO interviennent de façon très importante dans les relations que les plantes vont entretenir avec les microorganismes symbiotiques ou pathogènes. De très nombreuses études ont porté sur ce sujet, et il apparaît que les AO sont fortement activées par la présence de ces microorganismes (voir pour revu Cona *et al.*, 2006). Contrairement aux stress biotiques, l'implication des AO lors de stress abiotiques a été peu étudiée. Un stress hydrique cause l'activation des CuAO (Aziz *et al.*, 1998) et des PAO (Aziz *et al.*, 1997). Ces enzymes sont aussi activées par un stress thermique (Roy and Ghosh, 1996), un stress halin (Xing *et al.*, 2007) ou métallique (Groppa *et al.*, 2007). Elles semblent par contre insensible à l'ozone (Langebartels *et al.*, 2002).

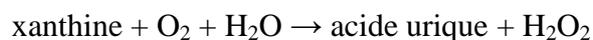
2.2.5 Les oxydases peroxysomales

En dehors de la glycolate-oxydase responsable de la libération d' H_2O_2 au cours de la photorespiration, les peroxysomes possèdent d'autres oxydases, qui sont autant de sources potentielles d'ERO. La plus importante est la xanthine-oxydase. Lorsque l'on s'intéresse à cette enzyme, il faut plutôt étudier le couple xanthine-oxydase (XOD ; EC 1.17.3.2)/ xanthine-déshydrogénase (XDH ; EC 1.17.1.4). Ces deux protéines sont codées par un même gène, utilisent les mêmes substrats et peuvent s'interconvertir (Chung *et al.*, 1997; Sauer *et al.*, 2002) :

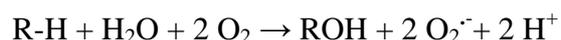


Ces deux enzymes d'environ 270 kD, localisées dans les peroxysomes des plantes, jouent un rôle majeur dans le catabolisme des purines (Corpas *et al.*, 1997). Elles catalysent principalement l'oxydation de l'hypoxanthine en xanthine et de la xanthine en acide urique. La XOD peut utiliser d'autres substrats comme d'autres purines, des ptérines et des aldéhydes (Corpas *et al.*, 1997; Corpas *et al.*, 2001; Nyathi and Baker, 2006). La différence entre les deux enzymes se situe au niveau des accepteurs d'électrons qu'elles utilisent, puisque la XDH

se sert du NAD alors que la XOD utilise le dioxygène. Cette différence est très importante, car l'activité de la XOD s'accompagne de la libération de peroxyde d'hydrogène :



Cependant, dans certaines conditions, la XOD peut également générer des anions superoxydes plutôt que du peroxyde d'hydrogène (Sandalio *et al.*, 1988) :

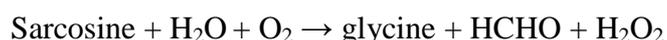
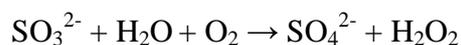


La XOD joue un rôle complexe dans le métabolisme oxydatif : d'une part, elle possède un aspect prooxydant en générant des ERO, et d'autre part, son activité génère de l'acide urique, un puissant antioxydant, ou permet la détoxication de certains aldéhydes cytotoxiques issus de la peroxydation lipidique, comme le 4-hydroxy-2-alkenal (Chung *et al.*, 1997). Chung et collaborateurs (1997) ont montré que la protéolyse et la présence d'ERO induisaient la formation d'une forme irréversible de XOD (ne pouvant plus s'interconvertir avec la XDH), favorisant ainsi la formation d'ERO.

En plus de la xanthine-oxydase, trois autres oxydases sont présentes dans le peroxysome. L'urate oxydase (EC 1.7.3.3) est fortement associée à la XOD puisqu'elle participe au métabolisme des purines en oxydant l'acide urique (Sandalio *et al.*, 1988; Corpas *et al.*, 1997) :



Bien que plus marginales, les sulfite- et sarcosine-oxydases (EC 1.8.3.1 et EC 1.5.3.1) participent à la production d'H₂O₂ du peroxysome, en oxydant leurs substrats respectifs (Eilers *et al.*, 2001; Goyer *et al.*, 2004; Hansch *et al.*, 2006) :



Plusieurs études ont démontré que la production d'ERO dans le peroxysome est induite par différents stress (Corpas *et al.*, 1991; Palma *et al.*, 1991; Romero-Puertas *et al.*, 1999). Cependant, il semble que la XOD et la CTE ne soient pas affectées par ces différents stress. La production d'ERO serait essentiellement une production primaire d'H₂O₂ (ne dérivant pas de la dismutation de l'O₂^{·-}), mais le mécanisme reste inconnu.

3 Les mécanismes antioxydants

Les plantes possèdent des mécanismes leur permettant de limiter la production d'ERO lors de leurs processus métaboliques. Certaines plantes se sont adaptées, au cours de l'évolution, à des conditions particulières du milieu, et ont développé des aptitudes métaboliques leur permettant de limiter la saturation des CTE. Citons par exemple les métabolismes C₄ et CAM des plantes grasses, la possibilité de mettre en dormance l'appareil photosynthétique lors des saisons sèches par des régulations post-transcriptionnelles ou encore des adaptations morphologiques des feuilles (Mittler *et al.*, 2001; Mittler, 2002).

Les plantes possèdent également de nombreux composés et enzymes leur permettant d'empêcher la production d'ERO ou de la contrôler.

3.1 Les oxydases alternatives (AOX)

La production d'ERO, au niveau des CTE des thylakoïdes et des mitochondries, peut être réduite par un groupe d'enzymes appelées oxydases alternatives (AOX). Ces enzymes membranaires dérivent le flux d'électrons pour réduire l'O₂ en H₂O par un mécanisme très efficace ne générant pas d'ERO (Maxwell *et al.*, 1999; Yoshida *et al.*, 2006). La présence de ces AOX réduit la production d'O₂⁻ au niveau des CTE en limitant la saturation de ces chaînes, mais aussi en diminuant la teneur en O₂ à proximité de celles-ci.

3.2 Les antioxydants

3.2.1 Définition

Peut être considérée comme antioxydante une molécule qui, étant présente en une faible concentration par rapport à celle d'un substrat oxydable, retarde ou empêche significativement l'oxydation de ce substrat (Halliwell and Whiteman, 2004).

3.2.2 Les principaux systèmes non enzymatiques

3.2.2.1 L'ascorbate ou vitamine C

L'acide L ascorbique (ASC) est un des principaux acides faibles de la cellule végétale. Aux pH physiologiques, il se dissocie en anion ascorbate. L'ascorbate est essentiellement utilisé au niveau cellulaire comme un donneur d'électrons. Le premier produit de la réaction

d'oxydation de l'ascorbate est le radical monodéhydroascorbate (MDHA ; Figure 9). Du fait de son électron libre très excentré, le MDHA n'est pas très réactif avec les autres molécules biologiques (Navas *et al.*, 1994). De plus, étant relativement instable, il se transforme spontanément en ASC et déhydroascorbate (DHA) à une vitesse comprise entre 10^5 et $2,8.10^6 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$ à pH 7 (Heber *et al.*, 1996). Le DHA est également une molécule instable et subit rapidement une hydrolyse conduisant à la formation d'acide 2,3-dikétogulonique (DKG ; Deutsch, 1997, 2000).

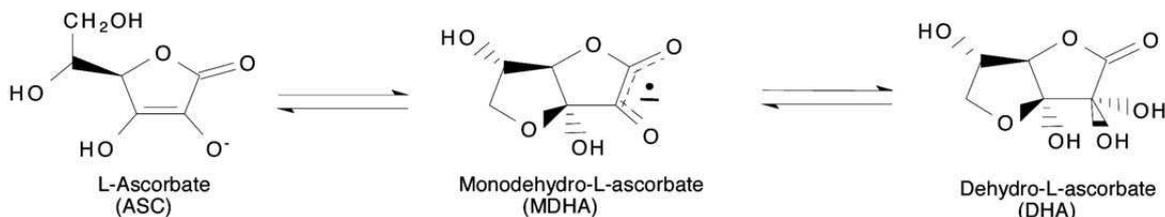


Figure 9 : Formes redox de l'ascorbate (d'après Potters *et al.*, 2002).

L'ascorbate est présent dans tous les compartiments cellulaires, ainsi que dans la matrice extracellulaire. Contrairement aux cellules animales, la concentration en ASC est très élevée dans les cellules végétales (plusieurs millimolaires) ce qui en fait un composant incontournable chez les plantes. Il interviendrait notamment dans la régulation du cycle cellulaire et dans l'extension de la paroi (Horemans *et al.*, 2000). L'ascorbate est toutefois beaucoup plus connu pour ses propriétés antioxydantes (Navas *et al.*, 1994; Mehlhorn *et al.*, 1996; Horemans *et al.*, 2000; Turcsanyi *et al.*, 2000; Potters *et al.*, 2002; Pignocchi and Foyer, 2003; Chen and Gallie, 2004; Foyer and Noctor, 2005a). En effet, il réagit rapidement avec l'anion superoxyde et l'oxygène singulet, ou encore avec le peroxyde d'hydrogène, mais cette dernière réaction est catalysée par l'ascorbate peroxydase (APX). L'ascorbate est indispensable par sa capacité à réduire d'autres antioxydants oxydés comme la vitamine E ou les caroténoïdes (Asada, 1994).

3.2.2.2 Le glutathion

Le glutathion est un thiol très abondant se retrouvant de façon ubiquitaire chez les plantes, les animaux et les végétaux. Il possède deux formes redox distinctes. La forme réduite (GSH) est un tripeptide (γ -Glu-Cys-Gly), stable, à fort pouvoir réducteur (Tableau 2) et très soluble dans l'eau. Toutes ces caractéristiques en font un donneur d'électrons adéquat dans les réactions physiologiques. L'oxydation du glutathion entraîne la formation d'un pont

disulfure entre les cystéines de deux GSH. Cette forme oxydée du glutathion est appelée GSSG (Figure 10). En conditions non stressantes, les cellules maintiennent un ratio GSH/GSSG très important, supérieur à 100 dans le cytosol et la mitochondrie (May *et al.*, 1998; Noctor *et al.*, 1998).

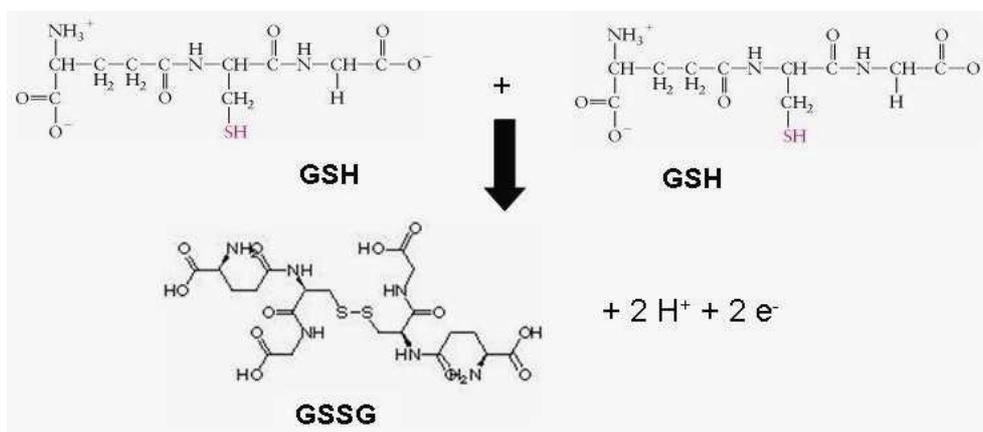
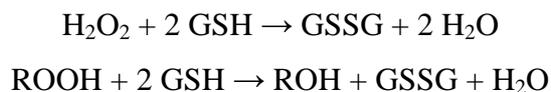


Figure 10 : Oxydation de deux molécules de GSH conduisant à l'établissement d'un pont disulfure et la formation de GSSG.

La concentration en GSH est très importante dans les cellules végétales, et en particulier dans les chloroplastes où elle peut atteindre 5 mM (Noctor *et al.*, 1998). Le glutathion joue de nombreux rôles physiologiques chez les végétaux (May *et al.*, 1998; Noctor *et al.*, 1998). Il représente une forme importante de stockage de sulfure réduit, et participe à l'allocation en sulfure des différents compartiments cellulaires et des différents organes (Herschbach and Rennenberg, 1991; Lappartient and Touraine, 1996). C'est également un régulateur de l'expression génique (Wingate *et al.*, 1988; Baier and Dietz, 1997) et le précurseur des phytochélatines (PC) jouant un rôle prédominant dans la séquestration des métaux chez les végétaux (Grill *et al.*, 1989; Clemens, 2006b; Clemens, 2006a). Le GSH sert également de substrat pour la glutathion S-transférase (GST) qui catalyse sa conjugaison avec des xénobiotiques, participant ainsi à leur détoxification (Marrs, 1996). Il est impliqué dans la régulation redox du cycle cellulaire (Gyuris *et al.*, 1993; Noctor *et al.*, 1998).

Du fait de sa forte concentration dans les tissus végétaux et de son fort pouvoir réducteur, le GSH participe au statut redox cellulaire en jouant le rôle de tampon redox dans les cellules (Noctor *et al.*, 1998; Foyer and Noctor, 2000; Foyer *et al.*, 2001; Foyer and Noctor, 2003; Foyer and Noctor, 2005b, a; Noctor, 2006). La synthèse de GSH est stimulée lors des différentes situations de stress et son accumulation est souvent concomitante avec celle des ERO (May *et al.*, 1998; Noctor *et al.*, 1998; Potters *et al.*, 2002). Le GSH peut

directement réduire l' H_2O_2 mais également d'autres ERO, des hydroperoxydes organiques et des peroxydes lipidiques :



Un autre rôle important du GSH dans la régulation des ERO est son implication dans la régénération de l'ascorbate via le cycle enzymatique dit ascorbate/glutathion ou Asada-Halliwell-Foyer (cf. 3.2.3.3).

3.2.2.3 La vitamine E

Le terme de vitamine E désigne un groupe de composés lipophiles possédant l'activité biologique de l' α -tocophérol. Ce groupe comprend les α -, β -, γ -, et δ -tocophérols et les α -, β -, γ -, et δ -tocotrienols. Des huit molécules composant le groupe de la vitamine E, l' α -tocophérol possède la plus grande activité biologique (Weiser and Vecchi, 1982). Au niveau cellulaire, ces molécules sont associées aux différentes membranes biologiques.

La vitamine E, comme la vitamine C, est un antioxydant très efficace du fait de sa faible propension à être un donneur d'électrons. Elle agit principalement par le transfert direct d'atomes d'hydrogène (Njus and Kelley, 1991). Cet antioxydant est considéré comme étant le plus important chez les animaux et les humains (Bramley *et al.*, 2000), mais son rôle chez les plantes a été beaucoup moins étudié. Toutefois, l' α -tocophérol est un piègeur d'oxygène singulet et de radical hydroxyle (Krieger-Liszkay and Trebst, 2006). Sa localisation, au niveau des membranes, en fait l'antioxydant le plus important dans la prévention de la peroxydation des lipides membranaires (Fryer, 1992). Par ailleurs, il peut réduire les peroxydes lipidiques et bloquer la réaction en chaîne de peroxydation lipidique s'initiant après la peroxydation d'acides gras polyinsaturés (Collin *et al.*, 2008 ; cf. 4.2.2.2). La vitamine E est donc un antioxydant clé dans la protection de l'intégrité des membranes, en particulier celles des chloroplastes. Il protège également les pigments photosynthétiques, participant ainsi à la protection de l'appareil photosynthétique (Fryer, 1992).

L'utilisation de plantes mutantes ne possédant pas de vitamine E, a conduit à des résultats surprenants. En effet, ces plantes ne montraient pas un phénotype significativement différent de celui des plantes témoins, et surtout n'étaient pas plus sensibles que ces dernières à un stress lumineux (Havaux *et al.*, 2005). Ces résultats s'expliquent par un phénomène de protection croisée entre les caroténoïdes et la vitamine E, les uns compensant l'absence de

l'autre (Havaux *et al.*, 2005). Cependant, les mutants déficients en vitamine E sont particulièrement sensibles aux métaux lourds, ce qui laisse penser à un mécanisme complexe de protection des cellules par cet antioxydant (Collin *et al.*, 2008). En effet, l'absence de vitamine E peut être compensée, au niveau des chloroplastes, pour éviter la production d'ERO au niveau de la CTE. A contrario, cela ne semble pas être le cas lorsque la génération d'ERO se situe vraisemblablement à un autre endroit de la cellule.

3.2.2.4 Les caroténoïdes

Les caroténoïdes sont des pigments végétaux lipophiles formant une famille de plus de 600 molécules. Ils jouent le rôle de pigments accessoires de l'antenne collectrice des photosystèmes. En dehors de cette implication dans le processus photosynthétique, les caroténoïdes associés au PSII ou à l'antenne collectrice, participent à la protection de l'appareil photosynthétique contre les ERO (Asada, 1994; Miller *et al.*, 1996). En effet, ces pigments possèdent la capacité de capter l'énergie de la chlorophylle triplet ou de l'oxygène singulet (Telfer *et al.*, 1994; Mozzo *et al.*, 2008), ce qui les convertit en état triplet. La capacité de transfert d'énergie des caroténoïdes vers le dioxygène étant faible, ces pigments retrouvent leurs états initiaux en perdant leurs énergies sous forme de chaleur. Le mécanisme captage d'énergie/perte d'énergie par chaleur peut également directement s'effectuer à partir de la chlorophylle singulet (Demmig-Adams and Adams, 1996).

3.2.3 Les principales enzymes antioxydantes

En sus des différentes molécules antioxydantes, les cellules végétales possèdent de nombreuses voies de dégradation enzymatique des ERO. Certaines enzymes n'utilisent pas de co-substrat pour réduire les ERO. Au contraire, d'autres utilisent plusieurs co-substrats dont certains antioxydants que nous venons de voir (ASC, GSH). L'ensemble de ces voies est résumé dans la Figure 11 et les détails de celles-ci sont donnés dans les paragraphes suivants.

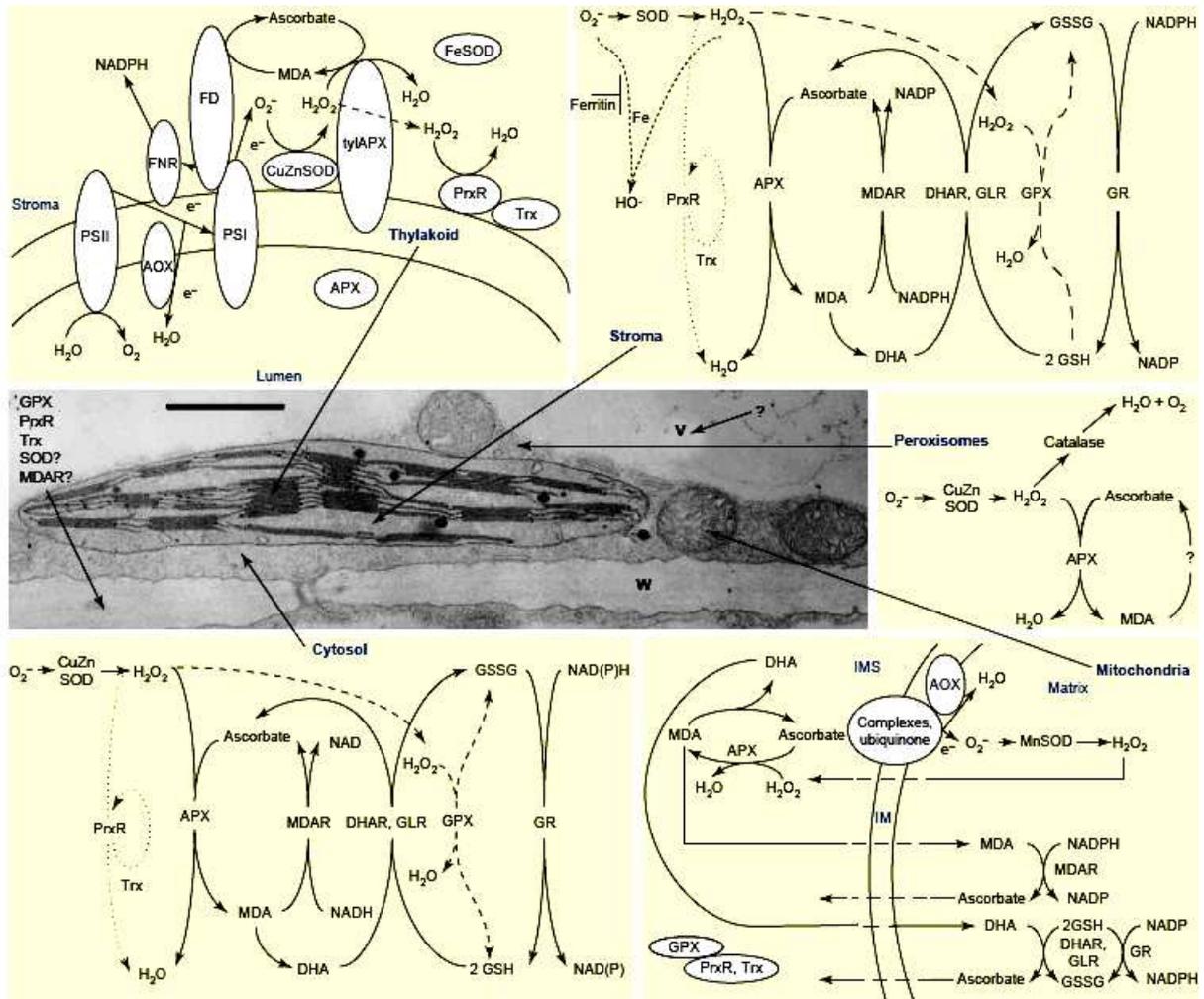
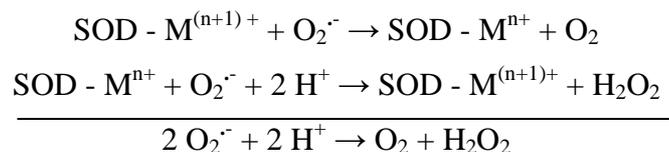


Figure 11 : Représentation de la localisation des différentes voies enzymatiques de détoxication des ERO au niveau d'une cellule végétale (d'après Mittler *et al.*, 2004).

3.2.3.1 Les superoxyde dismutases (SOD)

Les superoxyde dismutases (EC 1.15.1.1) sont des métallo-enzymes se retrouvant dans l'ensemble du monde du vivant, mis à part dans quelques microorganismes (Alscher *et al.*, 2002). Les plantes possèdent trois types de SOD contenant des groupements prosthétiques renfermant des métaux différents : du fer (FeSOD), du manganèse (MnSOD) ou du cuivre et du zinc (CuZnSOD). Toutes catalysent la dismutation de deux anions superoxydes en dioxygène et peroxyde d'hydrogène (Bowler *et al.*, 1994; Arora *et al.*, 2002) :

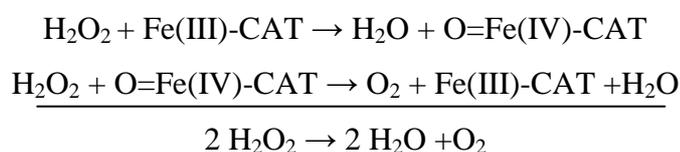


avec M = Cu (n=1) ; Mn (n=2) ; Fe (n=2).

Au niveau cellulaire, les SOD se retrouvent à proximité des sites de production d'O₂⁻. Les MnSOD sont localisées principalement dans la matrice de la mitochondrie (Bowler *et al.*, 1994; del Rio *et al.*, 2003), dans la matrice des glyoxysomes ou liées à la membrane des peroxysomes des cellules foliaires (Sandalio and Del Rio, 1988; Hernandez *et al.*, 1999; del Rio *et al.*, 2003; Rodriguez-Serrano *et al.*, 2007). Les FeSOD se situent essentiellement dans le stroma des chloroplastes (Salin, 1988; Bowler *et al.*, 1994; Asada, 2000) et chez quelques espèces particulières, dans les matrices des peroxysomes et des mitochondries (Salin, 1988; Droillard and Paulin, 1990), ou dans la fraction cytosolique des racines nodulées (Becana *et al.*, 1989; Moran *et al.*, 2003). Les CuZnSOD se retrouvent essentiellement sous forme libre dans le cytosol (Duke and Salin, 1983; Bowler *et al.*, 1994), dans les peroxysomes ou l'apoplaste (Ogawa *et al.*, 1996; Sandalio *et al.*, 1997; Corpas *et al.*, 1998). Il existe, toutefois, une CuZnSOD liée à la membrane du thylakoïde au niveau du PSI, directement au contact des anions superoxydes produits par la CTE chloroplastique (Salin, 1988; Bowler *et al.*, 1994; Ogawa *et al.*, 1995).

3.2.3.2 Les catalases (CAT)

Les catalases (EC 1.11.1.6) sont des enzymes majoritairement peroxysomales catalysant la dismutation du peroxyde d'hydrogène (Arora *et al.*, 2002). Elles sont formées de quatre chaînes polypeptidiques d'environ 500 acides aminés, comportant chacune un groupe hémique comprenant un atome de fer. Pour catalyser la réaction, l'atome de fer réalise une coupure hétérolytique de la liaison O-O du peroxyde d'hydrogène, créant de ce fait une molécule d'eau et un groupement Fe(IV)=O hautement oxydant. Ce dernier peut ensuite oxyder une autre molécule de peroxyde d'hydrogène pour donner du dioxygène et de l'eau :



Du fait de sa localisation et de sa faible affinité pour l'H₂O₂ le rôle principal de la CAT est de détoxiquer le peroxyde d'hydrogène produit à proximité par la CTE chloroplastique, et surtout par les processus peroxysomaux de β-oxydation et de photorespiration (Smirnoff, 1998). Bien qu'elle ait été longtemps considérée comme une des enzymes antioxydantes les plus importantes, il semble désormais que son importance dans la détoxification de l'H₂O₂ soit réduite, en dehors de celui issu du métabolisme peroxysomal (Arora *et al.*, 2002; Blokhina *et*

al., 2003; Foyer and Noctor, 2005a, b; Halliwell, 2006; Pitzschke *et al.*, 2006). Les peroxydases et peroxyredoxines sont maintenant considérées comme les enzymes clés de la détoxification de cet ERO chez les plantes. La CAT ne serait qu'un « dévidoir » permettant de limiter les productions excessives d'ERO (Willekens *et al.*, 1997). Cependant, cette vision pourrait être en partie erronée, puisque, bien que les résultats soient souvent contradictoires dans la littérature, l'activité catalasique est souvent affectée négativement lors de stress.

3.2.3.3 Les enzymes du cycle Asada-Halliwell-Foyer

Le cycle Asada-Halliwell-Foyer est un cycle composé de quatre enzymes conduisant, par des réactions d'oxydoréduction successives, à la réduction de l' H_2O_2 par l'ascorbate peroxydase (APX) via l'oxydation d'ascorbate, et la régénération du pool d'ascorbate (Figure 12).

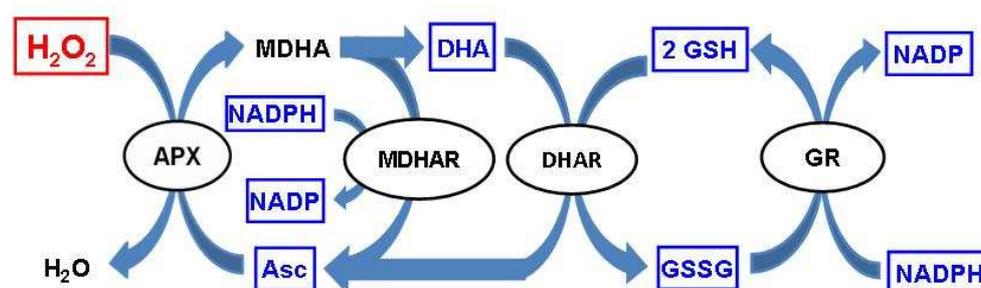


Figure 12 : Cycle Asada-Halliwell-Foyer.

L'APX (EC 1.11.1.11), peroxydase de classe I, est une métallo-enzyme contenant un groupe ferriprotoporphyrine IX. Elle est présente dans tous les compartiments cellulaires, dans le cytosol et dans l'apoplaste, sous forme soluble ou liée aux membranes (Asada, 1999; Foyer and Noctor, 2000; Mittler, 2002; Asada, 2006). L'APX catalyse la réduction du peroxyde d'hydrogène en utilisant l'ascorbate comme co-substrat. Le MDHA issu de cette réaction peut ensuite être pris en charge par la monodéhydroascorbate réductase (MDHAR ; EC 1.6.5.4) catalysant sa réduction en ASC en utilisant du NAD(P)H :

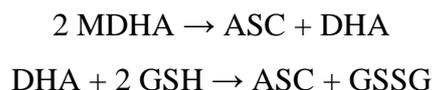


Néanmoins, la situation est un peu plus compliquée, puisque le MDHA est aussi un accepteur d'électrons pouvant être réduit directement par dérivation des électrons de la CTE

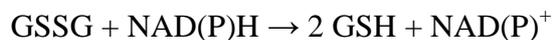
chloroplastique (Miyake and Asada, 1994). Le MDHA rentre en compétition avec le NADP^+ pour accepter l'électron libéré par la ferrédoxine au niveau du PSI (Figure 11) :



Comme nous l'avons vu précédemment, le MDHA est une molécule instable se dismutant en ASC et déhydroascorbate (DHA). La deuxième enzyme intervenant dans la régénération de l'ascorbate, la déhydroascorbate réductase (DHAR ; EC 1.8.5.1), catalyse la réduction du DHA en ASC, via l'oxydation de deux molécules de GSH :



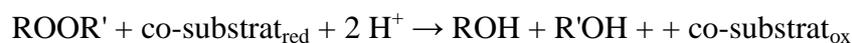
La dernière réaction de ce cycle est la réduction du GSSG par une flavoprotéine, la glutathion réductase (GR ; EC 1.8.1.7), utilisant pour cela du NAD(P)H comme cofacteur :



L'ensemble des enzymes de ce cycle se retrouvent sous forme soluble dans le stroma du chloroplaste, dans les mitochondries ou dans le cytosol (Low and Merida, 1996; Bartosz, 1997; Sies, 1997; Wojtaszek, 1997; Inze and Montagu, 2001; Arora *et al.*, 2002; Langebartels *et al.*, 2002). Ces différentes enzymes, à l'exception d'une MDHAR liée à la membrane plasmique, semblent absentes de l'apoplaste, zone où, pourtant, la quantité d'ERO produite est importante (Horemans *et al.*, 2000; Potters *et al.*, 2002; Pignocchi and Foyer, 2003). A notre connaissance, une seule étude effectuée sur des feuilles de pruniers infectés par un virus, fait état de la présence d'APX dans l'apoplaste (Diaz-Vivancos *et al.*, 2006).

3.2.3.4 Les peroxydases (POX)

Les POX (EC 1.11.1.x) sont une large famille multigénique d'enzymes hémiques catalysant la réduction d'un substrat oxydé en utilisant de nombreux co-substrats comme donneurs d'électrons. Pour la majorité de ces enzymes, le substrat optimal est le peroxyde d'hydrogène, mais elles peuvent facilement réduire des hydroperoxydes organiques ou des peroxydes lipidiques :



Dans certaines conditions, une partie des POX (classe I et III) peut avoir une activité similaire à la catalase (catalase-like), c'est-à-dire qu'elles possèdent la capacité de réduire l' H_2O_2 en absence de co-substrat (Mika *et al.*, 2004).

Au niveau cellulaire, la répartition des POX est très nette. Les POX de classe III se trouvent dans l'apoplaste sous forme soluble ou liées aux parois et membranes. Les POX de classe I, dont l'APX est la représentante majoritaire, sont présentes uniquement à l'intérieur des cellules.

3.2.3.5 Les peroxyredoxines

Les peroxyredoxines (PRX), aussi appelées thiorédoxines peroxydases, sont des peroxydases non hémiques contenant un résidu cystéine au niveau de leur site catalytique. Elles possèdent généralement les mêmes capacités peroxydasiques que les POX, mais avec une efficacité moindre (Navrot *et al.*, 2006). La réduction du substrat s'effectue par oxydation du groupement thiol (-SH) de la cystéine en acide sulfénique (-SOH). La réduction de l'acide sulfénique est due à l'oxydation de co-substrats tels que les thioredoxines, glutaredoxines et cyclophilines (Dietz *et al.*, 2006; Dietz, 2007).

Découvertes il y a à peine plus de dix ans, les PRX apparaissent désormais comme des éléments essentiels du système de détoxification des ERO dans cellules végétales (Rouhier and Jacquot, 2002; Dietz *et al.*, 2006; Pena-Ahumada *et al.*, 2006; Dietz, 2007). Présentes en quantité importante dans tous les compartiments cellulaires, y compris dans le noyau, les PRX semblent être avec les APX, les enzymes les plus importantes dans la réduction de l' H_2O_2 (Rouhier and Jacquot, 2002; Dietz *et al.*, 2006; Dietz, 2007). Par ailleurs, elles agissent de façon totalement indépendante par rapport au cycle Asada-Halliwell-Foyer (Dietz *et al.*, 2006).

Les glutathion peroxydases (GPX) sont éloignées phylogénétiquement ces enzymes, mais sont fonctionnellement des PRX (Navrot *et al.*, 2006). En effet, contrairement à leurs homologues animales, les GPX végétales ne possèdent plus de groupement prosthétique sélénium-cystéine dans leur site catalytique, mais seulement un résidu cystéine (Navrot *et al.*, 2006). Bien que les GPX possèdent encore la capacité d'utiliser le GSH pour réduire l' H_2O_2 , des peroxydes lipidiques ou des hydroperoxydes organiques (Ursini *et al.*, 1995; Mullineaux *et al.*, 1998), elles utilisent de façon préférentielle et plus efficace les thioredoxines comme substrat (Navrot *et al.*, 2006). Certaines GPX végétales sont même incapables d'utiliser le GSH.

4 Les ERO : Dr Jekyll et Mr Hyde cellulaires ?

L'oxygène est indispensable à la vie des cellules aérobies. Cependant, les espèces réactives de l'oxygène générées par le métabolisme oxydatif sont aussi considérées comme un poison de l'organisme. En effet, les ERO sont impliquées dans de nombreux dysfonctionnements des organismes, et en particulier dans de nombreuses pathologies humaines. Elles sont également, en partie, responsables du vieillissement cellulaire.

Les ERO ont longtemps été seulement considérées comme des déchets du métabolisme oxydatif. Toutefois, les cellules possèdent de nombreuses enzymes capables de générer des ERO. Au vu des effets néfastes de ces ERO et du coût énergétique pour la cellule qu'impose leur détoxification, quelles raisons peuvent expliquer la présence de nombreux systèmes de production d'ERO ? Si la lutte contre les pathogènes est une explication, elle ne suffit pas à justifier la redondance de ces systèmes enzymatiques. Les ERO semblent donc nécessaires à la vie des cellules aérobies.

Le système antioxydant des plantes est également largement redondant. Des études utilisant des mutants n'exprimant pas ou surexprimant des molécules ou des enzymes antioxydantes n'ont pas donné les résultats attendus. Les plantes déficientes ne se sont pas forcément montrées plus sensibles à des stress, et les plantes surexprimant des antioxydants se sont révélées n'être pas moins, voire plus sensibles, à des stress que les plantes témoins (Smirnoff, 1998; Foyer and Noctor, 2000; Arora *et al.*, 2002; Edreva, 2005). Ces résultats mettent en évidence le fait que la régulation de la production d'ERO par les systèmes antioxydants est beaucoup plus complexe et plus fine que l'on ne le pensait. Cette régulation permet la transduction de signaux de stress dans la cellule. La production d'ERO apparaît donc, désormais, comme un évènement aussi indispensable à la vie cellulaire que potentiellement néfaste lorsqu'il est excessif.

4.1 Importance physiologique des ERO et signalisation oxydative

4.1.1 Rôles physiologiques

Contrairement aux cellules animales, les cellules végétales génèrent de façon continue des ERO. En dehors des mitochondries, chloroplastes et peroxysomes, des quantités importantes d'ERO (en grande partie de l' H_2O_2) sont produites au niveau des parois. Cette libération localisée d' H_2O_2 répond à deux rôles contradictoires. D'une part, elle contribue à un relâchement des molécules composant la paroi permettant la croissance cellulaire (Laloi *et al.*,

2004; Passardi *et al.*, 2004b). D'autre part, le peroxyde d'hydrogène, en oxydant les différents composants pariétaux, induit la formation de liaisons transversales entre ces composants. Ces liaisons limitent l'élongation cellulaire en favorisant la rigidification pariétale (Laloi *et al.*, 2004; Passardi *et al.*, 2004b). La rigidification de la paroi secondaire, accentuée par la présence d'H₂O₂, participe à la synthèse de lignine (Wojtaszek, 1997; Passardi *et al.*, 2004b).

Les ERO participent également à des processus physiologiques comme la fermeture des stomates (Pei *et al.*, 2000), le gravitropisme (Joo *et al.*, 2001), la subérisation des cellules épidermiques (Bernards *et al.*, 1999; Keren-Keiserman *et al.*, 2004), ou encore la régulation des canaux calciques et potassiques (Demidchik *et al.*, 2003).

Les organismes végétaux ne contiennent pas de systèmes immunitaires, c'est-à-dire des cellules spécialisées dans la lutte contre les divers microorganismes pathogènes. Chaque cellule végétale est capable de se défendre par ses propres moyens contre ces microorganismes. Cette réponse cellulaire est l'aspect le plus connu du rôle des ERO chez les plantes. En effet, au contact de certains champignons ou bactéries, différentes enzymes apoplastiques ou membranaires produisent une flambée oxydative (Levine *et al.*, 1994; Low and Merida, 1996; Bartosz, 1997; Wojtaszek, 1997; Langebartels *et al.*, 2002). Cette flambée contribue à détruire une partie des microorganismes et entraîne toute une série de mécanismes de signalisation permettant à la plante de mettre en place des systèmes de défense.

4.1.2 Signalisation oxydative

Foyer et Noctor (2005a) ont proposé de réévaluer le concept de stress oxydatif en distinguant la signalisation oxydative du stress oxydatif. En effet, la flambée oxydative induite par différents stress modifie le statut redox cellulaire. Depuis plusieurs années, la régulation redox des processus physiologiques apparaît comme étant aussi importante que la régulation par phosphorylation/déphosphorylation (Foyer *et al.*, 2001; Arora *et al.*, 2002; Pastori and Foyer, 2002; Vranova *et al.*, 2002; Pignocchi and Foyer, 2003; Foyer and Noctor, 2005a, b; Meyer and Hell, 2005; Fedoroff, 2006; Noctor, 2006; Foyer, 2007). Cette régulation directe par les ERO, ou indirecte par les couples redox, est le fait de l'oxydation ou de la réduction de groupements sensibles au statut redox, au niveau des protéines, et notamment les groupements sulfhydryles de la cystéine et de la méthionine (Meyer and Hell, 2005). Ce mécanisme de réduction/oxydation agit comme un « interrupteur » de l'activité de nombreuses enzymes intervenant notamment dans les événements de signalisation (protéines kinases) et dans le contrôle du cycle cellulaire.

Les ERO et le statut redox participent ainsi, par l'intermédiaire de cette régulation redox ou par d'autres mécanismes, à l'activation de nombreuses cascades de transduction du signal (protéines kinases, signalisation calcique). Le statut redox est considéré comme un véritable senseur de l'état physiologique de la cellule, toute flambée oxydative étant la conséquence indirecte d'un stress. La redondance des systèmes de production d'ERO et des systèmes de détoxification permet une régulation fine du signal transmis et une réponse appropriée de la cellule. Ainsi, même s'il existe des mécanismes de réponses communs, il apparaît que les voies de signalisation ne sont pas régulées de la même façon en fonction du type de stress. En effet, les cellules ne répondent pas d'une façon identique à un stress biotique ou abiotique. Les mécanismes de régulation différentiels sont toutefois très complexes, et il existe de nombreuses interconnexions entre les différentes voies de signalisation.

4.2 Le stress oxydatif

4.2.1 Définition

Le stress oxydatif (ou oxydant) a été défini par Sies (1997) comme une perturbation de la balance entre les prooxydants et les antioxydants, en faveur des premiers, conduisant à des dommages potentiels (Figure 13). Le stress oxydatif est la conséquence de :

- la diminution du niveau des antioxydants et/ou
- l'augmentation de la production d'ERO

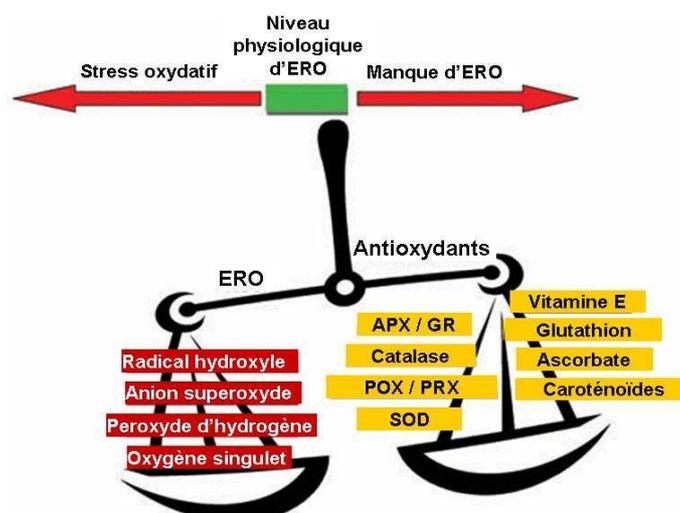


Figure 13 : Schématisation de la balance entre les ERO et les antioxydants.

4.2.2 Conséquences

Lorsque la quantité d'ERO générée dépasse les capacités antioxydantes de l'organisme, la toxicité des ERO s'exprime par de nombreux aspects, et en particulier par la perturbation de nombreux processus physiologiques comme la photosynthèse (Sies, 1997; Smirnoff, 1998; Dat *et al.*, 2000; Inze and Montagu, 2001; Arora *et al.*, 2002; Langebartels *et al.*, 2002). Cette toxicité s'explique par la réactivité des ERO, en particulier celle de l' $\cdot\text{OH}$, envers les macromolécules biologiques.

4.2.2.1 Altérations de la structure des protéines

Les protéines sont particulièrement sensibles à l'action des ERO. Plusieurs mécanismes directs ou indirects de modifications sont connus (Stadtman and Levine, 2000; Favier, 2003). Les protéines les plus touchées sont celles comportant un groupement sulphydryle (-SH), comme c'est le cas pour de nombreuses enzymes et protéines de transport (Stadtman and Levine, 2000). Le peroxyde d'hydrogène, mais surtout le radical hydroxyle sont capables d'oxyder ces groupements, conduisant à l'inactivation de certaines enzymes. En particulier, la présence de radicaux hydroxyles est à l'origine de dégradations irréversibles des protéines, par la formation de groupements carbonyles sur la chaîne latérale de certains acides aminés. Ainsi, l'histidine, l'arginine, la lysine ou encore la proline sont des cibles privilégiées de ce processus d'altération oxydative (Stadtman and Levine, 2000; Wong *et al.*, 2008). De nombreux autres acides aminés sont également susceptibles d'être oxydés par les ERO (Figure 14).

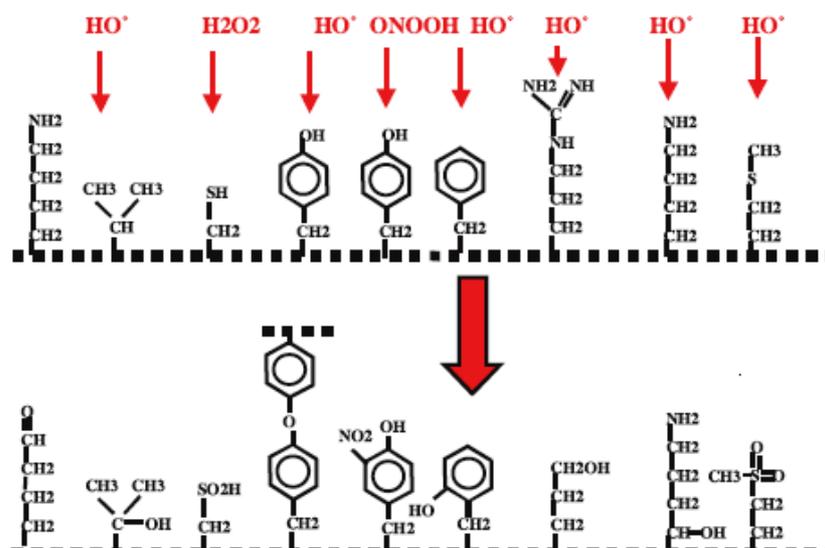


Figure 14 : Nature de quelques modifications des chaînes latérales d'acides aminés des protéines après attaque radicalaire (d'après Favier, 2003).

Le stress oxydatif induit des cassures, ou conduit à la formation de réticulation, avec notamment la formation de ponts bi-tyrosine (Fraisie, 1993). Les protéines oxydées perdent leurs propriétés biologiques, et sont beaucoup plus sensibles à l'action des protéases (Stadtman and Levine, 2000). L'anion superoxyde a également la capacité de réagir avec les centres Fer-Soufre de certaines protéines, entraînant le relargage de fer dans le milieu. Cette action a une double conséquence, puisqu'elle induit l'inactivation de la protéine hémiqme ainsi que la formation potentielle de nouveaux radicaux hydroxyles, via la réaction d'Haber-Weiss. Enfin, les ERO induisent des modifications indirectes des protéines via la formation d'adduits par des aldéhydes dérivant de la peroxydation des lipides (Lynch *et al.*, 2001).

4.2.2.2 Altération de la structure des lipides

Les lipides, et principalement les acides gras polyinsaturés (AGPI) membranaires, sont la cible privilégiée des ERO. La peroxydation lipidique induite par les ERO a une importance physiologique considérable, car une fois initiée, elle perdure un certain temps après la fin de la flambée oxydative (Cillard and Cillard, 2006). Ce phénomène est la conséquence de la capacité des AGPI oxydés à s'autooxyder (Figure 15). La peroxydation lipidique des AGPI se subdivise en trois phases : initiation, propagation et terminaison (Spiteller, 1998). La phase d'initiation est le résultat de l'attaque d'un AGPI (LH dans la Figure 15), par un radical (X^{\cdot}), conduisant à la formation d'un radical lipidique (L^{\cdot}). Dans le cas des ERO, l'initiation est essentiellement due au radical hydroxyle (Figure 15.1). La propagation de la peroxydation lipidique commence par la formation au contact de l'oxygène d'un radical lipoperhydroxyle (LOO^{\cdot} ; Figure 15.2). Ce radical réagit avec un autre LH, et engendre la formation d'un hydroperoxyde lipidique (LOOH) et d'un nouveau radical lipidique, assurant ainsi la propagation du processus (Figure 15.3). Les formes ionisées des métaux de transition participent activement à cette phase de propagation en permettant la formation d'un radical alkoyle (LOO^{\cdot} ; Figure 15.4). Ce radical LOO^{\cdot} entretient le cycle d'autoperoxydation en réagissant avec un LH pour former un nouveau radical lipidique (Figure 15.5). Les hydroperoxydes peuvent également se décomposer par scission homolytique de la liaison O-O pour former un radical alcoyle et un radical hydroxyle propageant la réaction en chaîne (Spiteller, 1998).

Les autres ERO participent à cette peroxydation lipidique. L'oxygène singulet réagit directement avec les AGPI pour former un LOO^{\cdot} . L'anion superoxyde agit indirectement en

réduisant les métaux de transition qui participent au cycle d'autooxydation ou à la formation de radical hydroxyle, via la réaction d'Haber-Weiss (en présence de peroxyde d'hydrogène).

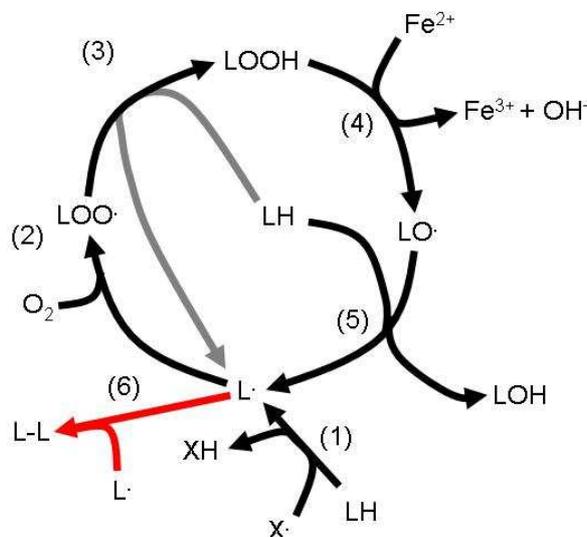


Figure 15 : Schématisation du cycle d'autooxydation d'un AGPI (LH).

La terminaison de ce cycle est effective lorsque deux formes lipidiques radicalaires réagissent ensemble pour former deux composés stables (par exemple: $L\cdot + L\cdot \rightarrow L-L$; $LO\cdot + L\cdot \rightarrow LOL$; Figure 15.6). Cette phase ne survient qu'après un certain temps, car la probabilité de rencontre entre deux radicaux libres est beaucoup plus faible que celle entre un radical lipidique et un AGPI (leurs concentrations étant de beaucoup supérieures). Ce phénomène explique le fait que chaque $L\cdot$ puisse être à l'origine d'une centaine de molécules d'hydroperoxydes lipidiques (Halliwell, 1992). Les organismes aérobies possèdent des mécanismes pour interrompre cette chaîne, avec notamment des « casseurs de chaînes » comme les tocophérols qui piègent les radicaux lipidiques, ou les glutathion peroxydases (Cillard and Cillard, 2006).

La production d'hydroperoxydes lipidiques est également due à l'action enzymatique des lipoxygénases (LOX)(Brash, 1999; Blee, 2002; Liavonchanka and Feussner, 2006). Les LOX catalysent l'insertion d'une molécule d'oxygène en 9^{ème} et 13^{ème} position sur les AGPI libres 18:2 (acide linoléique) et 18:3 (acide linoléique), et forment des hydroperoxydes lipidiques. Lors d'un stress, la part de cette production enzymatique dans la production totale d'hydroperoxydes est très importante. Dans le cas de la réaction hypersensible, elle peut atteindre 30 à 50 % (Montillet *et al.*, 2005). Ces LOOH sont ensuite métabolisés par plusieurs cascades enzymatiques, en une vaste classe de composés métaboliques secondaires, appelés

oxylipines (Figure 16)(Blee, 2002; Creelman and Mulpuri, 2002; Howe and Schillmiller, 2002; Chehab *et al.*, 2007). Ces oxylipines ont une importance physiologique considérable, puisque de nombreuses molécules, telles que l'acide jasmonique ou le malondialdéhyde (MDA), participent à la régulation de processus physiologiques (Blechert *et al.*, 1995; Kramell *et al.*, 2000; Blee, 2002; Almeras *et al.*, 2003; Farmer *et al.*, 2003; Weber *et al.*, 2004). Les deux voies de peroxydation (enzymatique ou non) conduisent à la formation de nombreux aldéhydes (Mueller, 2004) comme le MDA ou le 4-Hydroxynonéal (4HNE) interagissant avec les macromolécules, et en particulier l'ADN.

La peroxydation lipidique, si elle est importante, perturbe la fluidité membranaire, rend la membrane plus perméable, modifiant ainsi les homéostasies chimiques et redox cellulaires. L'altération des membranes thylakoïdales et chloroplastiques entraîne des perturbations au niveau des CTE, conduisant à une augmentation de la production d'ERO dans ces zones et amplifiant ainsi le phénomène.

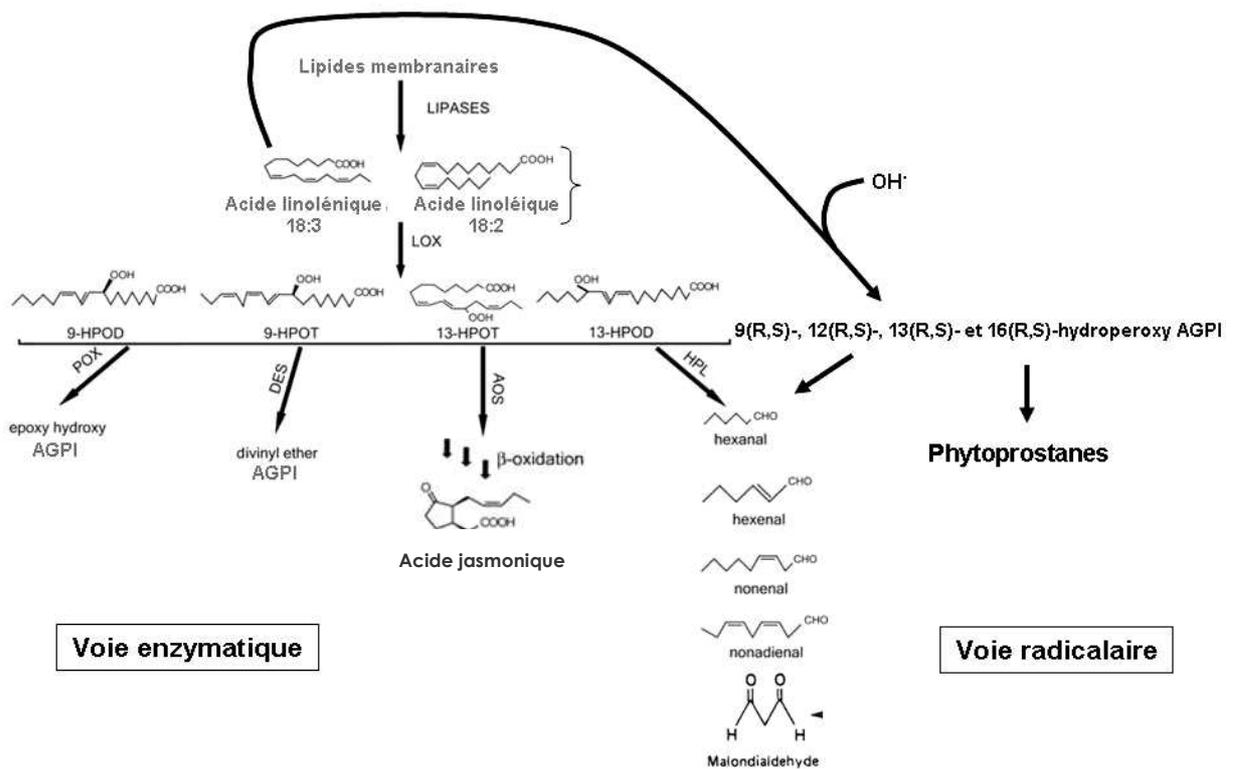


Figure 16 : Représentation très simplifiée des mécanismes enzymatiques ou non-enzymatiques se déroulant à la suite d'une peroxydation lipidique (modifié d'après Chehab *et al.*, 2007).

AOS, allène oxyde synthase ; AOC, allène oxyde cyclase ; DES, divinyl ester synthase ; HPL, hydroperoxyde lyase ; HPOD, acide hydroperoxy-octadecadiénoïque ; HPOT, acide hydroperoxy-octadecatriénoïque ; POX, peroxygénase.

4.2.2.3 Altérations de la structure des acides nucléiques

Les altérations oxydatives causées par les ERO sont considérées comme la source majeure de dommages spontanés sur l'ADN. Le spectre des dégâts causés par les ERO est large avec plus d'une centaine de lésions différentes (Beckman and Ames, 1997). Ces dégâts sont regroupés en quatre grandes catégories : les coupures simples et doubles brins, la modification de bases, la formation de sites abasiques et les pontages ADN-protéines ; catégories auxquelles se rajoutent les adduits de dérivés oxydés (Figure 17 ; Favier, 2003). L'attaque au niveau des sucres du squelette de l'ADN conduit à des fragmentations, des pertes de bases et des cassures de brins. Les systèmes de réparations entraînent des mutations comme dans le cas des polymérases- γ réparant les sites abasiques de l'ADN mitochondrial. Cette enzyme introduit systématiquement une adénine dans la chaîne d'ADN en cours d'élongation, en face du site abasique présent sur le brin d'ADN servant de matrice. Si la base, initialement présente au niveau de ce site abasique, n'était pas une thymine, l'incorporation erronée d'une adénine crée une mutation ponctuelle (Pinz *et al.*, 1995).

Les attaques au niveau des bases sont très variées. Par exemple, le radical hydroxyle attaque la double liaison des thymines en C5 ou C6, et moins fréquemment il arrache l'hydrogène du groupement méthyle. Le radical 6-hydroxythymine formé interagit avec O_2^- pour donner la thymine glycol, base modifiée capable de bloquer la réplication (Croteau and Bohr, 1997). Un autre exemple d'oxydation est la production de 8-oxo-7,8-hydroxyguanine (8-oxoGua), résultant de l'addition d'un radical hydroxyle sur le C8 d'une guanine. Ce dérivé de la guanine est une liaison prémutagénique, car si elle n'est pas réparée à temps, elle induit durant la réplication de l'ADN un mésappariement conduisant à la transversion de la guanidine en thymine (Grollman and Moriya, 1993). L'attaque de l'ADN par des radicaux libres ouvre le cycle imidazole de la guanine, et donne la 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine (FaPyGua). Les 8-oxoGua et les FaPyGua sont les lésions prédominantes suite à une attaque radicalaire. La 4,6-diamino-5-formamidopyrimidine est formée de la même manière que la FaPyGua, mais à partir de l'adénine.

Des dommages indirects sur l'ADN résultent également du stress oxydatif. C'est le cas de certains aldéhydes comme le MDA ou le 4HNE qui forment des adduits prémutagéniques de type MDA-dG ou éthénodérivés (Niedernhofer *et al.*, 2003).

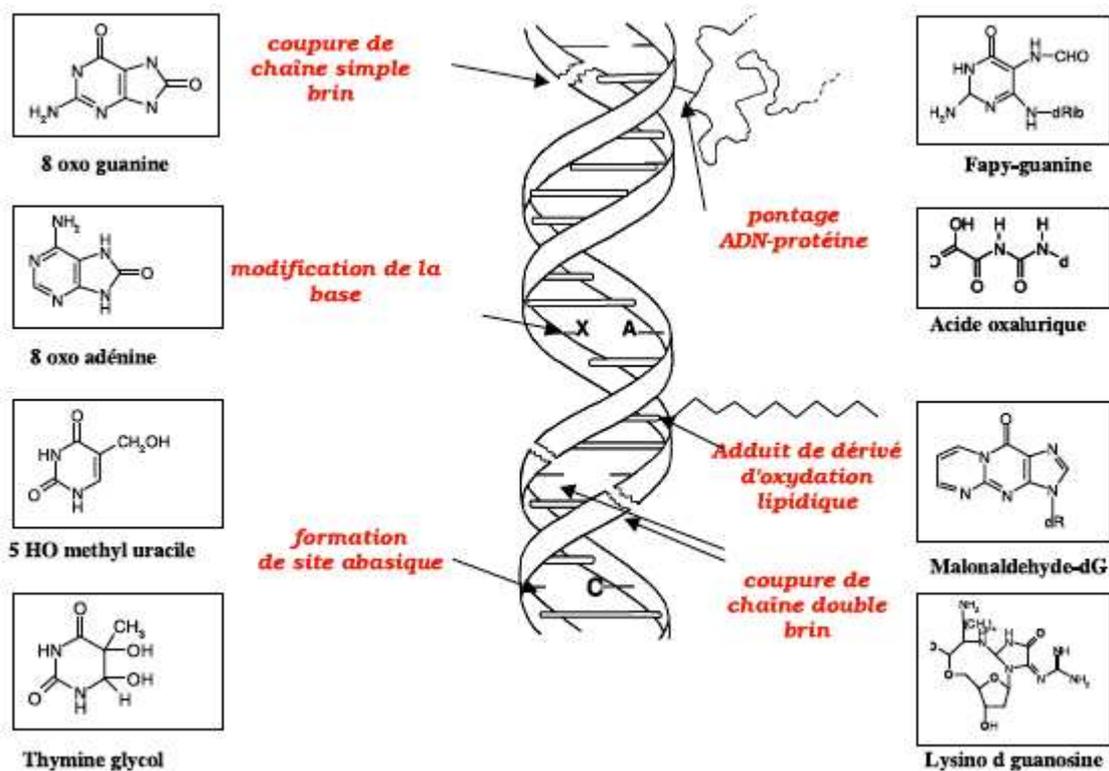


Figure 17 : Lésions de l'ADN formées suite à un stress oxydant (d'après Favier, 2003).

B. Le plomb et les plantes

1 Problématique du plomb dans l'environnement

1.1 Propriétés physico-chimiques du plomb

Le plomb, du latin *plombum*, est un métal mou, gris, sans goût ni odeur caractéristique, se trouvant habituellement en petite quantité dans la croûte terrestre. Il appartient au groupe IV b de la classification périodique des éléments. Ses principales propriétés physico-chimiques sont présentées dans le Tableau 3. De configuration électronique $[\text{Xe}] 4f^{14} 5d^{10} 6s^2 6p^2$, il possède deux électrons non appariés sur sa couche électronique externe. Cette configuration électronique autorise les degrés d'oxydation (+2) et (+4), en plus de la forme métal (0).

Le cation Pb^{2+} est un acide au sens de Lewis, c'est-à-dire qu'il est susceptible d'accepter un doublet d'électrons venant d'une base, pour former une liaison covalente. C'est également une espèce chargée, susceptible d'interactions électrostatiques avec des ions de signes contraires pour former une liaison ionique (Sposito *et al.*, 1982).

Symbole	Pb
Numéro Atomique	82
Masse atomique	207,2 g.mol ⁻¹
Point de fusion	327 °C
Point d'ébullition	1740 °C
Densité	11,35
Configuration électronique	$[\text{Xe}] 4f^{14} 5d^{10} 6s^2 6p^2$
Valence	0, +2, +4
Rayons ioniques	
Pb²⁺	0,94 à 1,49 Å
Pb⁴⁺	0,78 à 0,94 Å

Tableau 3 : Principales propriétés physico-chimiques du plomb.

1.2 Le plomb dans l'environnement

1.2.1 Histoire de l'utilisation du plomb

Le plomb a été l'un des premiers métaux utilisés par l'homme dès l'âge du bronze, il y a plus de 7 000 ans (Figure 18). Du fait de sa relative disponibilité et de ses propriétés physico-

chimiques (malléabilité, ductilité, bas point de fusion, propriété anticorrosion), le plomb a été largement utilisé par les Grecs et les Romains comme pigments (oxyde de plomb) ou pour réaliser des canalisations, de la vaisselle, des pièces de monnaie, des toitures...

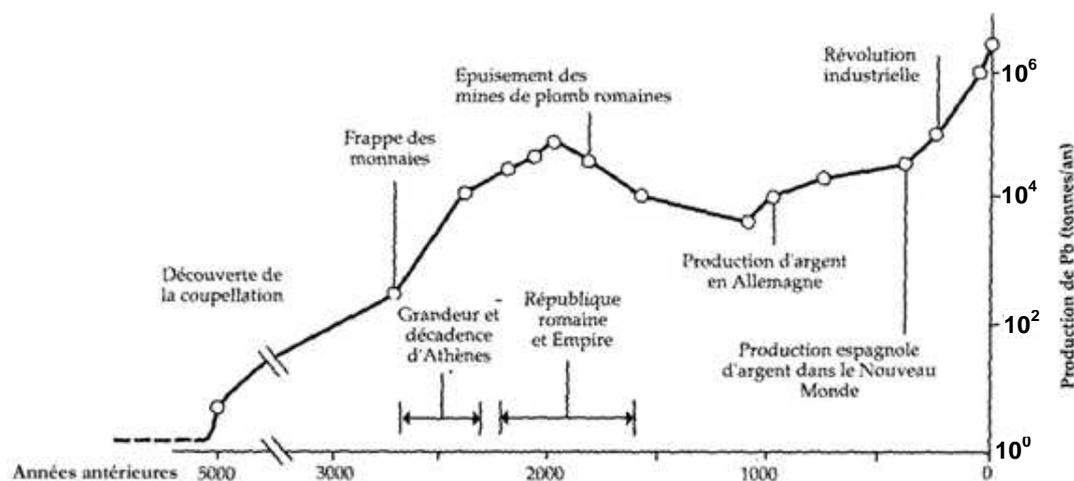


Figure 18 : Evolution de la production mondiale de plomb (d'après Settle and Patterson, 1980).

L'utilisation du plomb a ensuite explosé au cours de la Révolution industrielle. Pendant la première moitié du XX^{ème} siècle, le plomb a été utilisé dans l'industrie, l'imprimerie et les peintures. Dans la seconde moitié du siècle, l'utilisation dominante était liée aux carburants automobiles (le plomb était ajouté dans l'essence comme antidétonant) puis aux accumulateurs de voitures et industriels. Depuis les années 1970, le développement de nouvelles technologies, la prise en compte des problèmes environnementaux et de santé publique, ont conduit à la diminution ou à l'arrêt de certaines utilisations du plomb (canalisations, soudure, peinture, pesticides, antidétonant dans l'essence...). Dans les pays industrialisés, la production secondaire (à partir de la valorisation des déchets) ne cesse de progresser par rapport à la production primaire (à partir de minerai). En 2005, la France a produit environ 300 000 tonnes de Pb dont 94,5 % provenaient du recyclage du métal (ADEME, 2006). Environ 72 % de cette production était destinée à la fabrication d'accumulateurs.

1.2.2 Cycle biogéochimique

Le plomb retrouvé dans l'environnement provient à la fois de sources naturelles et anthropiques. Le métal est présent dans le sol, mais également dans tous les autres compartiments de l'environnement : eau, air et même les êtres vivants (Figure 19).

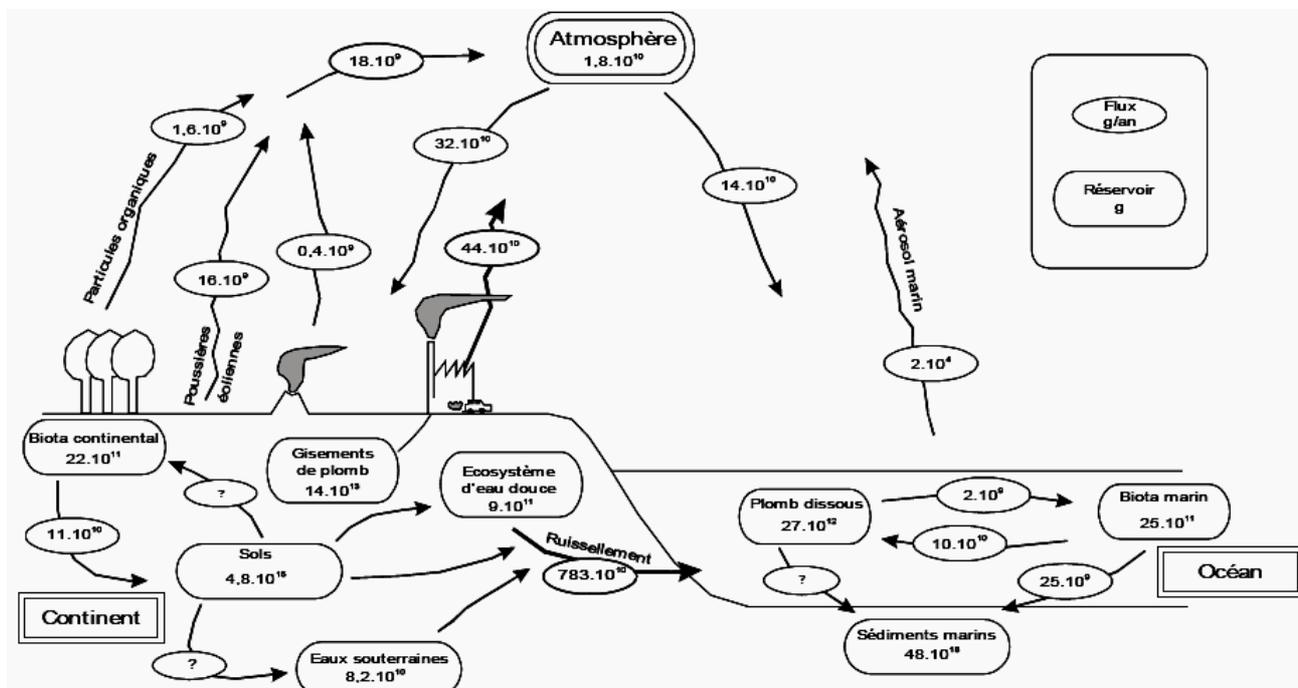


Figure 19 : Cycle biogéochimique du plomb dans les années 1970 (d'après Nriagu, 1978, modifié par Arnaud, 2003).

Le plomb a une teneur moyenne dans la croûte terrestre de 0,002 % (36^{ème} élément), et est présent dans la plupart des roches mères. La présence naturelle du plomb dans le sol est essentiellement due à sa mise en disponibilité par les processus d'altérations chimiques. En quantité plus faible, le plomb peut être libéré dans l'atmosphère lors de l'activité volcanique ou lors de feux de forêt, et être déposé sur les sols par des retombées atmosphériques. En l'absence de toute action anthropique, les teneurs naturelles moyennes des sols en plomb sont de 32 mg.kg⁻¹ (Pais and Benton Jones, 2000). En France, les teneurs naturelles varient entre 9 et 50 mg.kg⁻¹ (Baize, 1997). Dans le cas d'anomalies géochimiques, cette teneur peut atteindre plus de 3 000 mg.kg⁻¹, comme dans les paléosols ferrallitiques du Poitou, les "terres rouges".

Les activités anthropiques sont à l'origine d'un flux de plomb très important pouvant conduire à des contaminations locales aiguës. Ce flux représentait, en 1980, 332 000 t.an⁻¹

contre 12 000 t.an⁻¹ d'origine naturelle (Nriagu, 1990). Le rapport parlementaire du sénateur Miquel (Miquel, 2001) met en évidence que l'enrichissement moyen annuel en plomb des terres émergées, à l'échelle de la planète, s'effectue en grande partie via les retombées atmosphériques (68 %). Toutefois, dans les pays industrialisés, la part des émissions atmosphériques, dans les pollutions au plomb, a fortement diminué. Elle ne représente plus que 33 % en France (mesure sur les sols agricoles, SOGREAH, 2007) soit une baisse de 97 % en quinze ans (CITEPA, 2007). Cette diminution s'explique notamment par l'application du protocole d'Aarhus, et surtout par l'interdiction du plomb dans l'essence. Par ailleurs, bien que les pays industrialisés aient fortement réduit leurs émissions en plomb, la très forte croissance économique de pays comme la Chine ou l'Inde ne permet pas de constater, à l'échelle mondiale, une baisse du flux de plomb d'origine anthropique vers l'environnement (notamment des émissions atmosphériques).

Le plomb est un élément réputé peu mobile par rapport à d'autres métaux en traces tel que le cadmium (Bourrelier and Berthelin, 1998). Comme nous le verrons ultérieurement plus en détail, à l'interface entre la lithosphère et la biosphère, son cycle biogéochimique dépend des caractéristiques physico-chimiques du sol. Le plomb tend à former des complexes particulièrement stables. En conséquence, il va être stocké en grande partie dans le sol. Toutefois, une fraction mobile peut être absorbée par les organismes vivants (micro- et méso-organismes du sol, végétaux...) et rentrer ainsi dans la chaîne alimentaire. Une petite partie de ce plomb peut également être entraînée dans les rivières et les lacs, lors du processus d'érosion qui arrachent les particules de sol liées au plomb et les entraînent par ruissellement vers les hydrosystèmes de surface. Ariès (2001) a mis en évidence un flux de plomb des eaux interstitielles vers le sédiment, démontrant ainsi que le plomb reste majoritairement piégé dans le sédiment.

1.3 Phytodisponibilité du plomb

Les plantes peuvent absorber le plomb présent dans le sol par l'intermédiaire de leurs racines. Une partie de ce métal, présent dans les retombées atmosphériques ou dans les amendements agricoles (impurifiés), peut également être absorbée par leurs feuilles. Cependant, en dehors de zones proches d'installations générant la production de grandes quantités de plomb dans l'atmosphère, la plus grande partie du plomb absorbée par les plantes l'est par absorption racinaire.

1.3.1 Notion de phytodisponibilité

La notion de phytodisponibilité découle directement de la notion de biodisponibilité, définie comme « l'aptitude d'un élément à être transféré d'un compartiment du sol vers un organisme vivant (bactérie, végétal, animal, homme) » (Baize, 1997). Ainsi, selon Hinsinger et collaborateurs (2005), est biodisponible pour une plante (= phytodisponible), la fraction d'un élément susceptible d'être absorbée par les racines.

La phytodisponibilité des ETM est fortement corrélée à la concentration d'espèces ioniques dans la solution du sol (Kabata-Pendias and Pendias, 1992). Elle est également largement dépendante des propriétés du sol, de l'espèce végétale considérée et de l'élément en question. La phytodisponibilité va donc dépendre des différents paramètres permettant le transfert de la phase solide du sol vers le végétal (Hinsinger *et al.*, 2005) :

- La disponibilité ou mobilité chimique
- L'accessibilité ou mobilité physique
- L'assimilation ou mobilité biologique

1.3.2 Distribution du plomb au niveau du sol

Le comportement du plomb dans la solution du sol (disponibilité au transport ou immobilisation) et aux interfaces solution/solide et solution/plante dépend d'un grand nombre de paramètres biogéochimiques liés à la nature du sol (teneur en argile, pH, capacité d'échange cationique...), au contexte microbiologique, et aux formes chimiques du métal présentes dans la solution du sol ou associées à la phase solide. Ces différents paramètres sont trop nombreux et les interactions trop complexes (Cecchi, 2008) pour être développées dans cette étude bibliographique. Notons toutefois que la mobilité du plomb va être particulièrement conditionnée par la teneur en phases adsorbantes du sol (matière organique, argile, oxydes...). En effet, ce métal possède une forte affinité pour ces constituants du sol (Ross, 1994). Les différentes interactions avec les composants du sol et la distribution du plomb dans le sol sont résumées dans la Figure 20.

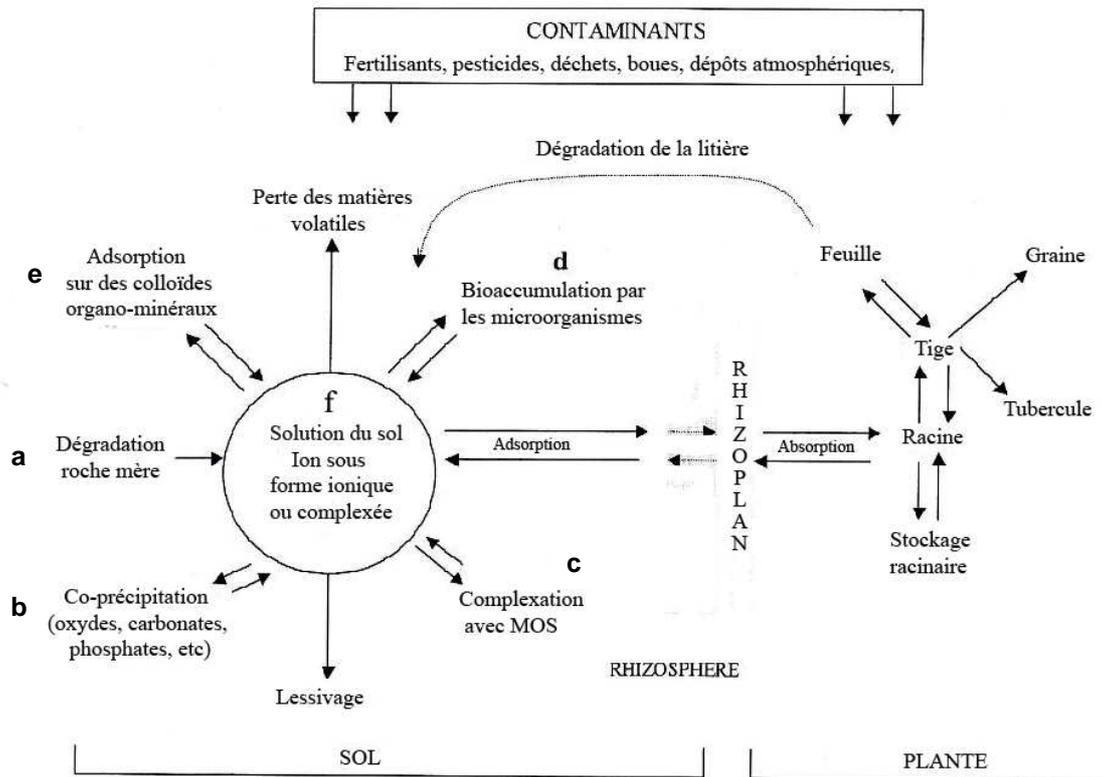


Figure 20 : Dynamique du plomb dans le système sol-plante (adapté d' Alloway, 1995).

Le plomb va ainsi se retrouver :

- Inclus dans des minéraux primaires hérités de la roche-mère (Figure 20.a) ou dans des minéraux secondaires suite à des précipitations ou co-précipitations (Figure 20.b) notamment avec des oxydes (Fe, Al, Mn),
- Adsorbé à la surface de la matière organique du sol (MOS ; Figure 20.c),
- Adsorbé à la surface des méso et microorganisme du sol ou absorbé par eux (Figure 20.d),
- Dans la solution du sol, associé à des colloïdes (Figure 20.e),
- Dans la solution du sol, complexé par des molécules organiques ou sous forme libre (f). Les principales espèces du plomb présentes dans la solution du sol sont Pb^{2+} , et $PbCO_3$ (BRGM, 2004). Ces formes solubles, bien que très minoritaires, ont un rôle fondamental, puisque les racines prélèvent uniquement le plomb dans la solution du sol (Bourrelier and Berthelin, 1998).

1.3.3 Facteurs influençant la phytodisponibilité du plomb

De nombreux facteurs influencent la solubilisation du plomb et son passage dans la solution de sol (Hinsinger, 2001; Lombi *et al.*, 2001; Cecchi, 2008). Les principaux sont résumés dans la Figure 21.

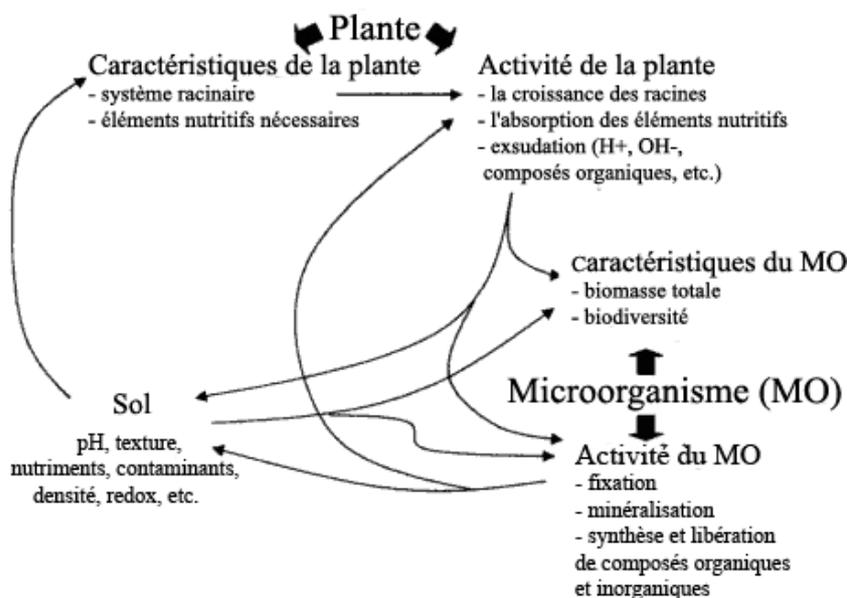


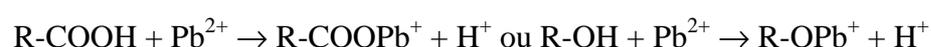
Figure 21 : Interactions au niveau de la rhizosphère entre le sol, la plante et les microorganismes, influençant la phytodisponibilité (modifié d'après Lombi *et al.*, 2001).

Notons que les deux facteurs les plus importants dans la phytodisponibilité du plomb sont la teneur en MOS et le pH du sol. En effet, la disponibilité du plomb est fortement corrélée à la teneur en matière organique du sol (McBride *et al.*, 1997 ; Lee *et al.*, 1998.). La fraction minérale n'intervient de façon importante dans la mobilité du métal que lorsque le sol contient peu de matière organique et a une teneur importante en oxydes métalliques (Pulford *et al.*, 1982). De très nombreuses études ont également montré que l'autre paramètre important du sol est le pH (McBride *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 2006a). Il influence fortement la spéciation du métal, mais également les interactions entre celui-ci et les différents composants du sol. La mobilité du plomb est plus grande dans les milieux acides, alors que sa solubilité diminue avec l'élévation du pH. Gerriste et Van Driel (1984) ont démontré des relations linéaires entre la constante d'adsorption du plomb, les teneurs en matière organique et le pH des sols étudiés.

La plante influence énormément les propriétés physico-chimiques de la rhizosphère. Elle prélève de l'eau et des éléments nutritifs nécessaires à sa croissance, et libère diverses

substances minérales et organiques : exsudats, sécrétions et excréctions racinaires. La plante modifie ainsi le pH de la rhizosphère. Le prélèvement des nutriments par les racines affecte ce pH en libérant des ions H^+ (pour prélever des cations comme NH_4^+) ou OH^- (pour prélever des anions comme NO_3^-) dans le milieu (Hinsinger, 2001; Lasat, 2002). L'extrémité des racines est également nettement plus acide que le reste du sol, et l'on observe un gradient de pH le long de la racine. L'amplitude de la variation peut dépasser deux unités pH. Cette acidification apicale est due à une intense excrétion de protons lors du processus d'élongation racinaire.

D'autres paramètres, comme l'activité biologique d'un sol, peuvent modifier la phytodisponibilité du plomb. Les paramètres physico-chimiques d'un sol influencent fortement l'activité biologique (micro- et méso-biologique) se déroulant en son sein. Cette activité biologique modifie en retour les paramètres du sol (pH, matière organique, structure...), et joue un rôle dans la biodisponibilité du plomb par des processus de biosorption, bioaccumulation et de solubilisation. Lorsque l'on considère la mobilité du plomb dans la rhizosphère, le pH rhizosphérique n'est pas le facteur le plus important (Lasat, 2002 ; Tao *et al.*, 2005). Dans la rhizosphère, zone bien particulière du sol, les éléments organiques (d'origine végétale ou microbienne) présents et l'activité microbiologique semblent jouer un rôle plus important que l'acidification. En effet, les acides organiques comme l'acide citrique, malique ou oxalique ont la capacité de désorber le plomb et de favoriser sa solubilisation dans le sol (Wu *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2006a). Le plomb réagirait avec les acides organiques dans la solution du sol selon les réactions suivantes :



Avec R-COOH : acide carboxylique ; R-OH : alcool ou phénols (ligands organiques).

Plusieurs auteurs ont également mis en évidence la capacité de certains sidérophores microbiens à désorber le plomb (Kraemer *et al.*, 1999; Dubbin and Louise Ander, 2003), démontrant ainsi l'importance des microorganismes présents dans le sol dans les mécanismes de solubilisation du plomb. Ces résultats sont confirmés par les nombreuses expérimentations de phytoremédiation (de sols pollués en plomb) assistées par une bioaugmentation de la biomasse microbienne du sol (Lebeau *et al.*, 2008).

2 Impact du plomb sur les végétaux

2.1 Absorption du plomb par la plante

2.1.1 Cas de l'absorption foliaire

Bien qu'elle ait été peu étudiée par rapport à l'absorption racinaire, l'assimilation du plomb par les feuilles peut représenter une part importante dans le taux de contamination de la plante. Du plomb peut être apporté sur les feuilles par des retombées atmosphériques, mais également dans les champs par des apports en engrais et pesticides (plomb sous forme d'impuretés). La majorité de ce plomb est lessivée, mais une partie va s'adsorber aux lipides épicuticulaires et être absorbée par les feuilles (Prasad and Hagemeyer, 1999). La capacité des plantes à absorber le plomb disponible via leurs feuilles dépend à la fois de l'âge de celles-ci, mais également de leurs morphologies. Les feuilles pubescentes ont en particulier la capacité de fixer et d'absorber ce plomb (Godzik, 1993). Dans le cas de « légume-feuilles », comme l'épinard, ou de céréales, comme le blé, exposés à de fortes retombées atmosphériques, la quantité de métal absorbée par les parties aériennes peut atteindre jusqu'à 95 % de la quantité totale absorbée (Dalenberg and Van Driel, 1990).

2.1.2 Mécanismes d'adsorption sur les racines

Comme précédemment évoqué, en dehors de certaines zones où la teneur atmosphérique en plomb est importante, ce dernier pénètre majoritairement dans la plante via les racines. Les couches supérieures du cortex racinaire (rhizoderme et collenchyme/parenchyme) constituent une barrière physique contre la pénétration du plomb dans la racine. Le mécanisme, ou plus vraisemblablement les mécanismes par lesquels ce métal arrive à pénétrer dans les racines ne sont pas encore élucidés. Toujours est-il que dans un premier temps le plomb présent dans la solution de sol s'adsorbe à la surface de cet organe. Il peut se lier aux groupements carboxyles des acides uroniques composant le mucilage racinaire (Glinski and Lipiec, 1990) ou directement aux polysaccharides présents à la surface des cellules rhizodermiques. Cette fixation en surface permet de restreindre le passage du plomb à l'intérieur de la racine.

La formation de plaques d'oxydes et d'hydroxydes de fer à la surface racinaire est assez courante. Du fait de leur capacité à adsorber de grandes quantités de métaux, ces plaques limitent la pénétration des métaux dans la racine (Otte *et al.*, 1987). Cependant, dans le cas du

plomb, ces plaques semblent jouer un rôle de barrière physique moins important que pour d'autres métaux (Ye *et al.*, 1998).

Les mycorhizes peuvent également modifier l'adsorption des métaux à la surface des racines (Hall, 2002). En effet, les métaux se lient aux parois des hyphes fongiques qui constituent une barrière supplémentaire protégeant le système racinaire du plomb. Toutefois, l'effet protecteur des mycorhizes n'est pas certain et dépend des souches de champignons considérées, des espèces végétales étudiées et de la concentration en plomb du milieu (Jentschke and Godbold, 2000).

2.1.3 Mécanismes d'absorption racinaire

Depuis plus de trente ans, du fait des risques de contamination de la chaîne alimentaire par le plomb, l'absorption racinaire a fait l'objet de nombreuses recherches sur diverses espèces végétales. De ce fait, ces études ont porté essentiellement sur les céréales, comme l'orge et le blé (Tanton and Crowdy, 1971), le maïs (Tung and Temple, 1996b), ou les légumes, comme la laitue (Glater and Hernandez, 1972), le radis (Lane and Martin, 1977) et l'oignon (Wierzbicka, 1987). Ces travaux ont révélé que le plomb, après s'être fixé au rhizoderme, pénètre dans le système racinaire de façon passive et suivait le système de conduction de l'eau. Cette absorption n'est pas uniforme le long de la racine, puisqu'il existe un gradient de concentration en plomb dans les tissus à partir de l'apex, qui est la zone la plus concentrée (Tung and Temple, 1996b; Seregin *et al.*, 2004). Les tissus jeunes, et en particulier la zone apicale (en dehors de la coiffe) où les cellules possèdent des parois encore fines, sont les zones absorbant le plus de plomb (Wierzbicka, 1987; Tung and Temple, 1996b; Seregin *et al.*, 2004). Cette région apicale correspond également à la zone où le pH rhizosphérique est le plus bas. Ce pH bas favorise la solubilité du métal et conduit à une élévation locale de la concentration en plomb dans la solution du sol.

Au niveau moléculaire, le mécanisme de pénétration du plomb dans les cellules du rhizoderme n'est toujours pas encore connu. Il semblerait que le plomb puisse rentrer par plusieurs voies d'accès, notamment des canaux ioniques et/ou des transporteurs ioniques. Le plomb profiterait de la non-spécificité de certains de ces canaux/transporteurs et de la très forte différence de potentiel membranaire, pouvant dépasser -200 mV dans les cellules du rhizoderme (Hirsch *et al.*, 1998), pour diffuser à l'intérieur de la racine. L'absorption du plomb est donc une absorption passive, mais nécessite une dépense énergétique de la cellule pour maintenir ce potentiel très négatif. Le maintien de ce potentiel s'effectue notamment par

l'excrétion de protons dans le milieu extérieur, via des pompes H^+ /ATPase. Dans des blés traités au plomb, l'utilisation de vanadate, un inhibiteur de ces pompes, a permis de limiter fortement l'absorption de ce métal (Wang *et al.*, 2007b).

L'inhibition de l'absorption racinaire du plomb par le calcium est un phénomène connu depuis longtemps (Garland and Wilkins, 1981) et qui semble commun à toutes les espèces végétales. Huang and Cunnigam (1996) ont, les premiers, évoqué le passage potentiel du plomb via des canaux calciques. De façon plus générale, l'ajout d'ions Ca^{2+} , Mg^{2+} ou K^+ , dans le milieu extérieur, inhibe significativement la pénétration de plomb dans les racines de riz (Kim *et al.*, 2002). Chez le blé, l'utilisation d'inhibiteurs de canaux calciques (lanthane) ou potassiques (chlorure de césium) a permis de montrer que ces canaux étaient des voies d'entrée pour le plomb dans la racine (Wang *et al.*, 2007b).

L'utilisation de plantes mutantes a permis de confirmer ces résultats et de mettre en évidence une famille de protéines transmembranaires, nommées HvCBT1 chez l'orge (Schuurink *et al.*, 1998), AtCNGC1 à AtCNGC6 (cyclic nucleotide-gated ion channel) chez *Arabidopsis thaliana* (Kohler *et al.*, 1999; Leng *et al.*, 1999) et NtCBP4 (Arazi *et al.*, 1999) chez le tabac, qui seraient une de ces voies d'entrée non-sélectives empruntée par le plomb. Ces canaux sont proches de la famille des canaux ioniques modulés par les nucléotides cycliques non sélectifs aux cations. Cette approche mutante a également permis de découvrir, chez le tabac, un transporteur membranaire, TaLCT1, possédant une faible affinité pour les cations (Low Affinity Cation Transporter ou LCT en anglais). Il modulerait l'absorption de K^+ , Na^+ , Ca^{2+} et Cd^{2+} et serait une voie alternative d'entrée de Pb^{2+} , lorsque le milieu est faiblement concentré en calcium (Wojas *et al.*, 2007).

D'autres transporteurs transmembranaires, comme la famille des facilitateurs de diffusion cationique (Cation Diffusion Facilitator : CDF), la famille des transporteurs ZIP (ZRT/IRT-like Protein) ou bien encore les Nramps (Natural resistance associated macrophage proteins) sont associés au transport du cuivre, zinc, cadmium ou du manganèse (voir pour revue Hall and Williams, 2003; Colangelo and Guerinot, 2006). Ils pourraient également jouer un rôle dans le transport du plomb, mais aucune étude n'a traité de ce sujet.

2.2 Le plomb dans la racine et sa translocation vers les parties aériennes

Une fois pénétrée dans le système racinaire, la très grande majorité du plomb va y rester (Huang and Cunnigam, 1996; Huang *et al.*, 1997). Bien qu'il existe quelques espèces capables de transférer de grandes quantités de ce métal vers les parties aériennes, la racine

agit comme une barrière très efficace contre les mouvements du plomb à l'intérieur de la plante. Ce phénomène de barrière n'est pas commun à tous les ETM, et son intensité est très spécifique au plomb.

2.2.1 Diffusion radiale dans la racine

2.2.1.1 Voie apoplastique

De nombreuses études histologiques ont permis de montrer que le plomb était transporté essentiellement dans l'apoplaste, c'est-à-dire via les espaces intercellulaires (Figure 22) et qu'il suivait les mouvements d'eau à l'intérieur de la plante (Tanton and Crowdy, 1971; Lane and Martin, 1977).

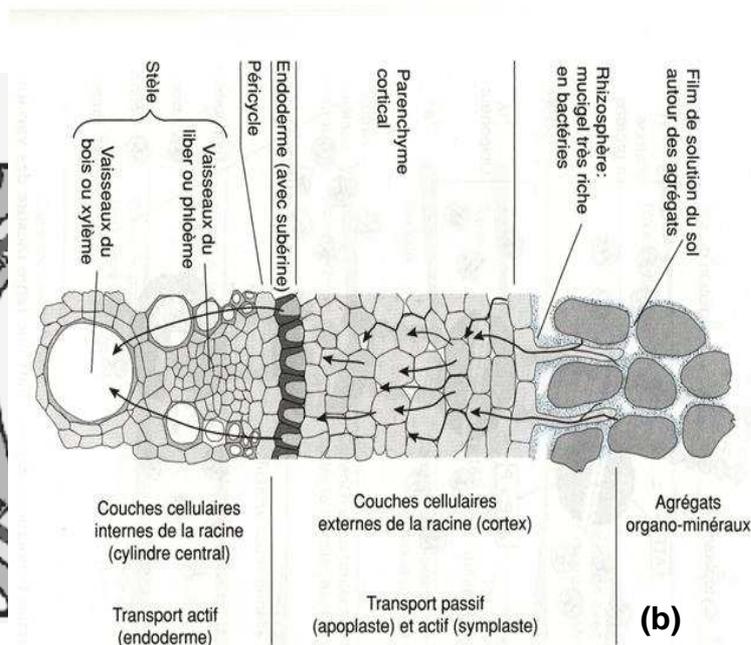
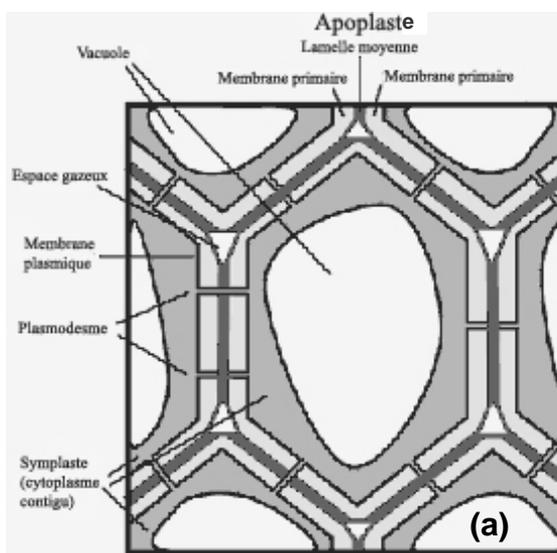


Figure 22 : (a) Représentation schématique de cellules; (b) Dessin d'une coupe transversale de racine, avec la diffusion radiale des ions selon les voies symplastique et apoplastique (Gobat *et al.*, 1998).

Une fois dans l'apoplaste, le plomb peut migrer relativement vite. Dans des racines d'oignon, Wierzbicka (1987) a montré que son transfert s'effectuait à la vitesse d'une couche cellulaire par cinq minutes. Cependant, chez le maïs, Seregin et Ivanov (1997) font état d'une diffusion restreinte à l'épiderme et aux couches supérieures du cortex, après vingt-quatre heures d'exposition au plomb. Dans une moindre mesure, après quarante-huit heures d'exposition, les tissus conducteurs sont également atteints.

Bien qu'il arrive à diffuser dans la racine, et même à être transféré vers les parties aériennes, seule une faible fraction du plomb présent dans la racine est mobile. Plus de 90 % se retrouve sous forme insoluble (Ernst, 1998; Wierzbicka *et al.*, 2007) et est fortement lié aux enveloppes cellulaires externes (Figure 23). Le plomb est principalement lié aux parois (Tung and Temple, 1996b; Wierzbicka, 1998), mais peut se trouver associé à la lamelle moyenne (Jarvis and Leung, 2001, 2002) ou à la membrane plasmique (Seregin *et al.*, 2002; Seregin *et al.*, 2004). Il peut également être précipité dans l'espace intercellulaire (Jarvis and Leung, 2001).

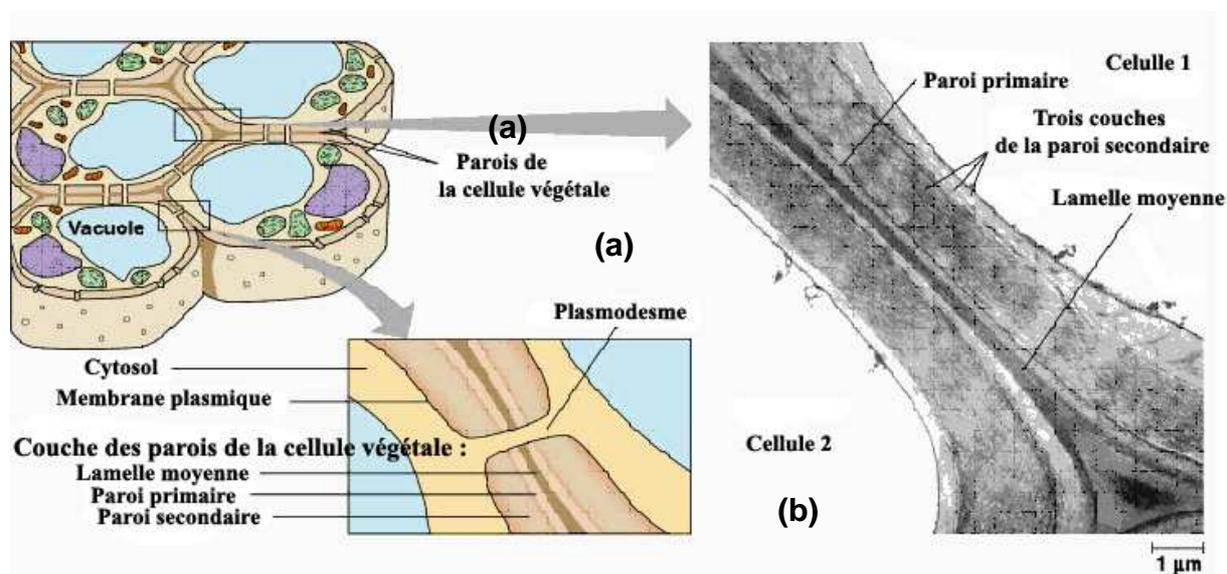


Figure 23 : (a) Représentation schématique de l'espace intercellulaire ; (b) Coupe transversale de cellules végétales.

Cette répartition, très spécifique au plomb, s'explique par son affinité particulière pour les groupements carboxyles présents sur les molécules de surfaces des parois. Ces sites chargés négativement sont généralement liés à des cations comme le calcium. Les ions Pb^{2+} rentrent donc en compétition avec les ions Ca^{2+} pour l'accès à ces sites (Lane *et al.*, 1978), mais également aux sites de liaison entre molécules de pectines, dans la matrice pariétale.

Bien que cela soit dans une moindre mesure, il peut exister des liaisons Pb-O avec des molécules d'hémicellulose et de cellulose, composants importants des parois primaires et secondaires. Ce type de liaison peut également se former avec des molécules de lignine rentrant dans la composition des parois secondaires (Marmioli *et al.*, 2005). Cette forte affinité pour les composants pariétaux peut expliquer la faible mobilité de ce métal par rapport à d'autres ETM comme le cadmium, dont seulement 56 % se retrouvent adsorbés aux

constituants cellulaires (Wierzbicka *et al.*, 2007). Cette propriété du plomb serait aussi une des raisons de sa moindre toxicité dans les cellules végétales (Seregin *et al.*, 2004).

2.2.1.2 Voie symplastique

Lane et Martin (1978) ont, les premiers, montré le passage du plomb par la voie symplastique en même temps que par la voie apoplastique (Figure 22). La quantité de ce métal passant par cette voie est marginale par rapport à la voie apoplastique, et peu d'études en ont fait état. Cependant, elle a une importance capitale dans la toxicité du plomb car c'est cette fraction, passant par le symplaste, qui cause la majorité des effets délétères observés.

Le ou les mécanismes de pénétration dans le symplaste ne sont pas clairement identifiés comme nous l'avons déjà évoqué (cf. 2.1.3). Pourtant, à des doses non létales, le plomb pénètre uniquement dans le symplaste dans les zones de divisions cellulaires actives, comme la zone apicale (Tung and Temple, 1996b) ou le protoderme (Wierzbicka, 1998). En effet, les cellules jeunes ne possèdent pas encore de paroi secondaire et leur paroi primaire est très fine. L'accès à la membrane plasmique est donc facilité dans ces zones racinaires.

Les études faisant état de la présence de plomb dans le symplaste n'ont pas pu révéler la présence de plomb à l'état libre dans le cytoplasme. Le plomb symplastique peut se retrouver confiné dans certains compartiments cellulaires, comme les vacuoles (Matecka *et al.*, 2008 ; Meyers *et al.*, 2008 ; Figure 24.1), les vésicules dictyosomales (Malone *et al.*, 1974 ; Figure 24.2), les vésicules du réticulum endoplasmique (Wierzbicka *et al.*, 2007 ; Figure 24.3) ou les évaginations tubulaires de la membrane plasmique, les plasmatabules (Wierzbicka, 1998 ; Figure 24.4).

Cette séquestration intervient très rapidement, et permettrait ainsi de limiter l'accès du plomb à certains sites sensibles (Wierzbicka *et al.*, 2007). De plus, le plomb séquestré dans les plasmatabules est excrété rapidement au niveau des parois, dans l'espace intercellulaire (Wierzbicka, 1998). Ce mécanisme de détoxification rapide et efficace expliquerait également, en partie, la moindre toxicité du plomb par rapport à celle induite par le cadmium (Wierzbicka *et al.*, 2007).

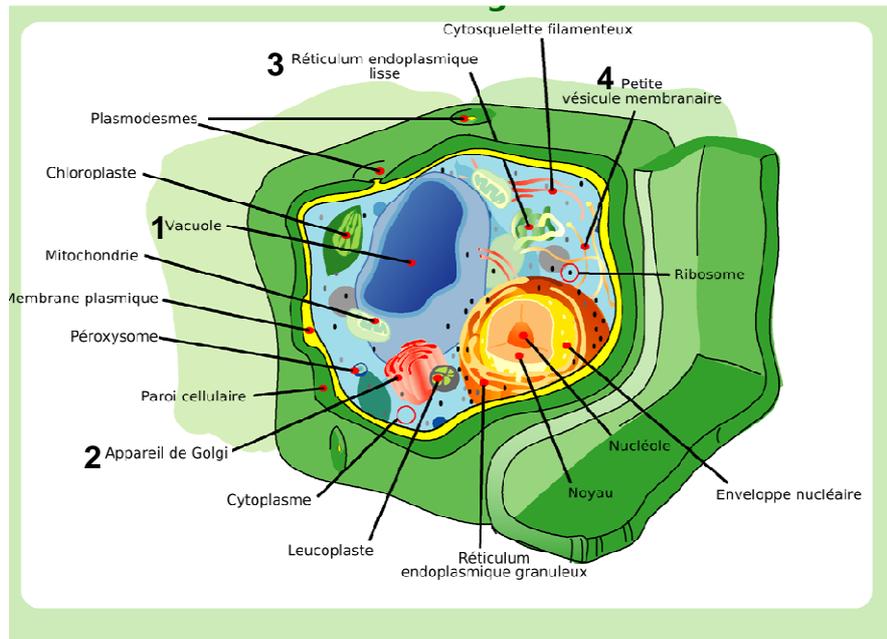


Figure 24 : Représentation schématique d'une cellule végétale, avec représentées, les zones impliquées dans la séquestration du plomb (1 à 4).

A des doses létales, le plomb pénètre dans tous les tissus racinaires, et les membranes plasmiques ne semblent plus jouer leur rôle de barrière physique (Seregin *et al.*, 2004). A ces concentrations, le plomb induit une désorganisation de ces dernières. Il peut alors pénétrer massivement dans le cytoplasme, le noyau et les différents organites, y compris ceux possédant des doubles membranes, comme les mitochondries (Małecka *et al.*, 2008).

2.2.2 Mécanismes de détoxification

Marmioli et collaborateurs (2005) ont proposé l'idée que les plantes possèderaient deux mécanismes de séquestration/détoxification du plomb :

- l'un constitutif, correspondant à la liaison du plomb aux composants cellulaires
- l'autre inductible, correspondant à des molécules pouvant chélater le métal (phytochélatines).

2.2.2.1 Mécanismes constitutifs

Nous venons de détailler les différents mécanismes conduisant à une séquestration du plomb par adsorption sur les différents composants cellulaires. Il semble très important pour la cellule, d'entourer le plomb de membranes l'isolant du reste du cytoplasme. Il est

intéressant de noter que la présence de plomb induit une accentuation de ce phénomène. En effet, dans des cellules d'oignon exposées au plomb, Wierzbicka (1998) a noté une synthèse accrue de polysaccharides entraînant un épaississement important de la paroi. Cet épaississement permet d'augmenter la taille de la barrière physique que constitue la paroi, et de limiter ainsi, l'accès à la membrane plasmique. Il permet également de créer de nouveaux sites de liaisons potentielles au plomb, et par conséquent, d'augmenter la capacité de séquestration extracellulaire.

Malgré la compétition apparente entre le plomb et le calcium pour les sites de liaisons pariétaux, il semble que le calcium joue un rôle important dans le dépôt du plomb à l'intérieur de la paroi (Antosiewicz, 2005). En effet, les plantes poussant dans des milieux carencés en calcium présentent des dépôts moins importants de plomb au niveau des parois. A concentration égale en plomb dans la racine, ces plantes présentent également des symptômes de toxicité plus prononcés. Le calcium influencerait sur la sécrétion extracellulaire du plomb symplastique. Une carence en cet élément conduirait à une accumulation du plomb dans le symplaste.

2.2.2.2 Mécanismes inductibles

2.2.2.2.1 Mécanismes généraux

Si l'on tient compte de l'ensemble du plomb se trouvant sous forme insoluble (fixé aux différents constituants et précipité dans les vacuoles, vésicules...), seul 2,4 % de la concentration totale, se retrouve sous forme soluble (Wierzbicka *et al.*, 2007). Dans le cas de ce métal, les mécanismes inductibles apparaissent être des mécanismes de secours lorsque le stress devient trop important. Ils sont coûteux énergétiquement pour la plante contrairement aux mécanismes constitutifs, et sont, par conséquent, généralement limités dans le temps.

Récemment, plusieurs études ont mis en évidence la présence, chez les cellules végétales, de transporteurs membranaires qui joueraient un rôle dans la détoxification en permettant d'excréter les ions métalliques dans le milieu extracellulaire. Ces transporteurs sont constitutifs, mais l'analyse du transcriptome a permis de montrer que leur expression génique était stimulée par le plomb. Ainsi, plusieurs transporteurs ABC (à ATP-binding cassette), comme AtATM3 ou AtADPR12 chez *Arabidopsis* (Lee *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2006), ont été identifiés comme étant impliqués dans la résistance au plomb. Enfin, une étude menée sur des levures transformées pour exprimer une ATPase à métaux lourds provenant de

Thlaspi, a montré que l'expression de ce gène induisait un efflux de Pb^{2+} dans le milieu extérieur, et une tolérance accrue des levures à ce métal (Papoyan and Kochian, 2004).

Les différents mécanismes de séquestration intracellulaire évoqués plus haut ont été peu étudiés. Le plomb pourrait être transporté dans ces compartiments cellulaires après s'être lié à des molécules organiques. Bien qu'il soit suspecté dans le cas du plomb, ce mécanisme de détoxification n'a pas encore été mis à évidence, contrairement à d'autres ETM (Hall, 2002). Wierzbicka et collaborateurs (2007) ont récemment montré qu'une partie du plomb soluble se trouvait complexée à de l'histidine, un acide aminé décrit comme participant à la détoxification du nickel (Hall, 2002). Cette fraction soluble peut également être liée à des composés possédant des groupements thiols. En effet, le plomb possède une forte affinité pour ce type de composés et en particulier pour la cystéine (Vallee and Ulmer, 1972). Ainsi, le glutathion réduit (GSH) possède la capacité de chélater directement le plomb (Singh *et al.*, 2006), et est associé à la tolérance des plantes à ce métal (Gupta *et al.*, 1995; Scarano and Morelli, 2002; Ruley *et al.*, 2004b).

2.2.2.2.2 Les phytochélatines

Le GSH peut jouer un rôle direct dans la chélation du plomb, mais il est également le précurseur des phytochélatines (PC). Chez les plantes, les PC ont un rôle reconnu en matière de détoxification et d'homéostasie des métaux lourds (Zenk, 1996; Cobbett, 2000; Clemens, 2006b). Les PC, aussi appelées métallothionéines (MT) de classe III, sont des polypeptides atypiques dont la synthèse n'est pas d'origine génétique, mais enzymatique. Leur structure primaire consiste en la répétition d'une séquence dipeptidique, γ -glutamyl-cystéinyl, à laquelle s'ajoute généralement un motif glycine carboxy-terminal (Figure 25). Dans certaines plantes, la glycine peut être remplacée par une sérine (certaines graminées), une glutamine (raifort), un acide glutamique (maïs) ou encore une alanine (certaines légumineuses dont ne fait pas partie la fève). La structure primaire est répétée n fois, de 2 à 11, et les PC sont notées PC_n en fonction du nombre de répétition. Toutefois, les formes les plus répandues sont celles comprises entre PC_2 et PC_5 (Zenk, 1996).

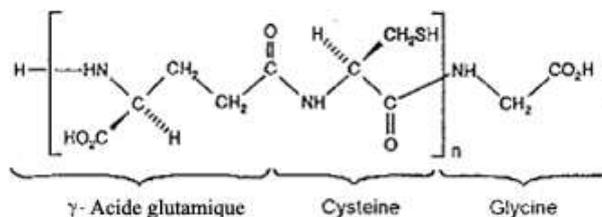


Figure 25 : Structure d'une phytochélatine.

La synthèse de phytochélatines, à partir de GSH, ainsi que l'allongement de la chaîne de PC est catalysée par une enzyme, la phytochélatine synthase ou PCS. Cette enzyme est constitutive des cellules végétales, mais n'est active qu'en présence de certains métaux lourds.

Le plomb est connu pour stimuler la production de PC et activer la PCS (Cobbett, 2000; Cobbett and Goldsbrough, 2002; Clemens, 2006a; 2006b). Les PC semblent jouer un rôle important dans la tolérance des plantes à ce métal et participent à sa détoxification (Gupta *et al.*, 1995; Mehra *et al.*, 1995; Piechalak *et al.*, 2002). De la même façon que pour le GSH, la complexation du plomb se fait par interaction entre les ions Pb^{2+} et le groupement thiol de la cystéine. Les PC séquestrent le plomb soluble présent dans le cytoplasme avant de le transporter dans les vacuoles (Piechalak *et al.*, 2002; Seregin *et al.*, 2002 ; Małecka *et al.*, 2008). Le mécanisme régulant le passage du complexe Pb-PC à travers le tonoplaste n'est, par contre, pas encore connu.

Bien qu'il semble que le rôle principal des PC soit de chélater certains métaux et de les transporter vers leurs lieux de séquestration (Clemens *et al.*, 2002), leurs rôles dans la détoxification de ces métaux pourraient être plus complexes. En effet, Gong et collaborateurs (2003) ont prouvé que les PC participaient, en partie, à la translocation du cadmium vers les parties aériennes chez *Arabidopsis thaliana*. Récemment, une étude réalisée sur des mutants de cette plante ne possédant pas de PCS dans les racines, a révélé que les PC pouvaient être synthétisées dans les parties aériennes, puis transportées vers les racines pour faire face à l'afflux de cadmium (Chen *et al.*, 2006). Enfin, Mendoza-Cozatl et collaborateurs (2008) ont démontré que les PC pouvaient participer à un système de détoxification particulier des feuilles, pour les protéger des effets néfastes des ETM, en particulier sur l'appareil photosynthétique. Ces auteurs ont mis en évidence l'existence d'un transfert important de cadmium des parties aériennes vers les parties racinaires, qui serait lié aux PC. Ainsi, leurs résultats ont révélé des concentrations en cadmium quatre fois supérieures dans la sève phloémique que dans la sève xylémique.

2.2.2.2.3 Les métallothionéines

Le plomb peut être séquestré par les autres classes de métallothionéines (de classe I et II) présentant des homologies avec les métallothionéines de levure ou humaine. Ces MT, qui ont un rôle fondamental dans la détoxification des ETM chez les animaux, n'ont été que peu étudiées chez les végétaux, en raison du rôle prépondérant que jouent les PC (Cobbett and Goldsbrough, 2002). Très récemment, Xu et collaborateurs (2007) ont révélé que le plomb

activait plusieurs gènes de MT de classe I, tandis que Liu et collaborateurs (2007) ont démontré la capacité de détoxification du plomb de BjMT2, une MT de classe II.

2.2.3 Translocation vers les parties aériennes

Certaines espèces végétales sont capables de transférer des quantités importantes de plomb vers les parties aériennes (Huang and Cunningham, 1996; Arshad *et al.*, 2008). Néanmoins, la faible translocation de ce métal semble être un phénomène assez commun aux autres espèces végétales. Comme précédemment évoqué, ce phénomène est en grande partie dû à la très grande quantité de plomb qui se retrouve immobilisée sous forme insoluble. Cependant, cette explication n'est pas suffisante, et il semble que la barrière physique que constitue l'endoderme joue un rôle important dans ce phénomène. En effet, le plomb qui transite majoritairement par la voie apoplastique, se retrouve bloqué par les bandes de Caspary au niveau de l'endoderme. Pour suivre le flux d'eau, il doit passer par la voie symplastique, au travers du filtre que constituent à la fois la perméabilité des membranes plasmiques et les systèmes de séquestration/détoxification du cytoplasme.

Les différentes études de localisation histologique du plomb ne font jamais état de la présence de ce métal dans les cellules endodermiques matures. De plus, les auteurs constatent une très grande différence de concentration en plomb entre le cortex et le cylindre central (Tung and Temple, 1996b; Seregin *et al.*, 2004). Le plomb absorbé par l'épiderme et par la région des poils absorbants pénètre dans tous les tissus corticaux, mais ne semble pas en mesure de franchir l'endoderme (Seregin *et al.*, 2004). Le profil de localisation du plomb dans les racines est caractéristique d'une molécule qui ne peut pas passer la barrière endodermique (Seregin *et al.*, 2004). Cette hypothèse est renforcée par le fait que les Monocotylédones qui possèdent un endoderme plus perméable, transfèrent de plus grandes quantités de plomb vers leurs parties aériennes, que les Dicotylédones. Le plomb pénétrerait majoritairement dans le cylindre central via l'apex, région où l'endoderme n'est pas encore formé (Tung and Temple, 1996b; Seregin *et al.*, 2004). En conséquence, il semble qu'à des doses non létales, le plomb migrant vers les parties aériennes provienne uniquement de l'apex racinaire (Figure 26).

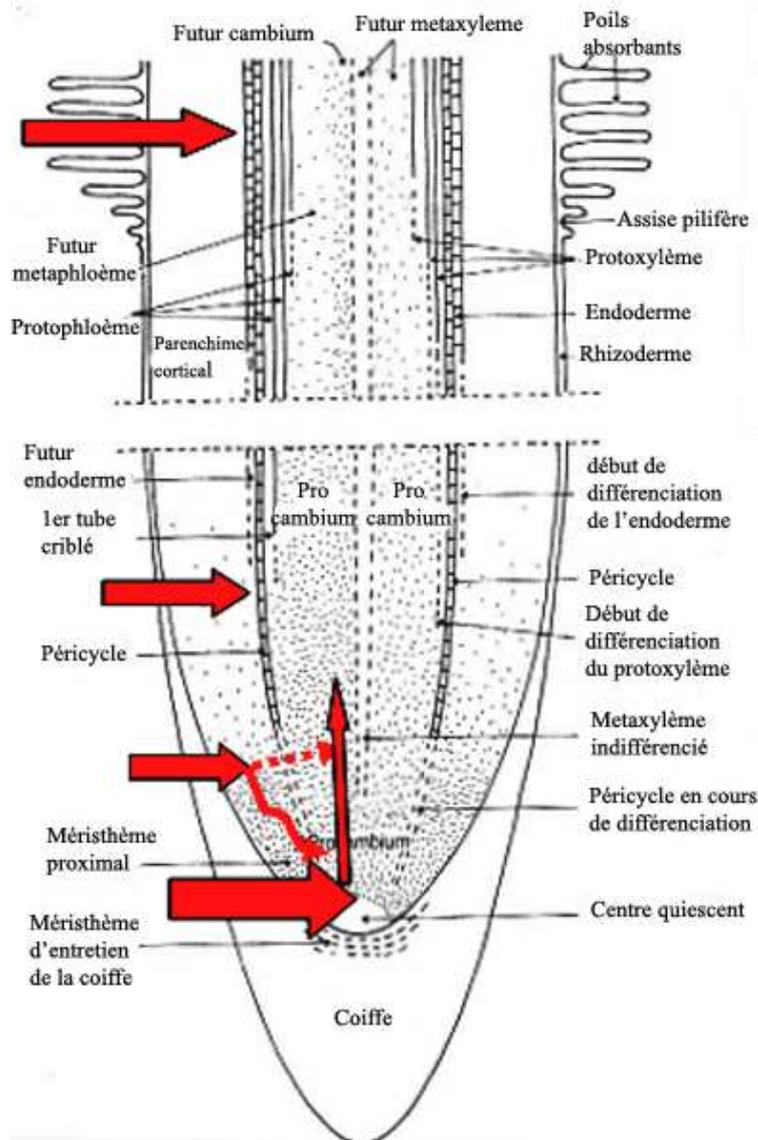


Figure 26 : Représentation schématique d'une coupe de racine et des flux de plomb à l'intérieur des tissus racinaires.

Plusieurs auteurs ont réussi à montrer que le flux de soluté contournant la barrière de l'endoderme constitue seulement une faible part du flux total (moins de 1 %) de soluté migrant vers les parties aériennes (Yeo *et al.*, 1987; Skinner and Radin, 1994). Ces résultats semblent en accord avec le rapport observé lors d'exposition à des concentrations faibles à moyennes de plomb, entre le plomb contenu dans les parties aériennes et les parties racinaires qui est inférieur à 1 % (Huang and Cunningham, 1996). Cette hypothèse est confortée par le fait que le flux de soluté augmente de façon très importante dans des racines endommagées (Moon *et al.*, 1986), phénomène comparable avec celui observé par Seregin et collaborateurs (2004) pour le plomb dans des racines endommagées. Ainsi, lors d'exposition à de fortes

concentrations, le rapport entre les concentrations en plomb contenues dans les parties aériennes et celles contenues dans les racines dépasse les 20 % (Singh *et al.*, 1997).

Une fois pénétré dans le cylindre central, le plomb peut de nouveau, reprendre la voie apoplastique (Tung and Temple, 1996a, b). Le métal emprunte alors le système vasculaire en suivant le flux d'eau jusqu'aux zones foliaires, où l'eau s'évapore et où il s'accumule (Tung and Temple, 1996a). Lors du passage dans la sève xylémique, le plomb pourrait être complexé à des acides aminés, comme l'histidine, à des acides organiques, comme les acides citriques, fumariques et maliques (Tatar *et al.*, 1998) ou bien aux PC, comme nous l'avons vu précédemment. Cependant, il pourrait aussi être transféré majoritairement sous forme inorganique comme c'est le cas pour le cadmium (Ueno *et al.*, 2008).

2.3 Effets généraux du plomb sur les plantes

La fraction de plomb pénétrant dans le symplaste est faible et rapidement séquestrée dans les cellules. Néanmoins, elle cause une grande diversité d'effets néfastes dans les plantes. Ces effets ont déjà fait l'objet de très nombreuses publications ainsi que plusieurs revues bibliographiques (Singh *et al.*, 1997; Seregin and Ivanov, 2001; Patra *et al.*, 2004; Sharma and Dubey, 2005). Le premier point important à souligner, est que ces effets varient en fonction de la durée d'exposition, de l'intensité du stress, du stade de développement de la plante, des organes considérés et évidemment des espèces étudiées voire même du cultivar. Les effets présentés ci-dessous sont donc des tendances générales.

Le deuxième point important à noter, est que, dans leur grande majorité, les études d'impact du plomb sont réalisées à des concentrations très importantes, souvent létales, de l'ordre du millimolaire et quasi exclusivement en culture hydroponique (environ 2 publications sur 3). Il est évident qu'à de telles concentrations, les effets observés sont multiples et très significatifs. Cependant, d'un point de vue environnemental, ces résultats n'ont que peu de significativité, car ces teneurs dépassent très largement celles pouvant se retrouver dans la solution du sol, même dans des sites fortement contaminés. Une étude réalisée par Jopony et Young (1994), portant sur cent sites pollués au plomb, a montré que les concentrations de ce métal dans la solution de sol étaient comprises entre 3,5 ppb et 3,5 ppm. Ces concentrations correspondent, par exemple, en hydroponie, à des concentrations en $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ comprises entre environ 17 nM et 17 μM . C'est pourquoi, au cours de cette revue bibliographique sur les effets du plomb, nous considérerons, avec une attention plus

particulière, les effets de « faibles¹ » doses de plomb (de l'ordre du micromolaire ou moins), lorsque ces données existent.

2.3.1 Effets sur la germination et la croissance

A l'échelle macroscopique, le plomb entraîne des effets néfastes sur les plantes. En premier lieu, la germination est fortement inhibée par les ions Pb^{2+} et ce, à de très faibles concentrations (Mishra and Choudhuri, 1998; Wierzbicka and Obidzinska, 1998; Tomulescu *et al.*, 2004). De plus fortes doses conduisent à une inhibition totale de la germination chez les espèces végétales, comme le haricot, dont le tégument de la graine ne limite pas assez la pénétration de ces ions (Wierzbicka and Obidzinska, 1998). Le plomb réduit également fortement le développement de la plantule et des racelles (Mishra and Choudhuri, 1998).

Un traitement à de faibles concentrations en plomb inhibe la croissance des racines et des parties aériennes (Garland and Wilkins, 1981; Mishra and Choudhuri, 1998; Wierzbicka, 1999a; Makowski *et al.*, 2002; An, 2006). Cette inhibition est plus importante pour la racine, ce qui peut être corrélé à la plus forte teneur en plomb de cette dernière. Les racines primaires sont également plus sensibles que les racines latérales (Obroucheva *et al.*, 1998).

L'accroissement de biomasse végétale est diminué par de fortes doses de plomb. Toutefois, l'effet des faibles concentrations n'est pas clairement établi et l'inhibition de la croissance observée n'est pas forcément corrélée à une diminution de biomasse (Mishra and Choudhuri, 1998; Kosobrukhov *et al.*, 2004; Xiong *et al.*, 2006; Zheljazkov *et al.*, 2006). Makowski et collaborateurs (2002) ont même montré un accroissement de la biomasse dans les zones racinaires contenant les plus grandes quantités de plomb, comme l'apex et la zone d'élongation. Cette augmentation de biomasse peut être attribuée à la synthèse de nouveaux composants pariétaux (Wierzbicka, 1998). Au niveau morphologique, une exposition à une faible concentration de plomb conduit au développement de racines plus courtes mais plus compactes.

¹ Le terme de « faibles » sera employé ici pour caractériser des concentrations en plomb de l'ordre du micromolaire (en solution nutritive) car c'est ainsi qu'elle sont décrites dans la littérature. Cependant, ces concentrations correspondent à des concentrations de solution de sols moyennement à très pollués en plomb (Jopony and Young, 1994).

Sur de longues durées, les traitements au plomb, même à des doses non-létales, peuvent conduire à l'apparition de nécroses au niveau des apex racinaires et des feuilles, ainsi que des chloroses foliaires (Khan and Frankland, 1983 ; Liu *et al.*, 2000). Il faut cependant noter que, même aux plus fortes concentrations rencontrées dans l'environnement (sols miniers, usines de retraitement de batteries), le plomb induit rarement une mort des végétaux (Cobb *et al.*, 2000; Arshad *et al.*, 2008). L'ensemble des perturbations macroscopiques observées est la résultante :

- De l'interaction du plomb avec les différents composants cellulaires et les macromolécules (protéines, ADN...);
- De la perturbation de nombreux processus physiologiques comme la régulation du statut hydrique, la nutrition minérale, la respiration ou la photosynthèse.

2.3.2 Effets sur les constituants cellulaires

2.3.2.1 Effets sur les enveloppes cellulaires

Comme précédemment évoqué, le plomb peut se fixer, en grandes quantités, sur les composants des parois ou des membranes. Cette fixation conduit notamment à une minéralisation de la paroi (Wierzbicka, 1998). Ce phénomène de minéralisation, défini comme un dépôt d'éléments minéraux au niveau de la paroi (Nultsch *et al.*, 1998), est surtout connu dans le cas de la calcification (dépôt de carbonate ou d'oxalate de calcium) et la silicification (dépôt d'oxydes de silice). La minéralisation pariétale entraîne un changement dans les propriétés physiques et chimiques de la paroi, et en particulier dans sa plasticité. Cette diminution de plasticité affecte de nombreux mécanismes cellulaires comme la division ou l'élongation.

Le plomb ne perturbe pas seulement les enveloppes externes en se liant à elles, il va également désorganiser les réseaux de microtubules, même à de faibles doses (Wierzbicka, 1998; Eun *et al.*, 2000). Cette désorganisation a un impact très important, puisque les microtubules jouent un rôle majeur dans de nombreux processus tels que le trafic intracellulaire, la mitose et la morphogenèse, déterminant la polarité de croissance et la forme des cellules. La conséquence de cette interaction entre le plomb et les microtubules est l'apparition de formes cellulaires anormales et d'inégalités dans les épaisseurs de la paroi (Wierzbicka, 1998). De plus, il est intéressant de noter que cet effet sur les microtubules est

caractéristique du plomb, et ne s'observe pas avec d'autres métaux comme le cuivre ou l'aluminium qui, pourtant, inhibent la croissance (Eun *et al.*, 2000).

Les membranes lipidiques subissent également les effets néfastes du plomb. Bien que les mécanismes d'action ne soient pas connus, le plomb induit de fortes modifications dans les compositions lipidiques des différentes membranes cellulaires (Stefanov *et al.*, 1992; Stefanov *et al.*, 1993; Stefanov *et al.*, 1995a; Stefanov *et al.*, 1995b). Par ailleurs, le plomb induit indirectement, via la production d'ERO, une peroxydation lipidique (Pang *et al.*, 2002; Reddy *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2007a). Ces modifications des lipides membranaires conduisent à l'apparition de structures cellulaires anormales, avec notamment des altérations au niveau de la membrane cellulaire (Islam *et al.*, 2008), mais également de celle des organites comme les mitochondries, les peroxysomes (Małecka *et al.*, 2008) ou les chloroplastes (Choudhury and Panda, 2004 ; Weryszko-Chmielewska and Chwil, 2005; Islam *et al.*, 2007). De fortes concentrations conduisent à la rupture de ces membranes, ce qui, à terme, induit une mort cellulaire.

2.3.2.2 Effets sur les protéines

Comme les autres ETM, le plomb présent dans le cytoplasme interagit avec les protéines. L'action du plomb sur la concentration totale en protéine n'est pas claire, bien que de fortes concentrations puissent diminuer le pool protéique (Jana and Choudhuri, 1982; Mohan and Hosetti, 1997; Saxena *et al.*, 2003; Mishra *et al.*, 2006b). Cette diminution quantitative de la teneur en protéines totales apparaît comme la résultante de plusieurs conséquences de l'action du plomb :

- Modification de l'expression génique (Kovalchuk *et al.*, 2005) et augmentation de l'activité ribonucléasique (Jana and Choudhuri, 1982; Gopal and Rizvi, 2008) ;
- Stimulation de l'activité protéasique (Jana and Choudhuri, 1982) ;
- Diminution de la teneur en acides aminés libres (Xiong *et al.*, 2006), corrélée à une forte perturbation du métabolisme de l'azote (cf. 2.3.4). Cependant, on constate une augmentation de certains acides aminés comme la proline (Saradhi and Saradhi, 1991; Mohan and Hosetti, 1997; Qureshi *et al.*, 2007) qui semble jouer un rôle important dans la tolérance de la plante au plomb (Saradhi and Saradhi, 1991).

De plus faibles concentrations semblent, au contraire, augmenter la teneur en protéines totales (Mishra *et al.*, 2006b). Cette accumulation protéique, limitée aux premiers jours d'exposition, pourrait être la conséquence de la synthèse, par la plante, de protéines de défense contre ce stress métallique, avec notamment des protéines intervenant dans le maintien du statut redox de la cellule comme l'ascorbate, ou dans la séquestration du métal (GSH, PC).

Outre une modification quantitative, le plomb agit sur la composition qualitative des protéines cellulaires. Il modifie le profil protéique des cellules racinaires de fèves exposées au plomb (Beltagi, 2005), ce qui peut être corrélé avec la modification du profil du transcriptome (Kovalchuk *et al.*, 2005). Les ions Pb^{2+} influencent également fortement les activités de nombreuses enzymes intervenant dans différents processus métaboliques. Cette forte interactivité avec les enzymes de la plante est une des causes majeures de la toxicité de ce métal. Le tableau 4 présente quelques exemples de ces interactions Pb^{2+} /enzyme.

Chapitre I : Revue bibliographique

Processus métaboliques	Enzymes	Espèce végétales	Effet	Références	
Synthèse chlorophyllienne	δ- aminolevulinate déshydratase	<i>Phaseolus vulgaris</i>	-	Prasad and Prasad, 1987	
Fixation du CO ₂	Ribulose 1,5 bisphosphate carboxylase/oxygénase	<i>Avena sativa</i> <i>Hordeum vulgare</i>	-	Moustakas <i>et al.</i> , 1997 ; Stiborova <i>et al.</i> , 1986	
	Ribulose 1,5 bisphosphate carboxylase/oxygénase	<i>Pisum sativum</i> (feuilles détachées)	=	Parys <i>et al.</i> , 1998	
	phosphoénolpyruvate carboxylase	<i>Zea mays</i>	-	Vojtechova and Leblova, 1991	
	phosphoénolpyruvate carboxylase	<i>Pisum sativum</i> (feuilles détachées)	=	Parys <i>et al.</i> , 1998	
Cycle de Calvin	Glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase	<i>Spinach oleracea</i>	-	Vallee and Ulmer, 1972	
	Ribulose 5-phosphate kinase	<i>Spinach oleracea</i>	-	Vallee and Ulmer, 1972	
Voie des pentoses phosphates	Glucose-6-phosphate déshydrogénase	<i>Spinach oleracea</i>	-	Vallee and Ulmer, 1972	
Métabolisme de l'azote	Nitrate réductase	<i>Cucumis sativus</i>	-	Burzynski and Grabowski, 1984	
	Nitrogénase	<i>Glycine max</i>	-	Huang <i>et al.</i> , 1974	
	Glutamine synthétase	<i>Glycine max</i>	-	Lee <i>et al.</i> , 1976	
Enzymes nucléolytiques	Désoxyribonucléase	<i>Potamogeton pectinatus</i> <i>Hydrilla verticillata</i>	+	Jana and Choudhuri, 1982	
	Ribonucléase	<i>Potamogeton pectinatus</i> <i>Hydrilla verticillata</i> <i>Raphanus sativus</i>	+	Jana and Choudhuri, 1982 Gopal and Rizvi, 2008	
Protéolyse	Protéase	<i>Potamogeton pectinatus</i> <i>Hydrilla verticillata</i>	+	Jana and Choudhuri, 1982	
Phosphohydrolase	Phosphatase	<i>Potamogeton pectinatus</i> <i>Hydrilla verticillata</i> <i>Glycine max</i> <i>Raphanus sativus</i>	+	Jana and Choudhuri, 1982 Lee <i>et al.</i> , 1976 Gopal and Rizvi, 2008	
		Phytase	<i>Pisum sativum</i>	-	Paivoke, 2002
Métabolisme des sucres	α-amylase	<i>Oryza sativa</i>	-	Mukherji and Maitra, 1976	
	α-amylase	<i>Glycine max</i>	+	Lee <i>et al.</i> , 1976	
Métabolisme énergétique	ATPase	<i>Zea mays</i>	-	Kennedy and Gonsalves, 1989	

Tableau 4 : Effets du plomb sur les activités d'enzymes intervenant dans différents processus métaboliques (modifié d'après Sharma and Dubey, 2005).

2.3.2.2.1 Mécanismes d'inactivation

En règle générale, le plomb inhibe les activités enzymatiques et possède une constante d'inactivation (K_i) comprise entre 10^{-5} et $2 \cdot 10^{-4}$ M, c'est-à-dire que 50 % des activités enzymatiques sont inhibées dans cette gamme de concentration (Seregin and Ivanov, 2001). L'inhibition provoquée par le plomb est la conséquence, généralement, d'une interaction entre le plomb et les groupements -SH de l'enzyme (Seregin and Ivanov, 2001; Sharma and Dubey, 2005). C'est le cas de plus de cent enzymes, dont notamment la Rubisco et la nitrate réductase (bien que dans ce cas la diminution de la quantité de nitrate absorbée soit aussi en cause). Cette inactivation enzymatique est due, soit à une liaison au niveau du site catalytique, soit ailleurs sur la protéine, entraînant une modification de sa structure tertiaire. Le plomb peut également se lier aux groupements -COOH de la protéine et provoquer les mêmes effets.

Le second mécanisme d'interaction avec les protéines concerne les métallo-enzymes. Comme nous le verrons plus en détail (cf. 2.3.4), le plomb peut perturber l'absorption par la plante d'éléments minéraux essentiels pour ces enzymes, comme le zinc, le fer ou le manganèse. Comme les autres cations divalents, il peut également se substituer à ces métaux et causer ainsi l'inactivation d'enzymes. Cette inactivation concerne en particulier l'ALAD, qui participe à la biosynthèse de la chlorophylle, et dont l'inaction par le plomb est un des aspects les plus connus de sa toxicité chez les plantes comme chez les animaux (où cette enzyme participe à la synthèse de l'hème de l'hémoglobine).

Le dernier mécanisme principal d'interaction avec les protéines est un mécanisme indirect et découle de l'impact des ERO sur les protéines. En effet, la présence de plomb dans la plante cause la génération d'ERO et peut endommager les protéines. Cependant, il est difficile d'estimer la part du stress oxydatif dans l'inactivation des enzymes induite par le plomb, car aucune étude n'a porté sur le sujet. Cette part pourrait être non négligeable sur des enzymes, comme la Rubisco, sensibles au stress oxydatif (Leitao *et al.*, 2003). La génération d'ERO dans les plantes au cours d'une exposition au plomb sera évoquée dans la partie « Plomb et stress oxydatif » (cf. 2.4).

2.3.2.2.2 Mécanismes d'activation

Les traitements au plomb stimulent l'activité de certaines enzymes (Tableau 4), mais les mécanismes d'actions ne sont pas connus. Le plomb pourrait moduler l'expression génique de ces enzymes ou bien limiter l'activité de leurs inhibiteurs (Seregin and Ivanov, 2001). Toutefois, dans le cas des protéases et des nucléases, leur activation pourrait être la

conséquence d'une augmentation de la concentration de leurs substrats (due à l'action du plomb) plutôt que d'une interaction directe avec le plomb.

2.3.2.3 Action antimitotique et génotoxique du plomb

L'effet antimitotique du plomb est l'un des aspects les plus connus de sa toxicité. En effet, il y a 80 ans, Hammett (1928) démontrait que le plomb induisait une diminution dose-dépendante de l'activité mitotique dans des cellules de racines d'oignon. Beaucoup plus tard, Wierzbicka (1989; 1994; 1999b) a étudié en détail ce phénomène pour en comprendre les mécanismes (Figure 27). Le premier point important est la liaison des ions Pb^{2+} aux membranes cellulaires et à la paroi, induisant une rigidification de ces structures et perturbant la division cellulaire. Le second point important est la désorganisation des microtubules dont l'organisation est essentielle pour la mitose. L'ajout de plomb induit essentiellement des perturbations aux stades G2 et M de la division cellulaire, conduisant à l'apparition de cellules anormales en stade c-mitose (colchicine-mitose). Ce phénomène serait accentué par l'interaction directe ou indirecte du plomb avec les protéines intervenant dans le cycle cellulaire, comme les cyclines, dont l'activité est dépendante de façon indirecte de la concentration en GSH.

Les perturbations de l'activité mitotique, induites par le plomb, peuvent être transitoires dans certains cas et l'index mitotique revient au niveau de celui du témoin au bout de quelques heures. De plus, de faibles doses de plomb semblent ne pas affecter la mitose de façon significative (Hammett, 1928; Loudes, 2002; Cecchi, 2008).

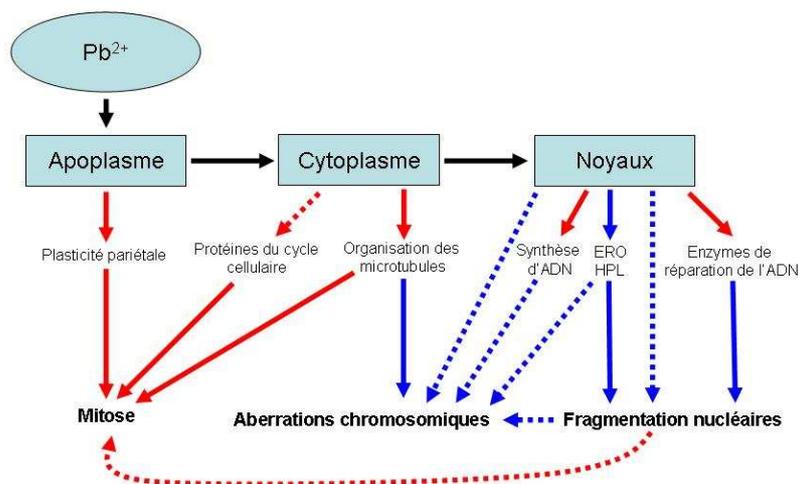


Figure 27 : Représentation des liens avérés (flèches pleines) et potentiels (flèches pointillées) entre le plomb, la mitose et la génotoxicité.

En rouge : interaction négative ; en bleu : interaction positive. En noir : mouvement du plomb. HPL : hydroperoxydes lipidiques.

Si l'action antimitotique du plomb et ses mécanismes sont bien connus chez les plantes, il n'en est pas de même concernant son action génotoxique. Même à de faibles concentrations en métal (qui n'affectent pas la mitose), les traitements au plomb induisent la formation d'aberrations caractéristiques des ETM (Wierzbicka, 1989, 1994; Loudes, 2002; Cecchi, 2008) : formation de ponts chromosomiques durant l'anaphase, perte de fragments acentriques lors de recombinaisons homologues, fragmentation chromosomique et formation de micronoyaux (Figure 28).

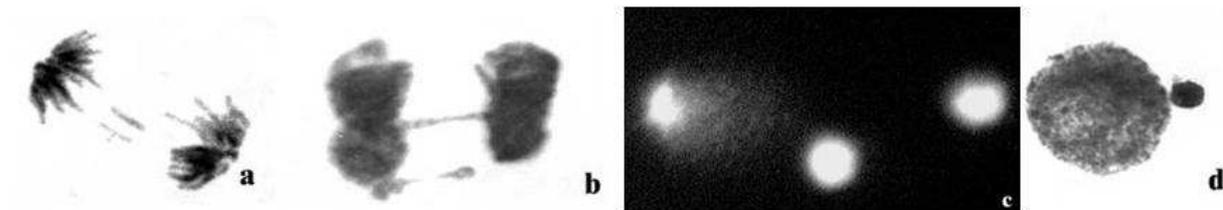


Figure 28 : Aberrations chromosomiques et fragmentation nucléaire dans des cellules de racines : a) perte de fragments de chromosome ; b) ponts chromosomiques ; c) fragmentation nucléaire observée par Comet assay ; d) micronoyau.

Les aberrations chromosomiques peuvent s'expliquer en partie par les perturbations du réseau de microtubules (Figure 27). Le plomb crée des cassures simples et doubles brins sur l'ADN, des liaisons transversales entre ADN-ADN ou ADN-protéines (Rucińska *et al.*, 2004). Très peu de données sont disponibles, et les mécanismes d'actions du plomb (hormis l'interaction avec la tubuline) sont seulement supposés. Chez les mammifères, sa génotoxicité a davantage été étudiée (voir pour revue Silbergeld *et al.*, 2000; Silbergeld, 2003). Le plomb peut pénétrer dans le noyau (Hammett, 1928 ; Małecka *et al.*, 2008) et se lier directement à l'ADN ou indirectement sur les protéines se fixant sur l'ADN. Il semblerait que ce métal n'exerce pas une action génotoxique directement sur l'ADN, lorsqu'on le met en contact avec de l'ADN « nu » (Valverde *et al.*, 2001). Par contre, la fixation du plomb perturbe les mécanismes de réparation de l'ADN, mais également sa synthèse et sa réplication. Le plomb peut également affecter ces mécanismes en remplaçant le zinc dans le motif en doigt de zinc de nombreuses enzymes intervenant sur l'ADN (Gastaldo *et al.*, 2007). L'ensemble de ces effets peut conduire à des perturbations de la mitose et potentiellement induire des aberrations chromosomiques.

Pour résumer, hormis l'action sur la tubuline, rien n'est vraiment clair dans le mécanisme d'action génotoxique du plomb. Le manque de données, tant sur les animaux que sur les plantes, ne permet pas d'analyser cette génotoxicité. Cependant, il apparaît que le

plomb n'agit pas directement sur l'ADN. Plusieurs auteurs ont proposé que l'action indirecte du plomb passe par des médiateurs comme les ERO ou des dérivés des lipides membranaires oxydés, comme le MDA (Valverde *et al.*, 2001; Fracasso *et al.*, 2002; Wozniak and Blasiak, 2003; Xu *et al.*, 2008).

2.3.3 Statut hydrique

De nombreuses études ont mis en évidence une perturbation importante du statut hydrique des plantes traitées au plomb. Elles ont principalement relevé une diminution de la transpiration, y compris à de faibles doses, ainsi qu'une diminution de la teneur en eau (Barcelo and Poschenrieder, 1990; Wozny *et al.*, 1995 ; Sayed, 1999). Les chercheurs travaillant sur ce thème ont proposé plusieurs explications à ces effets observés. En premier lieu, la diminution de la croissance des feuilles conduit à un amoindrissement de la surface foliaire qui est la zone principale de transpiration de la plante (Iqbal and Mushtaq, 1987 ; Weryszko-Chmielewska and Chwil, 2005). Au niveau des feuilles, les stomates des plantes traitées au plomb sont de plus petites tailles (Weryszko-Chmielewska and Chwil, 2005). Toutefois, les plantes semblent pouvoir s'adapter à ces deux effets, en développant une plus grande densité de stomates (Kosobrukhov *et al.*, 2004; Weryszko-Chmielewska and Chwil, 2005).

Comme précédemment évoqué, le plomb peut minéraliser la paroi cellulaire, diminuant ainsi sa plasticité, et par conséquent influençant le potentiel hydrique de la cellule. Ce phénomène est accentué par la diminution observée des concentrations en molécules maintenant la turgescence cellulaire comme les sucres et les acides aminés (Lane *et al.*, 1978; Barcelo and Poschenrieder, 1990). Cette modification du potentiel hydrique cellulaire, en particulier au niveau des cellules de garde, pose des problèmes de régulation d'ouverture et de fermeture des stomates. Pour maintenir la turgescence de ces cellules, la plante synthétise massivement des osmolytes, et en particulier de la proline (Saradhi and Saradhi, 1991; Mohan and Hosetti, 1997; Qureshi *et al.*, 2007).

Le mécanisme d'ouverture/fermeture est sous le contrôle d'une phytohormone, l'acide abscissique ou ABA (Roelfsema and Hedrich, 2005). La présence d'ions Pb^{2+} entraîne une forte accumulation d'ABA dans les racines et les parties aériennes (Parys *et al.*, 1998; Atici *et al.*, 2005), induisant la fermeture des stomates (Stefanov *et al.*, 1993; Kosobrukhov *et al.*, 2004; Weryszko-Chmielewska and Chwil, 2005). Cette fermeture limite fortement les échanges gazeux avec l'atmosphère, et par conséquent les pertes hydriques par transpiration

(Parys *et al.*, 1998; Vassil *et al.*, 1998). La transpiration de la plante, via des pores foliaires est également limitée par le dépôt d'une couche de cuticule sur la surface des feuilles, consécutivement à une exposition au plomb (Weryszko-Chmielewska and Chwil, 2005). Pour résumer les données précédentes, le plomb limite les pertes en eau de la plante par transpiration. Cette limitation de la transpiration, moteur principal de la circulation de la sève brute et par conséquent d'eau, conduit à une diminution de la teneur en eau des plantes.

2.3.4 Nutrition minérale

La diminution de la transpiration limite les flux d'eau à travers la plante. La conséquence principale est la limitation de l'absorption racinaire de la solution de sol. Or, c'est dans cette solution de sol que la plante puise les éléments minéraux essentiels à sa croissance. La limitation de ce flux induit, *de facto*, une modification de l'absorption des éléments minéraux.

L'analyse des données bibliographiques met en évidence des différences significatives entre éléments minéraux dans la réponse au plomb de la plante (Tableau 5). S'il n'est pas possible de tirer des conclusions définitives, au vu de la faible quantité d'études portant sur le sujet, quelques tendances se dégagent. Il apparaît clairement, que le plomb diminue la concentration des ions divalents au niveau des feuilles (Zn^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+}). La même tendance est observée pour le fer et le soufre. Par contre, il n'est pas possible de dégager des tendances nettes concernant les racines. Alors que la réponse des parties aériennes semble commune, la répartition des éléments dans les racines semble conditionnée par le type de plante ou l'intensité du stress.

Les éléments bibliographiques ne permettent pas de comprendre quels sont les mécanismes d'actions du plomb sur la répartition minérale. En effet, il n'est pas possible de déterminer si la diminution de concentration de certains minéraux, observée dans les feuilles, est due à une moindre absorption racinaire, à une moindre translocation vers les parties aériennes ou à une mobilisation et une modification de la répartition de ces éléments dans la plante. Tatar et collaborateurs (1998; 1999) ont mis en évidence qu'un traitement au plomb diminuait fortement la quantité de fer présente dans la sève de concombre. Cependant, du fait du manque de certaines données (comme la concentration en fer dans les racines et les feuilles), cette expérimentation ne permet d'écarter aucune hypothèse, les trois pouvant coexister.

Elément	Partie de la plante	Effet	Références
Ca	Aérienne	↓	Khan and Khan, 1983 ; Burzynski, 1987; Breckle and Kahle, 1992; Cseh <i>et al.</i> , 2000; Małkowski <i>et al.</i> , 2002; Antosiewicz, 2005
	Racinaire	↓↑	
Cu	Aérienne	↓	Khan and Frankland, 1983; Khan and Khan, 1983; Burzynski and Grabowski, 1984; Paivoke, 2002; Sinha <i>et al.</i> , 2006
	Racinaire	↓↑	
Mg	Aérienne	↓	Khan and Khan, 1983; Burzynski and Grabowski, 1984; Breckle and Kahle, 1992; Cseh <i>et al.</i> , 2000; Paivoke, 2002
	Racinaire	↑	
Fe	Aérienne	↓	Khan and Frankland, 1983; Khan and Khan, 1983; Burzynski and Grabowski, 1984; Sinha <i>et al.</i> , 2006; Gopal and Rizvi, 2008
	Racinaire	↓↑	
Zn	Aérienne	↓	Khan and Frankland, 1983; Khan and Khan, 1983; Cseh <i>et al.</i> , 2000; Geebelen <i>et al.</i> , 2002; Paivoke, 2002
	Racinaire	↓↑	
Mn	Aérienne	↓	Khan and Khan, 1983; Burzynski and Grabowski, 1984; Breckle and Kahle, 1992; Cseh <i>et al.</i> , 2000; Paivoke, 2002
	Racinaire	↔	
K	Aérienne	↓↑	Khan and Khan, 1983; Breckle and Kahle, 1992; Małkowski <i>et al.</i> , 2002; Paivoke, 2002; Rucinska and Gwozdz, 2005
	Racinaire	↓	
N	Aérienne	↓	Burzynski and Grabowski, 1984; Kevresan <i>et al.</i> , 2001; Małkowski <i>et al.</i> , 2002; Rucinska and Gwozdz, 2005; Xiong <i>et al.</i> , 2006
	Racinaire	↓	
P	Aérienne	↓↑	Garcia <i>et al.</i> , 2006; Sinha <i>et al.</i> , 2006; Gopal and Rizvi, 2008
	Racinaire	↓↑	
S	Aérienne	↓	Paivoke, 2002; Sinha <i>et al.</i> , 2006; Gopal and Rizvi, 2008
	Racinaire	↓↑	

Tableau 5 : Effets du plomb sur la concentration en éléments minéraux des parties aériennes et racinaires.

↓ signifie que la concentration mesurée a diminué consécutivement à un traitement au plomb, ↑ qu'elle a augmenté, ↔ qu'elle n'a pas été modifiée ; ↓↑ signifie que les données disponibles sont contradictoires et ne permettent pas de dégager une tendance générale. En grisé apparaissent les éléments dont la concentration est modifiée significativement par l'apport de plomb.

Certains éléments minéraux (K et N) ne voient pas leur absorption modifiée de la même manière (Tableau 5). Des facteurs autres que la diminution du flux d'eau semblent entrer en ligne de compte. En effet, l'ion K⁺ est le seul ion dont la concentration diminue dans les racines, sans que cela n'affecte formellement sa concentration dans les parties aériennes. L'interaction avec le plomb semble vraiment spécifique et pourrait s'expliquer par la taille

très proche du rayon de ces deux ions (1,29 Å pour Pb^{2+} contre 1,33 Å pour K^+). Il pourrait y avoir une forte compétition pour leur entrée dans la plante, via les canaux potassiques.

Le cas de l'azote est également un cas à part. La diminution générale de la quantité d'azote inorganique constatée dans l'ensemble de la plante a plusieurs explications :

- Perturbation de son absorption comme les autres minéraux ;
- Perturbation du métabolisme de l'azote en diminuant l'activité de certaines enzymes clés (cf. 2.3.2.2) ;
- Augmentation de la synthèse d'acides aminés (proline) et de protéines (GSH) jouant un rôle dans la tolérance au métal et contenant de l'azote.

2.3.5 Photosynthèse

Chez les plantes, l'exposition au plomb conduit à une forte inhibition de la photosynthèse, du rendement photosynthétique, et à une limitation du taux d'assimilation de CO_2 . Le rendement photosynthétique, très sensible, peut chuter de plus de 50 % (Huang *et al.*, 1974; Bazzaz *et al.*, 1975; Poskuta *et al.*, 1987; 1988). Cette inhibition s'explique par la diminution des teneurs en chlorophylles et en caroténoïdes généralement constatée (Kosobrukhov *et al.*, 2004; Irfan Qureshi *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2007; Gopal and Rizvi, 2008). La chlorophylle b semble plus sensible que la chlorophylle a (Kacabova and Natr, 1986; Stiborova *et al.*, 1986; Wozny *et al.*, 1995 ; Vodnik *et al.*, 1999). Toutefois, ces effets varient en fonction des espèces végétales.

Les mécanismes de réduction de la teneur pigmentaire sont, en partie, élucidés. Le plomb induit l'activité chlorophyllase dans les feuilles (Drazkiewicz, 1994; Figure 29.1), mais le mécanisme principal semble être l'inactivation de la synthèse de ces pigments. Le plomb interagit à ce niveau de deux façons : (i) d'une façon directe, en se substituant aux ions divalents liés aux métallo-enzymes. C'est notamment le cas avec l' δ -aminolevulinate déshydratase ou ALAD qui est à la base de la synthèse des chlorophylles et dont l'ion Zn^{2+} est remplacé par Pb^{2+} (Figure 29.2) ; (ii) d'une façon indirecte, en induisant une carence en ces ions divalents (Figure 29.3). Il est, par exemple, admis que les chloroses foliaires sont généralement le signe d'une carence en fer indispensable à la synthèse des chlorophylles (Foy *et al.*, 1978).

La diminution observée de l'activité photosynthétique est souvent bien supérieure à la diminution observée dans les teneurs en pigments. Ainsi, le plomb pourrait agir à d'autres niveaux (Bazzaz *et al.*, 1975; Stiborova *et al.*, 1986; Poskuta *et al.*, 1987; 1988; 1996). Au

niveau structural, comme évoqué précédemment, le plomb induit des déformations dans les structures des chloroplastes, plus sensibles que les mitochondries (Choudhury and Panda, 2004 ; Weryszko-Chmielewska and Chwil, 2005; Islam *et al.*, 2007). Il provoque également un changement dans la composition des lipides de la membrane chloroplastique (Stefanov *et al.*, 1995c), dont les propriétés physico-chimiques sont, de fait, modifiées. Par ailleurs, le plomb, lorsqu'il pénètre dans le chloroplaste, peut se lier à la membrane chloroplastique. Ces différents types d'interactions perturbent en particulier les flux d'électrons de la chaîne de transport d'électrons (Figure 29.4).

Le plomb, en induisant une fermeture des stomates, limite considérablement les flux gazeux entre les feuilles et le milieu extérieur (Figure 29.5). Cette limitation du flux de CO₂ entrant est considérée comme la cause principale de la forte réduction de la fixation du CO₂ observée (Bazzaz *et al.*, 1975; Parys *et al.*, 1998). Avec les mêmes mécanismes d'interactions que vu précédemment, le plomb peut également inhiber certaines enzymes intervenant dans le cycle de Calvin (Figure 29.6).

Du fait de la diminution de la concentration de certains minéraux observée dans les feuilles, le plomb perturbe fortement les photosystèmes. En effet, ceux-ci contiennent des centres Fe-S, également présent dans plusieurs molécules intervenant dans la photosynthèse (cytochrome b6f, ferrédoxine : Figure 29.7). De plus, le complexe producteur d'oxygène contient quatre atomes de manganèse (Figure 29.8), la plastocyanine contient du cuivre (Figure 29.9) et les chlorophylles sont constituées d'un noyau tétrapyrrolique avec un atome de magnésium en son centre (Figure 29.10). Le plomb peut également interagir directement avec ces molécules, en se substituant à leurs ions divalents et ainsi perturber la chaîne photosynthétique.

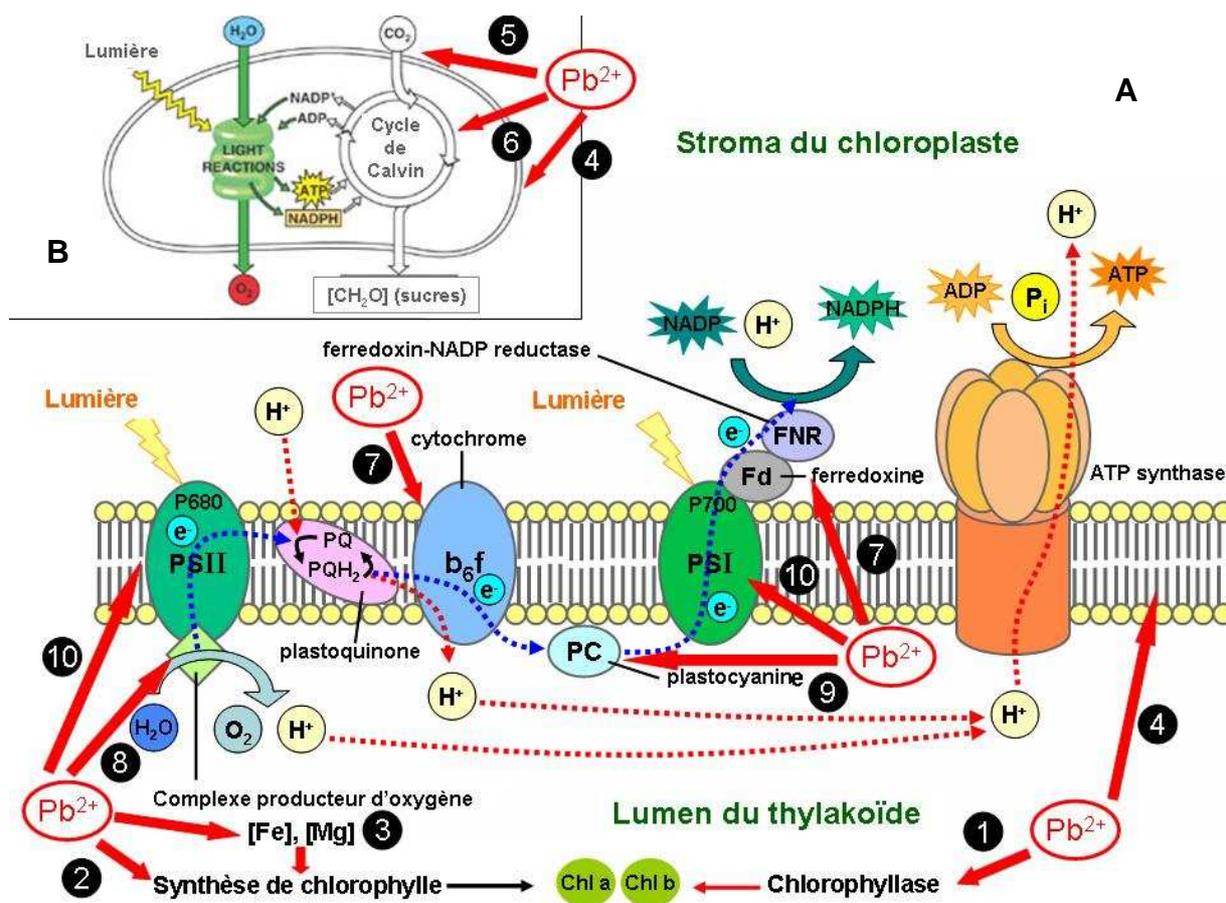


Figure 29 : Représentation schématique et simplifiée de la chaîne photosynthétique (A) et d'un chloroplaste (B).

Les interactions possibles avec le plomb sont indiquées par des flèches rouges et des numéros. Le détail est donné dans le texte.

2.3.6 Respiration

Contrairement à l'activité photosynthétique, l'effet du plomb sur l'activité respiratoire a été peu étudié (Seregin and Ivanov, 2001). L'ensemble des études concernant les feuilles, l'effet des ions Pb²⁺ sur l'activité respiratoire des racines reste inconnu. Des feuilles de pois traitées avec du nitrate de plomb voient leur concentration en CO₂ augmenter de façon significative (Parys *et al.*, 1998). Cette augmentation résulte de la diminution de l'activité photosynthétique et de l'augmentation de la respiration. La respiration foliaire est la résultante de la respiration sombre (mitochondriale) et de la photorespiration effectuée par la Rubisco au niveau des chloroplastes. Romanowska et collaborateurs (2002) ont mis en évidence que l'augmentation de la respiration, induite par les ions Pb²⁺, était uniquement due à la respiration sombre. La photorespiration ne serait pas affectée (Romanowska *et al.*, 2002)

voire inhibée (Poskuta *et al.*, 1987; Poskuta *et al.*, 1988). L'augmentation globale de la respiration conduit à une élévation de la concentration en ATP pouvant correspondre à un besoin élevé d'énergie de la plante pour lutter contre les effets du métal.

La stimulation de la respiration sombre par le plomb a été observée sur des plantules de pois (Łukaszek and Poskuta, 1998), des feuilles détachées ou des protoplastes de pois et d'orge (Parys *et al.*, 1998; Romanowska *et al.*, 2002; 2005; 2006). Il a été proposé, pour expliquer ce phénomène, que dans les conditions d'une fixation moindre du CO₂, les équivalents redox produits par la photosynthèse pourraient être transférés aux mitochondries et ainsi augmenter la respiration (Poskuta *et al.*, 1996). Plusieurs études ont montré que ce phénomène était un phénomène courant, même en condition de culture normale (voir pour revue Kromer, 1995).

A de fortes concentrations, le plomb a un fort effet inhibiteur sur la chaîne respiratoire. Cette inhibition peut être la conséquence de la fixation du plomb sur la membrane mitochondriale, perturbant le transport d'électron (Bittell *et al.*, 1974) et pouvant conduire à un découplage de l'étape de phosphorylation, comme c'est le cas pour le cadmium ou le zinc (Romanowska, 2002).

2.4 Plomb et stress oxydatif

Chez les organismes aérobies, la production d'une grande quantité d'ERO, et la génération du stress oxydatif qui en découle, sont parmi les aspects les plus connus et les plus précoces de la toxicité des ETM. Cette génération d'ERO induite par les métaux a été particulièrement étudiée chez l'homme en raison du potentiel génotoxique et cancérigène de ces ERO (Stohs and Bagchi, 1995; Ercal *et al.*, 2001; Galaris and Evangelou, 2002; Valko *et al.*, 2006). Chez les plantes, l'absorption d'ETM conduit également à la génération d'un stress oxydatif (Foy *et al.*, 1978; Briat and Lebrun, 1999; Schutzenhubel and Polle, 2002; Clemens, 2006b). Si la toxicité des ERO est bien connue chez les plantes, le lien entre la production de ces molécules induite par les métaux, et la toxicité générale de ceux-ci n'a pas été attentivement étudié. Ceci est particulièrement vrai pour le plomb.

Chez les plantes, le traitement avec du plomb, induit une augmentation de la production d'H₂O₂ et d'O₂⁻ (Malecka *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2007; Przymusiński *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2007a). La détection de ces molécules est plus aisée en travaillant sur cultures cellulaires. Sur plantes entières, il est possible d'estimer indirectement le niveau de production d'ERO et du stress oxydant généré, en mesurant l'activité des enzymes antioxydantes, ou le taux de

peroxydation lipidique, qui sont des biomarqueurs du stress oxydatif (Seregin and Ivanov, 2001; Sharma and Dubey, 2005). En règle générale, les enzymes du cycle Asada-Halliwell-Foyer, les SOD et les POX sont activées, quelle que soit l'intensité du stress plombique et sa durée. L'idée d'une flambée oxydative induite par le plomb est renforcée par l'étude de la peroxydation lipidique qui se révèle corrélée à l'augmentation des activités antioxydantes. Le plomb stimule également l'expression génique des lipoxygénases (Pourrut, 2003) ainsi que leur activité (Mishra and Choudhuri, 1999; Rucinska and Gwozdz, 2005; Huang *et al.*, 2008).

Le cas de la catalase est complexe, puisque la moitié des publications rapporte une inhibition de son activité par le plomb (Verma and Dubey, 2003; Choudhury and Panda, 2004; Seregin *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2007; Dey *et al.*, 2007; Hu *et al.*, 2007; Qureshi *et al.*, 2007; Gopal and Rizvi, 2008). L'autre moitié montre une augmentation de l'activité de cette enzyme (Malecka *et al.*, 2001; Pang *et al.*, 2002; Ruley *et al.*, 2004a; Reddy *et al.*, 2005; Mishra *et al.*, 2006b). Cette inhibition semble être uniquement dépendante de l'espèce traitée et non de l'organe étudié, de la durée ou de l'intensité du traitement. L'inhibition de l'activité catalasique a été constatée lors de différents stress, aussi bien chez les végétaux que chez les levures et les humains. Pour tous les organismes étudiés, cette inhibition n'est pas une règle générale. L'origine de ce phénomène est toujours largement débattue. Shim et collaborateurs (2003) ont montré que chez les végétaux, l'activité de la CAT était régulée négativement par l'acide salicylique (AS). Cette régulation négative concomitante à celle de l'APX, est connue pour se dérouler lors de stress biotique (Klessig *et al.*, 2000). Cette hypothèse ne semble pas être valable dans le cas des métaux, puisque l'inhibition de la CAT est généralement corrélée à une activation de l'APX. De plus, le taux d'AS ne semble pas être régulé par un stress métallique (Landberg and Greger, 2002). Par ailleurs, lorsque la CAT est inhibée, ce mécanisme est dose-dépendant. La CAT étant une métallo-enzyme, son inhibition pourrait être due à une interaction directe avec le plomb.

Concernant les antioxydants non enzymatiques (ASC, GSH, Vit E), les différentes études présentent des résultats contradictoires, leur teneur étant, soit augmentée, soit diminuée suite à un traitement au plomb (Gupta *et al.*, 1995; Morelli and Scarano, 2001; Choudhury and Panda, 2004; Ruley *et al.*, 2004b; Mishra *et al.*, 2006b; Ruciska-Sobkowiak and Pukacki, 2006; Qureshi *et al.*, 2007). Le faible nombre de données disponibles ne permet pas de tirer de conclusions à leur propos.

Bien que la production d'ERO, induite par le plomb, chez les plantes, soit un phénomène bien connu, les mécanismes conduisant à cette production n'ont jamais été étudiés. Depuis une dizaine d'année, des chercheurs commencent à s'intéresser aux sources d'ERO lors de stress métalliques. Plusieurs études ont mis en évidence le rôle des NADPH-oxydases (NOX) membranaires dans la réponse au cadmium, au nickel et au cuivre (Romero-Puertas *et al.*, 1999; Quartacci *et al.*, 2001; Olmos *et al.*, 2003; Romero-Puertas *et al.*, 2004; Garnier *et al.*, 2006; Hao *et al.*, 2006; Maksymiec and Krupa, 2006). Ces enzymes semblent jouer un rôle majeur dans la réponse aux métaux lourds. Cependant, d'autres sources enzymatiques sont possibles. En effet, les peroxydases (POX) extracellulaires joueraient un rôle dans la flambée oxydative induite par le cadmium, le cuivre, le cobalt et l'aluminium (Simonovicova *et al.*, 2004a; Tamás *et al.*, 2006), et les oxalate-oxydases (OxO) dans la réponse au cadmium et l'aluminium (Simonovicova *et al.*, 2004b; Simonovicova *et al.*, 2005). Groppa et collaborateurs (2007) ont également montré que l'activité des amine-oxydases à cuivre (CuAO) était modulée par le cadmium et le cuivre. Cependant, ces auteurs n'ont pas montré si ces enzymes participaient ou non à la flambée oxydative.

La redondance des systèmes de génération d'ERO ne rend pas aisée la détermination de la source responsable de la production d'ERO lors d'un stress plomb. Par analogie avec les autres métaux, la NOX est particulièrement suspectée. La production simultanée d'ERO par plusieurs sources enzymatiques n'est pas non plus à exclure (Mika *et al.*, 2004). Une fois la première flambée oxydative passée, il arrive souvent qu'une deuxième puisse être générée après quelques heures d'exposition à un stress, soit par les mêmes systèmes de production, soit par d'autres systèmes indépendants des premiers (Mika *et al.*, 2004). Le stress oxydatif peut se poursuivre dans le temps et dans l'espace avec une libération de peroxydes lipidiques et des productions d'ERO intracellulaire cette fois, comme par exemple au niveau des mitochondries (Garnier *et al.*, 2006).

Synthèse et objectifs de l'étude

Le plomb est un élément naturellement présent dans les sols. Sa teneur, variable entre 2 et 200 mg.kg⁻¹, est en moyenne de 32 mg.kg⁻¹. Cependant, la concentration en plomb de la solution du sol est en règle générale 1 000 à 10 000 fois moins concentrée que celle du sol. Certaines activités anthropiques sont responsables d'une contamination croissante des sols et de l'eau par ce métal, et peuvent augmenter de façon très importante sa concentration dans les sols. Les écosystèmes, soumis à l'influence humaine, et en particulier les plantes du fait de leur immobilité, sont exposés à ces concentrations croissantes. Les plantes peuvent absorber une partie du plomb par voie foliaire, mais la grande majorité l'est par les racines. Parallèlement à leur alimentation hydrique et minérale, elles puisent dans la solution de sol la fraction de plomb phytodisponible. Cette fraction est faible par rapport à la quantité totale présente dans le sol, mais peut conduire à une accumulation importante dans les racines. Cette accumulation racinaire est la conséquence du rôle filtrant et protecteur de cet organe et de la faible mobilité biologique du plomb. En effet, une fois pénétré dans la racine, le plomb est transporté presque exclusivement par la voie apoplastique, et sa translocation vers les parties aériennes est limitée par la barrière que constitue l'endoderme. De plus, le plomb se lie fortement aux enveloppes externes des cellules, et seulement une faible proportion se trouve sous forme soluble. Cependant, une faible quantité de ce métal peut pénétrer dans le symplaste. Les cellules végétales possèdent différents systèmes de détoxification, comme la synthèse de molécules chélatrices (phytochélatines), la séquestration dans différents compartiments cellulaires ou l'excrétion dans l'apoplaste. Malgré ces mécanismes de protection, le plomb induit une grande variété d'effets délétères se traduisant par une forte perturbation des processus physiologiques (croissance, photosynthèse, nutrition minérale...).

La toxicité d'une molécule ou d'un ETM sur un organisme peut être évaluée à plusieurs niveaux de temps (Figure 30). L'étude des effets visibles, à des temps courts, sur des organismes exposés à de fortes concentrations, permet d'évaluer la toxicité aiguë. L'étude des effets d'expositions répétées ou continues, sur des temps plus longs (10 à 20 % de la vie d'un organisme), met en évidence la toxicité chronique de la molécule. Enfin, un dernier type de toxicité est la toxicité génétique. La mesure des effets génétiques à court terme d'un polluant permet d'évaluer les répercussions potentielles à long ou très long terme sur un organisme.

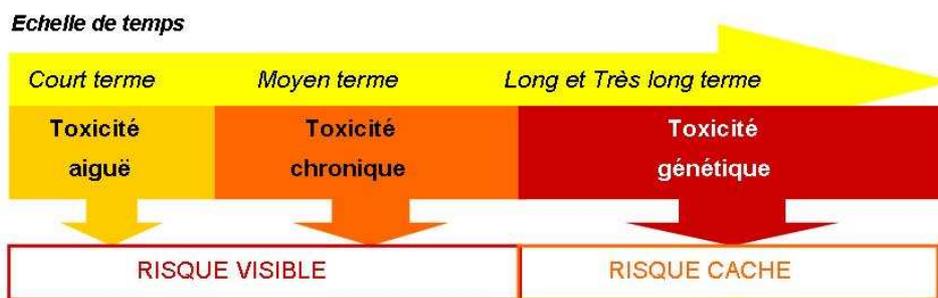


Figure 30 : Représentation des différents niveaux d'évaluation des risques pour les écosystèmes (d'après Bispo *et al.*, sous presse).

Concernant le plomb, la toxicité chronique a été particulièrement bien étudiée, en particulier sur les plantes potagères et les céréales, pour des raisons économiques et de santé publique évidentes. En conséquence, la grande majorité des données obtenues concernent l'accumulation du plomb dans les différents organes et ses effets sur la croissance et le rendement des plantes. Les différentes études entreprises ont toutefois permis de caractériser les effets délétères du plomb sur les différents processus physiologiques.

La toxicité aiguë du plomb sur les végétaux a, elle aussi, été très étudiée. Cependant, en regardant avec attention les différentes études, il apparaît que la très grande majorité de celles-ci n'ont aucune significativité d'un point de vue environnemental. En effet, la plupart des auteurs utilisent des concentrations en plomb 10 à 10 000 fois supérieures aux concentrations les plus importantes relevées dans des sites très contaminés (mines, industries métallurgiques). Si l'on exclut ces études, il reste très peu de données disponibles concernant la toxicité du plomb. Ce manque de données est encore plus flagrant concernant la toxicité génétique de ce métal. De plus, dans ce dernier cas, au manque quantitatif de données, s'ajoutent des doutes concernant leur qualité (absence d'écart type, de test statistique).

Si dans certains cas la toxicité du plomb a bien été évaluée, peu de données sont disponibles concernant les mécanismes conduisant à cette toxicité. La production d'espèces réactives de l'oxygène peut être envisagée comme étant l'un des principaux mécanismes possibles. En effet, chez les animaux, ces ERO sont considérées comme l'une des principales causes de la toxicité des ETM (Stohs and Bagchi, 1995; Kasprzak, 2002). Chez les plantes, même à de faibles concentrations, le plomb génère des ERO. Cependant, ni leurs sources, ni leur lien avec la toxicité observée du plomb n'ont été encore mis en évidence.

L'objectif de ce travail de thèse était double : évaluer la toxicité de concentrations réalistes en plomb sur plantes entières, et déterminer les mécanismes conduisant à cette toxicité. Pour réaliser ces objectifs, nous avons procédé en trois étapes :

- détermination de la toxicité du plomb sur une plante entière (*Vicia faba*). Pour cela, nous avons utilisé une dose réaliste de plomb, 10 μM , correspondant à la concentration en plomb de la solution d'un sol très contaminé. Nous avons étudié la toxicité, à court terme, de cette concentration en plomb, au travers de plusieurs marqueurs d'impact et de stress : concentration en pigments photosynthétiques, peroxydation lipidique, activités des enzymes antioxydantes, concentration en glutathion et en phytochélatines ;

- détermination des sources produisant des ERO lors d'un stress plomb. Pour cela, nous avons utilisé des inhibiteurs pharmacologiques des enzymes générant des ERO et nous avons étudié leurs effets :
 - dans les premières minutes de contact avec le plomb, sur la production de la flambée oxydative ;
 - dans les premières heures de traitement, sur la toxicité caractérisée précédemment à l'aide de biomarqueurs ;

- détermination des mécanismes de la génotoxicité du plomb, en s'intéressant plus particulièrement à la relation entre cette génotoxicité et la génération d'ERO précédemment caractérisée. Pour cela, nous avons étudié les différents effets du plomb sur l'ADN de cellules racinaires de fèves, en présence ou non d'antioxydants : l'effet clastogène par le test des micronoyaux et les cassures induites sur l'ADN par le Comet assay.

Chapitre II :

Matériel et Méthodes

1 Choix de l'espèce végétale

La fève (*Vicia faba*), de la famille des fabaceae, a été choisie en raison de son utilisation au laboratoire comme plante modèle pour des études de toxicologie de différents polluants (Loudes, 2002; Pourrut, 2003; El Hajjouji *et al.*, 2007; Marcato, 2007; Cecchi, 2008). De plus, l'utilisation de *Vicia faba* présente de nombreux intérêts : croissance rapide, biomasse importante, sensibilité aux métaux et taille cellulaire importante qui facilite l'utilisation de la technique des micronoyaux. A l'échelle internationale, son utilisation dans des études d'écotoxicologie est croissante depuis plusieurs années. En particulier, le test des micronoyaux a été largement utilisé, du fait de sa sensibilité et de sa simplicité. Ce test, particulièrement sensible aux contaminations métalliques, a été normalisé par l'AFNOR en 2004 (AFNOR NF T 90-327).

2 Condition de culture et échantillonnage

Les graines de *Vicia faba* de type "aguadulce", conservées à l'obscurité en chambre froide (4 °C), sont mises à hydrater pendant vingt-quatre heures dans de l'eau, à température ambiante. Elles sont ensuite écosées, rincées à l'eau puis plongées dans une solution d'hypochlorite de calcium à 1 % pendant dix minutes pour éliminer toute contamination fongique. Après plusieurs rinçages à l'eau déminéralisée, les graines sont mises à germer dans des bacs, sur papier filtre surélevé par une plaque de polystyrène compacté et imbibé d'eau. Les bacs de germination sont ensuite placés, pendant trois à quatre jours, dans une armoire à germination, à l'obscurité, à 22 °C et avec un taux d'humidité de 100 %.

Les plantules sont alors transférées dans un dispositif de culture hydroponique en phytotron permettant une croissance optimale des végétaux (Figure 31). En effet, toutes les conditions de culture sont contrôlées : la luminosité (14 heures de jour / 10 heures de nuit), la température (24 °C le jour / 20 °C la nuit) et l'hygrométrie (70 % d'humidité le jour / 75 % d'humidité la nuit). La nutrition minérale est assurée par une solution nutritive de Hoagland (annexe 1). Les racines sont régulièrement oxygénées par un système de bullage.

Après deux semaines, les plantes (5^{ème}-6^{ème} étage foliaire) sont placées en bac individuel pour subir les divers traitements. Afin d'étudier les effets du plomb après une courte exposition, les plantes sont plongées dans une solution nutritive contenant du plomb.



Figure 31 : Conditions de cultures de *Vicia faba*.

A la fin de l'expérience, un échantillonnage est effectué à la fois sur les feuilles et sur les racines immédiatement congelées dans l'azote liquide. La réponse des organes au stress peut varier en fonction de leur âge. Lors des différentes expérimentations, pour éviter de telles variations entre les feuilles de différents étages foliaires ou entre racines, les échantillons sont broyés grossièrement afin d'homogénéiser le tout. Les échantillons sont alors conservés à -80 °C. Ce pré-broyage ne modifie pas la quantité de protéines présentes dans les échantillons, ni le profil de ces protéines observé sur gel de polyacrylamyle 1D, ou encore le niveau d'activité de certaines enzymes, même après deux mois de conservation (Saint-Martin and Pourrut, 2005).

3 Principes d'étude de l'impact du plomb sur la fève

Dans cette partie du « Matériels et méthodes », les manipulations, dont le protocole n'a pas été détaillé dans les articles, sont expliquées en détail. Dans le cas des autres expérimentations, nous nous attacherons à seulement en évoquer le principe.

3.1 Minéralisation des végétaux et dosages du plomb

Après récolte, les différents organes des végétaux sont déshydratés par séchage à 80 °C pendant 48 heures. Dans le cas des racines, le plomb lié au rhizoderme est préalablement éliminé par des bains dans de l'acide chlorhydrique faiblement concentré. Les racines sont plongées dans 40 mL d'une solution d'HCl à 0,001 M et placées sur une table à agitation pendant trois minutes. De l'HCl à 1 M (360 µL) est ensuite ajouté pour ajuster la concentration de la solution à 0,01 M. Le mélange d'HCl et racines est de nouveau soumis à

une agitation, durant cinq minutes. Les racines sont ensuite rincées plusieurs fois à l'eau déminéralisée avant d'être déshydratées.

Après déshydratation, les échantillons sont réduits en poudre très fine au moyen d'un broyeur à bille. Les échantillons subissent ensuite une minéralisation acide par voie humide, qui consiste à permettre la solubilisation des éléments métalliques après la digestion complète, à chaud, de la matière organique par un mélange d'acide nitrique et de peroxyde d'hydrogène concentré. Pour cela, 0,125 g de matériel végétal broyé et bien sec sont mélangés avec 5 mL d'acide nitrique à 65 % puis placés dans un minéralisateur DigiPREP (SCP Sciences).

Cet appareil de digestion est équipé d'une sonde de température, placée dans un tube de référence, permettant de travailler à une température adaptée au point d'ébullition du mélange de digestion. Les échantillons subissent une montée en température de trente minutes jusqu'à 80 °C où le mélange reste pendant une heure. Une heure de refroidissement permet ensuite un retour à température ambiante, et 5 mL de peroxyde d'hydrogène (30 volumes) sont alors ajoutés. Les mélanges sont à nouveau chauffés pendant 180 minutes à 80 °C après une montée en température de trente minutes. Après refroidissement complet, les échantillons sont filtrés, puis dilués de façon à ce que la teneur en acide soit inférieure à 10 %, pour pouvoir être analysés par ICP-OES. La qualité des résultats est validée grâce à l'utilisation d'un matériau de référence (feuilles de tabac Virginia, CTA-VTL-2, ICHTJ contenant une concentration en plomb de $22,1 \pm 1,2 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ d'échantillon).

3.2 Evaluation de la peroxydation lipidique

Le niveau de peroxydation lipidique a été évalué par deux techniques, l'une mesurant les hydroperoxydes par le test FOX2, l'autre le MDA avec le test TBARS (Thiobarbituric reactive species). Le test TBARS est le test le plus couramment utilisé pour déterminer indirectement la peroxydation des lipides, en mesurant le MDA (Hodges *et al.*, 1999). Le MDA est extrait dans une solution hydro-alcoolique, à 4 °C et à l'obscurité. Le MDA est alors mis à incuber à 95 °C avec l'acide thiobarbiturique, en présence d'hydroxytoluène butylé (HTB) pour éviter toute oxydation du mélange. La réaction entraîne la formation d'un complexe de couleur rouge entre deux molécules d'acide thiobarbiturique (Figure 32). Les teneurs, évaluées spectrophotométriquement et calculées d'après les équations de Hodges et collaborateurs (1999), ont finalement été exprimées en nanomoles de TBARS par grammes de poids frais.

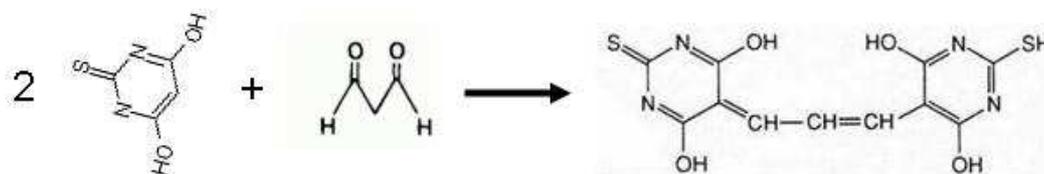
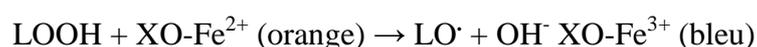


Figure 32 : Réaction entre le MDA et l'acide thiobarbiturique.

Bien qu'il soit le plus couramment employé, ce test présente deux inconvénients majeurs. Le premier est qu'il ne réagit pas spécifiquement avec le MDA, et de nombreuses molécules peuvent interagir avec l'acide thiobarbiturique. Le second est qu'il n'est pas du tout adapté aux racines de végétaux, car le MDA est formé essentiellement à partir de lipides comportant au moins trois doubles liaisons (Halliwell and Gutteridge, 1999). Or, les tissus racinaires contiennent très peu d'acides gras avec au moins trois doubles liaisons. Dans les feuilles, ce test tend également à sous-estimer la peroxydation lipidique, puisque les tissus foliaires contiennent une grande proportion d'AGPI 16:0, 16:1 et 18:2.

Parallèlement à ce test, nous avons donc mesuré la teneur en hydroperoxydes lipidiques (LOOH) en utilisant le réactif FOX2 (Griffiths *et al.*, 2000). La méthode au xylénol orange (XO ; 3,3,2 -Bis[N,N-bis(carboxyméthyl)aminométhyl]-o-cresolsulfonephthalein tetrasodium) repose sur l'oxydation en milieu acide des ions ferreux en ions ferriques par les hydroperoxydes de l'échantillon :



Le complexe coloré, formé entre les ions ferriques et le xylénol orange, possède un maximum d'absorption à 560-580 nm et sa teneur, calculée d'après le coefficient d'extinction molaire ($\epsilon = 6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) défini par Gay et collaborateurs (1999), est exprimée en mmol de LOOH par gramme de poids frais.

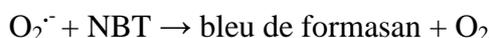
3.3 Extraction et dosage des pigments foliaires

Les chlorophylles a, b et les caroténoïdes, extraits à l'obscurité et à 4 °C à l'aide d'un mélange hydro-acétonique, ont été dosés par spectrophotométrie. Les teneurs calculées d'après les équations de Lichtenthaler (1987) ont finalement été exprimées en μg de pigment par cm^2 de feuille extraite.

3.4 Extraction, dosage des protéines et activités enzymatiques

Les feuilles et racines de fèves sont broyées dans l'azote liquide. Ce broyat est resuspendu dans un tampon phosphate d'extraction contenant un mélange d'anti-protéases. Après centrifugation, et afin d'éliminer les débris cellulaires, le culot est resuspendu dans ce même tampon. La concentration en protéines totales est déterminée par spectrophotométrie d'après la méthode de Bradford (1976).

Les activités enzymatiques sont évaluées par spectrophotométrie, en suivant l'évolution de l'absorbance de milieu réactionnel due à l'oxydation de leur co-substrat (ascorbate pour l'APX, gaïacol pour la gaïacol peroxydase GPOX, NADPH pour la GR) ou la réduction du substrat (H₂O₂ pour la CAT). L'évaluation de l'activité SOD est différente. Le milieu réactionnel contient une molécule photosensibilisatrice (la riboflavine) et une molécule capable d'être réduite par O₂⁻ (le nitrobleu de tétrazolium). L'éclairage intense du milieu réactionnel induit l'oxydation de la riboflavine qui cède un électron au dioxygène pour former un anion superoxyde interagissant avec le NBT, incolore, pour former du bleu de formasan (bleu). L'activité de la SOD limite la formation de ce bleu de formasan et est évaluée en pourcentage d'inhibition par rapport à un contrôle dépourvu de SOD.



Les activités sont calculées en μmol de substrat oxydé ou réduit. $\text{min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ de protéine. L'activité SOD est donnée en unité. mg^{-1} de protéine, une unité correspondant à la capacité d'inhiber 50 % du formasan formé dans le tube témoin.

3.5 Evaluation des phytochélatines et du glutathion

3.5.1 Extraction des thiols et dérivation

Le dosage des PC et du GSH est effectué selon la méthode de Tang et collaborateurs (2000) modifiée par Courbot et collaborateurs (2004). Ces expérimentations ont été réalisées au laboratoire LIEBE de l'Université de Metz.

Les échantillons prélevés sont pesés précisément (500 mg de matériel), puis placés dans des tubes Eppendorf plongés dans l'azote liquide. Des billes de 1 mm de diamètre sont rajoutées au tube, et l'échantillon est pré-broyé rapidement avec un piston. 1,2 mL de solution

d'extraction (5 mM DTPA, 5 % acide sulfosalicylique, SSA) sont ensuite ajoutés, et les tubes sont passés au broyeur à bille (Retsch MM301) trois fois durant dix secondes (à 5 000 tpm). Le tampon d'extraction permet d'extraire les thiols tout en limitant leur oxydation et en déprotéinant l'extrait par précipitation due au SSA. Le broyat est ensuite récupéré dans d'autres tubes Eppendorf, et centrifugé à 15 000 g pendant dix minutes à 2 °C. Seul le surnageant contenant les thiols est récupéré pour le dosage. A cette étape de l'expérimentation, les surnageants peuvent être congelés et conservés plusieurs semaines à -80 °C, si l'on souhaite différer le dosage.

Les échantillons sont prélevés (100 µL) et placés dans un tube Eppendorff contenant 20 µL de NaOH (2 M) et 270 µL de tampon borate (0,5 M, pH 8,5). Une vérification du pH (devant être de 9) permet d'effectuer une première vérification du bon déroulement de l'expérimentation. Si le pH diffère de 9, il est possible de l'ajuster, mais il faudra alors tenir compte de ce nouveau facteur de dilution. L'ajout de 50 µL d'une solution TBP (tri-n-butylphosphine), à 5 % dans une solution de DMF (N,N-dyméthylphormamide), permet de rendre le milieu réducteur et de réduire les ponts disulfures. Les tubes sont ensuite fermés sous un courant d'azote pour éviter la réoxydation du milieu et le tout est mélangé au vortex. Les échantillons ainsi préparés sont placés au bain-marie à 50 °C pendant cinq minutes. Cette étape constitue la phase de réduction. Pour la phase de dérivation, il faut ajouter 30 µL d'ABD-F (7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazole-4-sulfonamide ; 11,5 mM) et replacer les tubes au bain-marie à 50 °C pendant vingt minutes. La réaction est bloquée en refroidissant rapidement l'échantillon dans de la glace et en y ajoutant 70 µL d'HCl (1 M). Après un mélange au vortex, le pH (≈ 1) est vérifié pour s'assurer du bon déroulement de la dérivation.

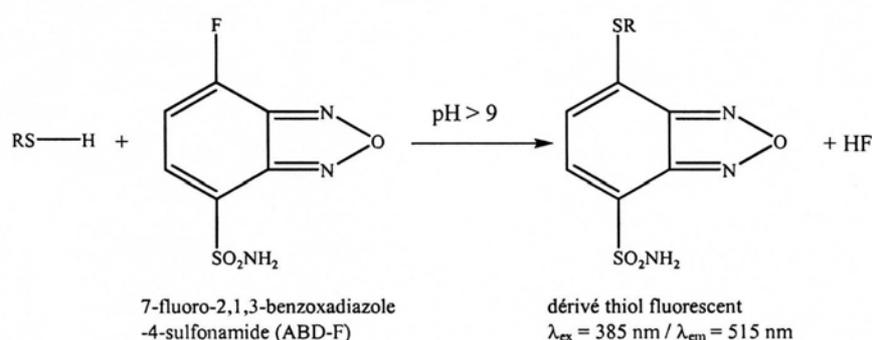


Figure 33 : Dérivation des groupements thiols par l'ABD-F (d'après Courbot *et al.*, 2004).

3.5.2 Analyse HPLC des groupements thiols dérivés

Les échantillons dérivés sont placés dans des flacons pour injecteur automatique (Gilson) pour l'analyse en chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC). L'appareil HPLC couplée à un détecteur spectrofluorométrique détecte les dérivés thiols fluorescents. Ils ne doivent pas être injectés dans un délai excédant douze heures à 4 °C. Pour le dosage, un volume de 20 µL de chaque échantillon est injecté dans le système HPLC, préalablement réglé et équilibré :

- Température du plateau < 4 °C
- Température de colonne = 40 °C
- Débit phase mobile = 0,4 mL.min⁻¹
- $\lambda_{\text{excitation}} = 385 \text{ nm}$ / $\lambda_{\text{émission}} = 515 \text{ nm}$
- Gain = 100 (largeur de fente : 40 nm)
- Gradient utilisé (Figure 34)

La chromatographie liquide haute performance en phase inversée a été réalisée sur une colonne C18 Nucleosil 100 (250 mm × 3 mm D.I.) avec une phase mobile A composée d'un mélange acide trifluoroacétique (TFA) / eau (1:1000, v/v) et une phase mobile B composée d'un mélange acétonitrile / TFA / eau (500:1:500, v/v/v). Le profil de gradient de phases est le suivant :

- De 0 à 5 min : 20 % B
- De 5 à 20 min : 20 à 40 % B
- De 20 à 50 min : 40 à 100 % B
- De 50 à 55 min : 100 % B
- De 55 à 60 min : 100 à 20 % B
- De 60 à 80 min : 20 % B

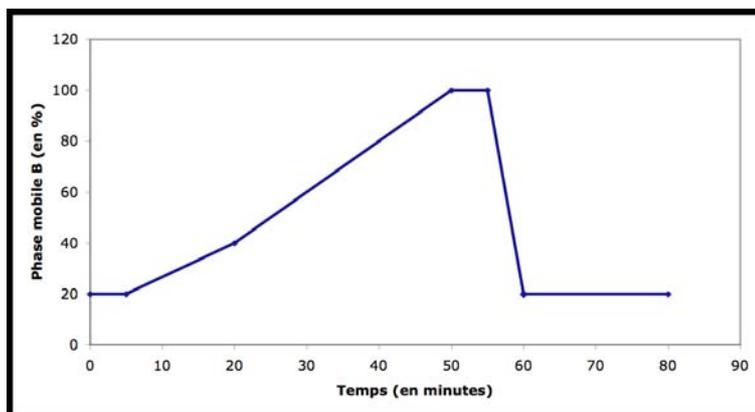


Figure 34: Profil du gradient de phases.

Cette méthode HPLC met en jeu le partage à polarité de phase inversée avec gradient d'élution eau-TFA/eau-TFA-acétonitrile couplée à une détection spectrofluorimétrique. La limite de quantification de la méthode est de 0,1 µmole et la variabilité est de 1 à 2 %. Les thiols sont quantifiés grâce à des courbes de calibration réalisées à partir de solutions des GSH et de PC₂ pré-dosées du laboratoire LIEBE.

3.6 Evaluation de la production d'ERO par chimioluminescence

Pour déterminer la production d'ERO, plusieurs types d'agents chimiques peuvent être utilisés notamment la lucigénine, le luminol et l'isoluminol. Le luminol (5-amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazinedione) a été utilisé pour détecter les métabolites actifs de l'oxygène par chimioluminescence. Il pénètre la membrane plasmique et permet de mesurer la production d'espèces réactives de l'oxygène à l'extérieur et à l'intérieur des cellules. En présence d'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) ou de radical hydroxyle ($\cdot OH$), il produit du 3-aminophtalate, du diazote et émet une lumière dont la longueur d'onde d'émission se situe à 425 nm. Le luminol peut également potentiellement réagir avec l' H_2O_2 mais dans nos conditions expérimentales, l'ajout de différentes concentrations de cet ERO n'induit aucune réaction lumineuse.

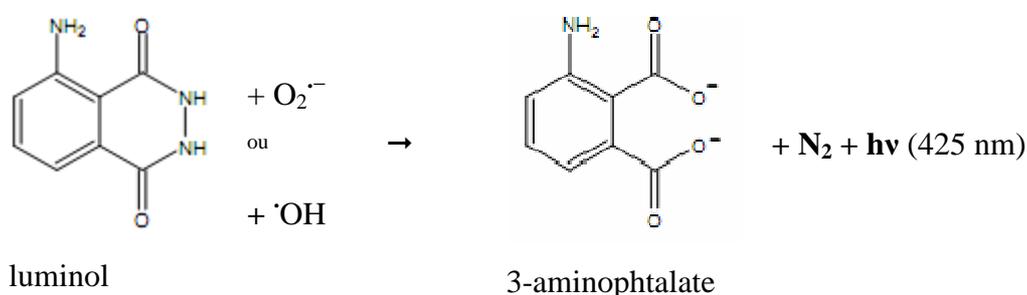
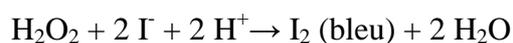
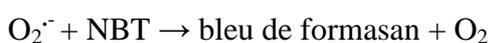


Figure 35 : Mécanisme de production de lumière par interaction entre le luminol et les ERO.

L'émission de photons provenant de la réaction de chimioluminescence est quantifiée grâce à un luminomètre très sensible, doté d'un tube photomultiplicateur permettant d'amplifier les très faibles émissions lumineuses.

3.7 Détection histochimique des ERO

Les échantillons de feuilles et de racines sont découpés en lamelles (200 μm) à l'aide d'un microtome. Ces lamelles sont très rapidement déposées sur une lame de microscope et colorées, à froid et à l'obscurité, pendant cinq minutes, soit avec une solution de NBT (0,5 mM) pour détecter les anions superoxydes (Frahry and Schopfer, 2001), soit avec une solution d'iodure de potassium (0,5 M) et d'amidon (4 % m/v) pour détecter le peroxyde d'hydrogène (Saint-Martin and Pourrut, 2005). Dans les deux cas, la réaction entre l'ERO et le réactif entraîne la formation d'un composé bleu facilement détectable au microscope :



Les lames sont ensuite rincées à l'eau UHQ et le surplus de liquide est absorbé avec du papier absorbant. Les lames sont analysées immédiatement au microscope, car la coloration évolue après une dizaine de minutes. En raison du stress que peut créer la découpe, des lamelles provenant d'organes de plantes témoins sont systématiquement analysées en parallèle. L'analyse des lames est seulement qualitative et ne permet pas une quantification des ERO détectés.

Une autre technique de détection histochimique de l' H_2O_2 existe. Il utilise le tétraméthyl benzidine et est plus sensible que la technique KI+amidon (Barcelo, 1998). Cependant, elle repose sur l'oxydation de ce substrat par des peroxydases présentes dans l'échantillon. Les expérimentations sont réalisés sur des plantes traitées au plomb et au DPI, un inhibiteur pharmacologique des NOX mais qui peut également inhiber certaines peroxydases. Pour cette raison, nous avons choisi d'utiliser la coloration au KI+amidon.

3.8 Test des micronoyaux

3.8.1 Principe

Lors de la mitose, des fragments de chromosomes ou des chromosomes entiers n'ayant pas subi la ségrégation ne rejoignent pas le noyau principal pendant la télophase, et peuvent être observés au microscope sous forme de petits noyaux sphériques séparés du noyau principal, appelés micronoyaux. Les fragments d'ADN donnant naissance aux micronoyaux peuvent avoir pour origine, soit des lésions de l'ADN (effets clastogènes ou aneugènes de composés génotoxiques), soit l'action de poisons mitotiques.

Le test est effectué selon la norme AFNOR NF T90-327. De ce fait, les conditions de culture et l'âge des plantes utilisées diffèrent légèrement par rapport aux expérimentations précédentes. Après avoir été écosées et désinfectées, les graines de fèves sont mises à germer dans du coton. L'apex de la racine primaire est sectionné pour stimuler le développement des racines secondaires. Après trois jours, les plantules sont transférées dans une solution de Hoagland pour une durée de quatre jours avant le début des expérimentations.

Les racines de plants de fèves sont exposées pendant six heures, soit à différentes concentrations en plomb, soit à 40 μ M d'hydrazide maléique (témoin positif). Cette phase de traitement est suivie par une phase de récupération de vingt-quatre heures. Un groupe de plantes est laissé dans la solution d'Hoagland (témoin négatif). Pour déterminer l'implication

des ERO sur la clastogénicité du plomb, une partie des plantes a été prétraitée pendant une heure dans une solution de Hoagland contenant de l' α -tocophérol (10 μ M).

A la fin des traitements, les apex racinaires sont lavés, coupés puis immergés pendant une nuit dans une solution de Carnoy I, également appelée solution de Farmer (mélange d'acide acétique glacial et d'éthanol en proportion 1:3) qui permet de fixer les cellules en métaphase. Après une hydrolyse acide des racines, les cellules sont étalées sur une lame en verre et leur ADN est coloré avec une solution d'orcéine.

3.8.2 Analyse des résultats

Les observations sont réalisées au moyen d'un microscope Olympus BX41 avec un grossissement x 40 équipé d'une caméra Q imaging FA1394-RETIGA Exi permettant un comptage différé. L'analyse des lames (Figure 36) permet de dénombrer le nombre total de cellules, le nombre de cellules en division (mitose) et de cellules comportant un micronoyau. Ce comptage permet de calculer : (a) un index mitotique (IM, exprimé en %) ou pourcentage de cellules en mitoses ; (b) la fréquence de micronoyaux (MN, exprimée en ‰). Pour être pris en compte, les micronoyaux ne doivent ni excéder les deux tiers de la taille du noyau, ni être en contact avec ceux-ci. Le nombre de cellules analysées est d'environ 2 500 cellules par plante (500 cellules par lame). Le niveau de significativité des résultats est analysé par le test de Tukey.



Figure 36 : Cellules racinaires de *Vicia faba* après préparation selon le protocole normalisé.

Le test est soumis à deux critères de validité:

- L'indice mitotique doit être supérieur à 2 % pour être dans une zone de division cellulaire (Ma *et al.*, 1995).
- Le témoin positif doit donner un nombre de micronoyaux significativement supérieur au témoin négatif.

3.9 Comet assay

3.9.1 Principe

La fragmentation de l'ADN, naturelle ou induite par des polluants, peut être étudiée par électrophorèse de noyaux sur des micro-gels d'agarose, appelée Comet assay. Sur cellules végétales, ce test diffère sensiblement de son homologue sur cellules animales au niveau de l'extraction et de l'isolement des noyaux. En effet, chez les cellules végétales, du fait de leur paroi, il n'est pas possible d'extraire les cellules puis d'isoler les noyaux par des voies enzymatiques ou chimiques, sous peine de dégrader l'ADN. La technique la plus simple et la plus efficace consiste à isoler mécaniquement les noyaux, en coupant l'organe étudié très finement dans un tampon (Gichner *et al.*, 2004). Le tampon, dans lequel se retrouvent les noyaux isolés, est filtré sur un filtre en nylon de 20 μm pour enlever les débris les plus importants et les cellules entières. Le filtrat est ensuite mélangé à de l'agarose avant d'être déposé en fine couche sur une lame de microscope. Le rendement de ce type d'extraction est évidemment très limité, puisqu'il n'est possible d'obtenir qu'une centaine de noyaux par lame, contre plusieurs milliers dans le cas des cellules animales. Il faut prendre une extrême précaution durant la manipulation, en travaillant sous la lumière d'une lampe inactinique.

Les noyaux fixés dans l'agarose passent ensuite par une étape de dénaturation dans une solution de soude très concentrée qui permet de décondenser l'ADN, avant de subir une électrophorèse à une tension définie (Figure 37). Les fragments d'ADN vont migrer à partir des noyaux, formant une queue en direction de l'anode, donnant ainsi aux noyaux endommagés l'apparence d'une comète.

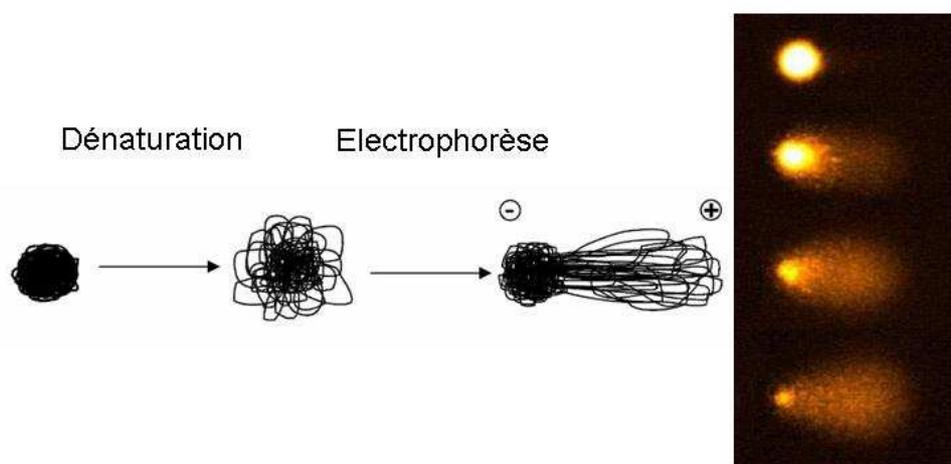


Figure 37 : Représentation schématique d'un noyau subissant les étapes de dénaturation et d'électrophorèse du Comet assay. A droite : exemple de plusieurs niveaux de dégâts observés (d'après Gichner, Données non publiées).

Ce test Comet, qui permet de mesurer les dommages de l'ADN, peut également être effectué en conditions non-alcalines (neutres). Cependant, l'utilisation de conditions alcalines permet d'observer plus de dégâts sur l'ADN : ruptures d'ADN simples et doubles brins ainsi que les lésions alkali-labiles.

3.9.2 Précisions techniques

Pour pouvoir comparer les résultats obtenus avec ceux issus du test MN, les plantes utilisées pour les tests Comet sont cultivées de la même manière. Le Comet assay étant un test très sensible, son paramétrage est une étape critique permettant de l'adapter à la plante étudiée. Les différents paramètres de cette expérimentation ont été optimisés en utilisant du peroxyde d'hydrogène comme témoin positif. L'hydrazide maléique n'a pas été employé, car malgré son pouvoir génotoxique, et pour une raison encore inconnue, il n'induit pas de cassure sur les brins d'ADN (Gichner, 2003). Cette mise au point a permis, en particulier, de fixer les temps de dénaturation et d'électrophorèse à quinze minutes. La courbe de calibration est présentée en Annexe 2.

Nous avons utilisé deux types de Comet assay. Le premier est le Comet assay classique, dit cellulaire, durant lequel les noyaux sont extraits à partir de plantes témoins et traitées. La deuxième technique, dite acellulaire, consiste à extraire les noyaux seulement à partir de

plantes témoins. Les traitements sont effectués *a posteriori* directement sur les lames, une fois les noyaux fixés dans l'agarose. Cette variante permet d'observer l'effet direct d'une substance sur la molécule d'ADN. La substance étudiée est mise en solution dans une solution d'incubation (généralement du Tris 400 mM). Cependant, dans le cas des métaux, se pose un problème de précipitation. Nous avons donc dû paramétrer cette technique pour trouver une solution possédant les deux caractéristiques suivantes :

- éviter la précipitation du plomb
- ne pas endommager les noyaux témoins

Ces pré-expérimentations ont permis de choisir une solution contenant 1 M de NaCl et 10 mM de Tris-HCl (pH 7,5). Le niveau basal des témoins négatifs acellulaires est un peu plus élevé que celui des témoins négatifs cellulaires. Le plomb a donc été solubilisé dans cette solution d'incubation. Le peroxyde d'hydrogène a également été utilisé comme témoin positif et a été dilué dans cette solution d'incubation. La courbe dose-réponse de l' H_2O_2 est également présentée en Annexe 2.

Les résultats du Comet assay pouvant varier d'une façon non négligeable entre deux expérimentations, des noyaux de plantes témoins sont systématiquement et simultanément extraits avec ceux des plantes traitées. Ils suivent le même protocole et sont mis à migrer en parallèle, dans la même cuve d'électrophorèse. Les résultats obtenus à partir des plantes traitées sont toujours pondérés par rapport à ceux des plantes contrôles obtenus au cours de la même expérimentation.

3.9.3 Analyse des résultats

Les observations des noyaux s'effectuent au moyen d'un microscope Olympus BX41 avec un grossissement x 20 équipé d'une caméra Q imaging FA1394-RETIGA Exi. Pour chaque échantillon, trois lames sont réalisées et 100 noyaux par lame sont analysés grâce au logiciel Komet 5.1. Il existe plusieurs paramètres pouvant être mesurés et comparés, comme par exemple la longueur de la queue de la comète, le pourcentage d'ADN dans la queue ou le Tail Moment (pourcentage d'ADN dans la queue x taille de la queue) ou encore l'Olive Tail Moment (distance entre le centre de gravité du noyau et le centre de gravité de la queue x pourcentage d'ADN dans la queue). Les Tail Moment donnent souvent les meilleurs résultats doses réponses, mais ils ne permettent pas de comparer les résultats entre les différents

laboratoires (Andrew Collins, communication personnelle). Seul le pourcentage d'ADN dans la queue permet de pouvoir comparer les divers résultats expérimentaux. C'est pourquoi nous utiliserons ce paramètre de mesure.

Chapitre III :

Impact du plomb

sur la fève

Synthèse de phytochélatines et défenses antioxydantes chez *Vicia faba* en réponse à une exposition de courte durée au plomb

-Avant-propos-

La littérature concernant la réponse précoce des plantes à des concentrations réalistes de plomb est quasi inexistante. L'objectif de cette première étude était donc de caractériser l'impact de concentrations de plomb réalistes sur des racines et des feuilles de fèves. Pour cela, nous avons choisi d'étudier plusieurs biomarqueurs de stress régulièrement utilisés dans la littérature pour caractériser l'état physiologique des plantes :

- activités des enzymes antioxydantes qui reflètent indirectement la production d'ERO dans l'organisme ;
- taux de peroxydation lipidique qui révèle le niveau de stress oxydatif ;
- concentration en GSH qui est marqueur du statut redox cellulaire ;
- teneurs en pigments photosynthétiques (chlorophylles a et b, caroténoïdes) qui sont très sensibles à différents types de stress.

Pour pouvoir éventuellement corréler les divers effets observés aux concentrations en plomb contenues dans les différents organes, nous avons mesuré l'absorption racinaire de plomb et sa translocation vers les parties aériennes. Enfin, nous avons également évalué la réponse spécifique de la plante au plomb, en dosant les concentrations en phytochélatines dans les racines et parties aériennes. En effet, en dehors des voies de réponses communes à de nombreux stress que les métaux activent, la synthèse de PC est la seule réponse vraiment spécifique des plantes à un stress métallique.

D'un point de vue pratique, la première étape fut de sélectionner un mode de culture. Nous avons choisi de cultiver et d'exposer les fèves au plomb en conditions de cultures contrôlées (cultures hydroponiques en phytotron). Le choix de conditions de cultures contrôlées s'est imposé de fait, puisque l'objectif des étapes suivantes de ces travaux de thèse était d'essayer de déterminer les mécanismes d'actions du plomb. Ce choix nous a affranchi

des différents biais que peuvent introduire les cultures en plein champ (variations climatiques, caractéristiques du sol, interactions biotiques, présence d'autres contaminants).

La seconde étape de notre travail fut ensuite de choisir les concentrations de plomb à utiliser. L'analyse de la bibliographie (Jopony and Young, 1994) et les résultats acquis au laboratoire (Cecchi, 2008) nous ont permis de choisir une gamme de concentrations, allant de 1 à 20 μM , représentatives de la concentration de solutions de sols échantillonnées sur des sites fortement contaminés par des activités anthropiques. Cependant, les études préliminaires de mises au point et de calibrations des différentes expérimentations ont révélé la lourdeur d'une telle étude, en particulier l'analyse des activités antioxydantes. Cette étude ne représentant que l'étape initiale du travail de thèse, nous avons décidé de n'étudier les effets que d'une seule concentration en plomb sur une cinétique d'exposition courte (1, 4, 8, 12 et 24 heures d'exposition). Des travaux antérieurs menés au laboratoire ont démontré qu'une concentration de 10 μM de plomb ne générerait pas d'effet phytotoxique visible, mis à part une légère nécrose apicale, induisait l'expression génique de lipoxygénases (Pourrut, 2003), conduisait à la formation d'ERO (Perchet, 2003) et se révélait génotoxique, mais non cytotoxique (Loudes, 2002). Nous avons donc choisi d'utiliser cette concentration qui présentait également l'avantage de se situer au milieu de la gamme que nous avons prédéfinie.

-Publication-

Pourrut B., E. Béraud, S. Prouet, S. Cotelle, C. Dumat and E. Pinelli. Soumise à Chemosphere. Phytochelatin synthesis and antioxidative defense in *Vicia faba* following short-term exposure to lead.

Phytochelatin synthesis and antioxidative defense in *Vicia faba* following short-term exposure to lead

Bertrand Pourrut¹, Eric Béraud², Sébastien Prouet¹, Sylvie Cotelle², Camille Dumat¹ and Eric Pinelli^{1*}

***Corresponding author: pinelli@ensat.fr**

¹ EcoLab UMR 5245 CNRS-UPS-INPT, ENSAT Avenue de l'agrobiopole-Auzeville-Tolosane BP 107- F 31 326 Castanet-Tolosan Cédex.

² LIEBE, UMR 7146 CNRS, Université Paul Verlaine - Metz, Av. Delestraint, F-57070 Metz, France

Abstract

Early effects of an environmentally realistic concentration of lead (10 μM) in *Vicia faba* were assessed by measuring antioxidant enzymes activities (SOD, CAT, GPOX, APX and GR), phytochelatins (PC) synthesis and GSH content, lipid peroxidation and photosynthetic pigments levels. In roots, results show that Pb induced two transient oxidative bursts which lead to lipid peroxidation. GSH content was not significantly modulated whereas PC synthesis was quickly and strongly induced. This synthesis was strongly correlated ($r^2 = 0,898$) to Pb accumulation. Our data also revealed the importance of glutathione reductase which appeared to be the key enzyme to cope with Pb toxicity, by maintaining GSH pool constant.

Our data demonstrate that Pb translocation from root to shoot was very low. However, Pb^{2+} induced an oxidative burst after 8 h of treatment. This oxidative burst coincided with the stimulation of lipid peroxidation and the decrease of photosynthetic pigments. By contrast with roots, it appeared to be more intense and not transient. These results highlight the high sensibility of leaves to low concentration of lead.

Our results also show that PC accumulation in leaves was strongly and quickly induced in absence of the metal. However, mechanism of this accumulation and its purpose remain unclear.

Key words: antioxidative enzyme, glutathione, glutathione reductase, lipid peroxidation, Pb, reactive oxygen species.

Abbreviations: APX, ascorbate peroxidase; BHT, butylated hydroxytoluene; CAT, catalase; GPOX, guaiacol peroxidase; GR, glutathione reductase; GSH, reduced glutathione; GSSG, oxidised glutathione; LHPO, lipid hydroperoxides; MDA, malondialdehyde; NBT, Nitro Blue Tetrazolium; PC, phytochelatins; PCS, phytochelatin synthase; ROS, Reactive oxygen species; SOD, superoxide dismutase; TBARS, Thiobarbituric acid reactive substances; *Vf*, *Vicia faba*.

1 Introduction

Lead (Pb) is one of the major widespread toxic metals found in the environment with potential danger to human health and to ecosystems. Plants can uptake Pb from soil solution by roots but, the largest proportion of Pb^{2+} is accumulated in roots in an insoluble form (Ernst, 1998; Wierzbicka *et al.*, 2007). Marmioli *et al.* (2005) suggest that plants possess two common mechanisms to confine Pb where it can do less harm to the plant: (i) cell wall sequestration (Wierzbicka, 1998) or isolation of lead from the cytoplasm with a membrane (Wierzbicka *et al.*, 2007; Małecka *et al.*, 2008); (ii) synthesis of phytochelatins (PC) inducible by the presence of lead (Mehra *et al.*, 1995; Piechalak *et al.*, 2002) and which may play a role in lead sequestration into plant vacuoles (Piechalak *et al.*, 2003).

Despite these detoxification systems, lead can cause a broad range of physiological and biochemical dysfunctions on the plant growth, water status, mineral nutrition or nitrate assimilation (Seregin and Ivanov, 2001; Sharma and Dubey, 2005). Although Pb transport from plant roots to shoots is usually very low (Huang and Cunningham, 1996), photosynthesis is especially affected by lead exposure (Huang *et al.*, 1974; Bazzaz *et al.*, 1975). In particular, Pb^{2+} ions decrease chlorophylls and carotenoids contents, photosynthetic rate and CO_2 assimilation.

Mechanisms of lead toxicity remain partially unclear. Evidence over the last three decades, using *in vivo* and *in vitro* models, has pointed to the involvement of reactive oxygen species (ROS) generation resulting in an unbalanced cellular redox status (Sharma and Dubey, 2005; Maksymiec, 2007; Pourrut *et al.*, 2008). This modification of redox status could lead to the alteration of proteins and nucleic acids or the peroxidation of biomembranes. Lipid peroxides and malondialdehyde (MDA), one of the decomposition products of polyunsaturated fatty acids of membrane, are regarded as reliable indicators of oxidative stress (Griffiths *et al.*, 2000; Demiral and Turkan, 2005). However, plants contain a complex antioxidant system to eliminate ROS (Apel and Hirt, 2004; Mittler *et al.*, 2004), including antioxidant such as reduced glutathione (GSH), ascorbate or α -tocopherol (Vitamin E), or antioxidant enzymes such as superoxide dismutase (SOD, EC 1.15.1.1), catalase (CAT, EC 1.11.1.6), peroxidases and the enzymes involved in the ascorbate–glutathione cycle: ascorbate peroxidase (APX, EC 1.11.1.1) and glutathione reductase (GR, EC 1.6.4.2).

Despite the large number of publications available on lead toxicity on plants, few are known about the effect of “low” concentrations of Pb^{2+} . Indeed, the largest proportion of studies dealing with this topic, used around millimolar concentrations of lead, often in nutrient

solution. These amounts of lead are largely higher than those which can be found in soil solution, even in polluted sites. Jopony and Young (1994) showed that Pb concentration, in soil solution of 100 Pb-polluted soils, range between around 17 nM and 17 μ M. Moreover, little is known about the early physiological response of lead-treated plants. Malecka *et al.* (2001) showed that millimolar concentration of Pb lead induced an oxidative burst in pea roots only after 2 h of treatment. In a previous work, we demonstrated that a low concentration of Pb(NO₃)₂ (10 μ M) also quickly generated an oxidative burst in *Vicia faba* (Vf) roots (Pourrut *et al.*, 2008).

The present study aims to investigate the effects of this environmentally realistic concentration of lead (10 μ M) on Vf seedlings, following a short-term exposure by measuring: (i) lead uptake and translocation; (ii) effects of Pb and lead-induced oxidative stress on lipid peroxidation level, photosynthetic pigments contents and antioxidant enzymes (SOD, CAT, GR, APX and GPOX); (iii) modulation of GSH pool and induction of PC synthesis

2 Materials and methods

2.1 Plant material and treatments

Vicia faba were germinated on filter paper moistened with deionised water at 25 °C in darkness. After 7 d, the plants were grown in aerated Hoagland solution. To keep the nutrient composition and pH constant, solutions were renewed daily. After a growth period of two weeks, the plants were exposed to low concentrations of lead (10 μ M) for 1, 4, 8, 12 and 24 h. The culture systems were located in a growth chamber with day/night air temperatures of 24/22 °C and relative humidity of 70/75%. Plants were lit 16 h per day by a 600 W Osram Nav-T Super High Pressure Sodium Lamp providing a minimum photosynthetic photon flux density of 500 μ mol.m⁻².s⁻¹ at the top of the plant.

After the treatments, the plants were harvested. The roots and leaves were rapidly washed in distilled water, flash frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C until required for further analysis.

2.2 Evaluation of lead content

Lead content in roots and leaves was evaluated by ICP-OES, after a mineralization step with concentrated HNO₃ and H₂O₂, as previously described (Pourrut *et al.*, 2008).

2.3 Evaluation of lipid peroxidation

To attempt to determinate the lead-induced oxidative damages on membrane, lipid derivates were evaluated by two methods. Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) were determined according to Hodges *et al.* (1999) and lipid hydroperoxides (LHPO) were analyzed using FOX2 assay, according to Griffiths *et al.* (2000).

2.4 Pigment extraction and analysis

For each leaf sample, the determination of pigment content was achieved from analysis of 4 foliar discs of 1.131 cm² each. Each disc was ground with liquid nitrogen. Pigments were extracted by incubating leaves in 5 mL acetone 80 % (v/v) for 24 h at 4 °C in darkness. The absorbance of leaf pigment extracts was measured at 470, 646.8 and 663.2 nm. Concentrations of chlorophyll a, b, total chlorophylls (a+b) and total carotenoids were calculated according to extinction coefficients and equations reported by Lichtenthaler (1987). Finally, data were averaged and the mean concentration obtained was expressed as µg.cm⁻² of leaf.

2.5 Enzyme assay

Frozen roots or leaves (300 mg) were homogenised in 2 ml of ice cold phosphate buffer (100 mM pH 7) containing 10 mM EDTA, 1% (w/v) polyvinylpyrrolidone, 10 mM β-mercaptoethanol, 5 mM ascorbic acid and antiproteases (chymostatin 10 mM and Sigma protease inhibitor cocktail). The suspension was centrifuged for 15 min at 12,000 g (4 °C). The supernatant was then assessed for antioxidant enzyme activity. Each enzyme activity was measured against a protein extract-free blank. The protein content was determined according to Bradford (1976), using bovine serum albumin (BSA, Sigma) as standard.

CAT activity was measured spectrophotometrically by following the consumption of H₂O₂ at 240 nm (Aebi, 1984) and was expressed as µmoles of H₂O₂ degraded.min⁻¹.mg⁻¹ protein. APX activity was evaluated by the decrease of absorbance at 290 nm due to ascorbate oxidation (Nakano and Asada, 1981) and was expressed as µmoles of ascorbate oxidized.min⁻¹.mg⁻¹ protein. GR was assayed as the decrease in absorbance at 340 nm caused by the oxidation of NADPH (Dringen and Gutterer, 2002) and its activity was expressed as µmoles of NADPH oxidised.min⁻¹.mg⁻¹ protein. The total activity of SOD was determined by measuring its ability to inhibit the photochemical reduction of nitro blue tetrazolium (NBT) according to the method of Giannopolitis and Ries (1977). One unit of SOD activity was defined as the amount of enzyme required to cause 50 % inhibition of NBT reduction.

Guaiacol peroxidase (GPOX, EC 1.11.1.7) activity was measured by following the decrease of absorbance at 470 nm due to guaiacol oxidation (Hemeda and Klein, 1990) and was expressed as $\mu\text{moles of guaiacol oxidized}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ protein.

2.6 Induction of phytochelatins and glutathione

Induction of phytochelatins (PCs) synthesis and evolution of GSH pool were carried out using HPLC method as described previously by Béraud *et al.* (2007).

2.7 Statistical analysis

Results were expressed as mean \pm SD of three separate experiments. For each experiment, statistical analysis was performed using one-way ANOVA and the multiple comparison method of Tukey (Keppel, 1973).

3 Results and discussion

3.1 Lead uptake and translocation

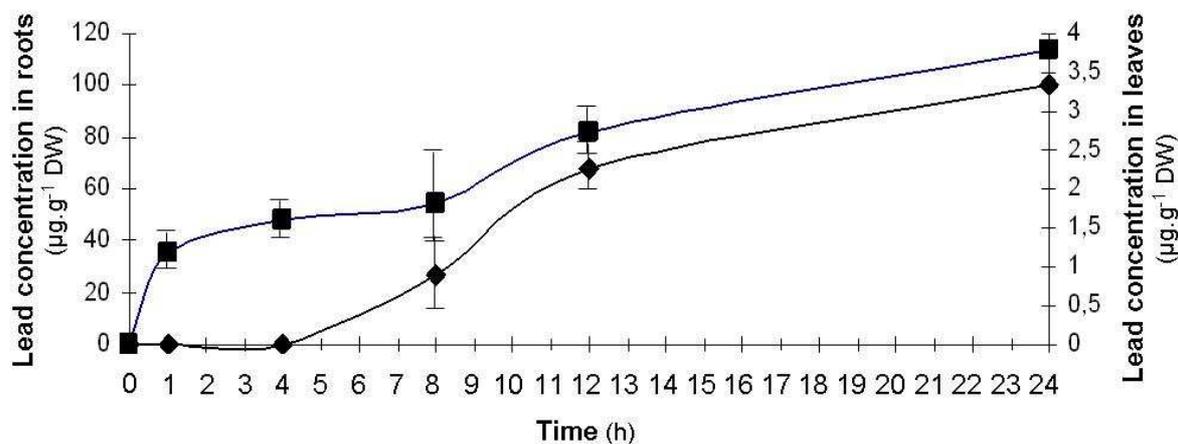


Figure 1: Lead accumulation in roots (dark squares) and leaves (dark diamonds) of *Vicia faba* treated with $10 \mu\text{M Pb}(\text{NO}_3)_2$.

Results are the means of three independent experiments \pm SD (n=3). * Indicates values significantly different from controls ($p < 0.01$).

Figure 1 shows lead uptake by roots and its translocation to shoots. Lead uptake was quadriphasic during the first 24 h of lead treatment. It was important during the first hour (hourly accumulation speed: $V_a = 35.57 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1} \text{DW}\cdot\text{h}^{-1}$) and was much lower between 1st and 8th h ($V_a = 2.72 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1} \text{DW}\cdot\text{h}^{-1}$). Pb uptake was anew important between 8th and 12th h ($V_a = 6.78 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1} \text{DW}\cdot\text{h}^{-1}$), then, increased lightly and reached to $113 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1} \text{DW}$ at 24 h ($V_a = 2.63 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1} \text{DW}\cdot\text{h}^{-1}$). Studies on lead kinetic accumulation in whole plant following short-term exposure are scarce. However, this uptake kinetic (strong increase during the first hour, slowdown during few hours follow by a new increase) is in agreements with those found by Nedelkoska and Doran (2000) in several plants treated by Cd, Ni or Cu. The mechanism which could explain this kinetic remains unclear.

Lead translocation into leaves was very low (Figure 1). Small amount of Pb started to accumulate after 8 h of exposure ($0.89 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1} \text{DW}$) and only $3.3 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1} \text{DW}$ of Pb were transferred after 24 h of treatment. This phenomenon is due to the well-known ability of lead to link to biological molecule such as sugar, pectins, celluloses and hemicelluloses which are constituents of cellular cell-wall and membrane (Wierzbicka, 1998; Antosiewicz, 2005). Moreover, at low concentration, lead is not able to pass through the endoderm barrier (Seregin *et al.*, 2004) owing to a very rapid and efficient system of detoxification in plant symplasm (Wierzbicka, 1998). This system includes chelation by organic or amino acids (Wierzbicka *et al.*, 2007) or by PC (Piechalak *et al.*, 2002) and sequestration in vacuole (Piechalak *et al.*, 2003), or plasmatabule (Wierzbicka, 1998).

3.2 Lipid peroxidation

Figure 2A presents the effect of Pb on lipid peroxidation level in *Vf* roots. TBARS level did not present any significant variation. However, FOX2 assay revealed that lipid hydroperoxides (LHPO) level was strongly increased after 1 h of Pb treatment (1.6 fold higher than control level) and slightly after 8 h (1.14 fold). This difference between the two assays could be explained by that malondialdehyde can only be formed from fatty acids with three or more double bonds (Halliwell and Gutteridge, 1989). Although, plant root tissues mainly contain high levels of 18:2 ($\Delta^{\text{cis},9,12}$). Therefore, although it is the most commonly used assay, TBARS assay does not seem to be the best sensitive colorimetric assay to evaluate lipid peroxidation in plant roots.

Our results show that a lipid peroxidation occurred twice during the first day of Pb exposure. These two oxidative events indicate that Pb induced two distinct oxidative bursts in roots during the first 24 h of treatment. According to these results and those of lead uptake

measurement, a link could exist between lead uptake and ROS production. Indeed, oxidative bursts were generated only after period with high Pb uptake rate (Figure 1). Therefore, although cause of this sequential uptake still unknown, the consequence is a lead-induced ROS generation which exceed antioxidant capacities and generated lipid peroxidation.

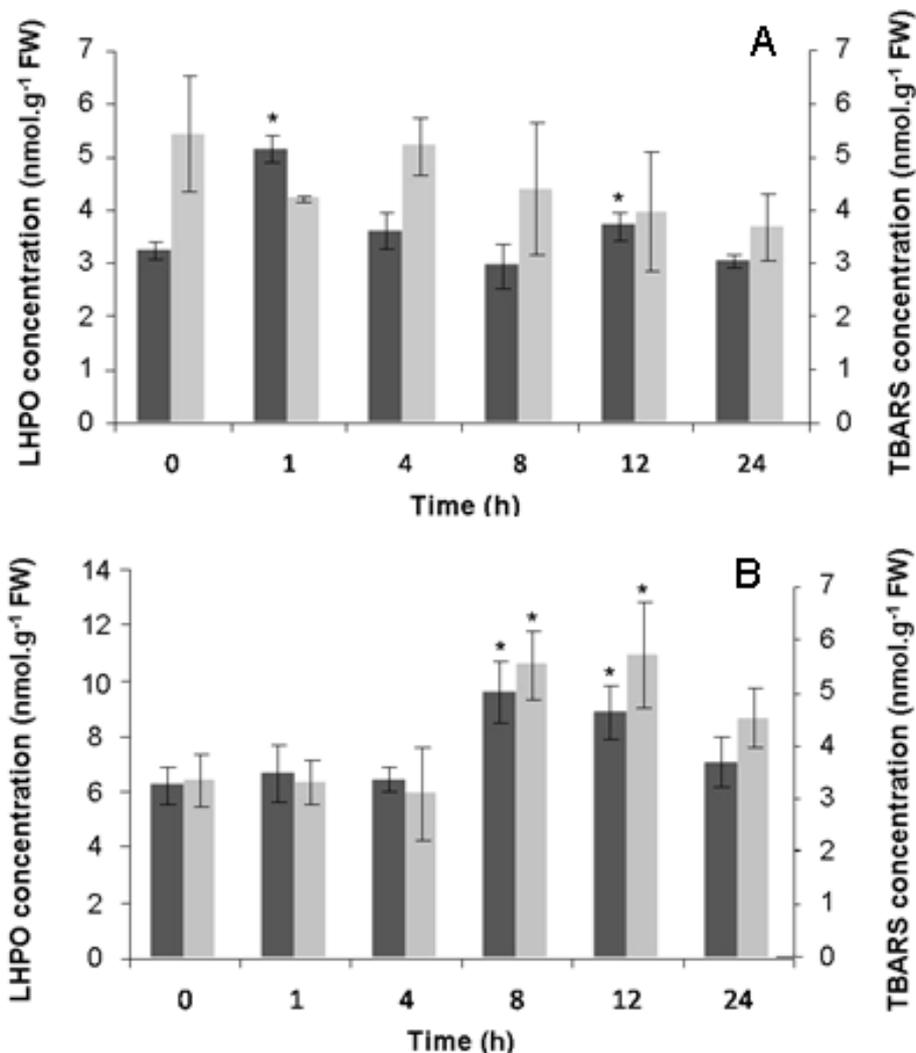


Figure 2: Influence of Pb treatments on the lipid peroxidation in *Vicia faba* evaluated by FOX2 assay (dark grey bars) or TBARS assay (light grey bars) in roots (Fig. 2A) and leaves (Fig 2B).

Results are the means of three independent experiments \pm SD (n=3). * Indicates values significantly different from controls (p<0.01).

Figure 2B shows lead-induced lipid peroxidation in leaves. By contrast to data obtained in roots, FOX2 and TBARS assay presented the same profile. No significant variation was observed in LHPO and TBARS levels before 8 h of treatment. However, at 8 and 12 h, these levels increased significantly (1.42 and 1.64 fold higher than in control), then decreased to

basal level at 24 h. This suggests the occurrence of an oxidative burst as soon as lead concentration was significant in leaves. Although Pb concentrations in leaves were between 10 and 35 fold lower than in roots, lead-induced oxidative burst appeared to be longer and more intense. These results revealed that *Vicia faba* leaves are very sensitive to lead.

3.3 Photosynthetic pigments

Lead effects on photosynthetic pigments were presented on Figure 3. Data show that pigment composition was not affected until 8 h. At 8 h, chlorophylls and carotenoids contents were strongly modified but were similarly affected by lead treatment. Chlorophyll a, b and carotenoids contents decreased to respectively 73.4 %, 70.5 % and 72.3 % of control. Then, Chlo a and carotenoids contents remained stable, whereas Chlo b content was slightly increasing until 24 h.

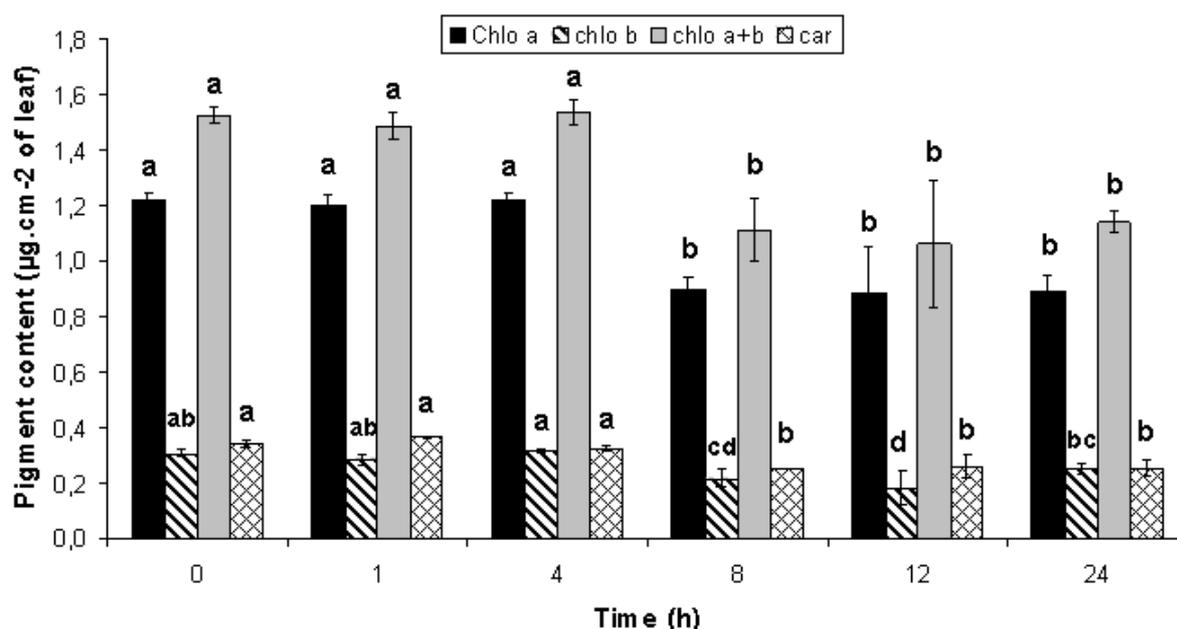


Figure 3: Effects of Pb on chlorophyll a, b, ab and carotenoids contents in *Vicia faba* leaves.

Results are the means of three independent experiments \pm SD (n=3). Different letters indicate significantly different values at a particular duration.

Degradation of chlorophylls and carotenoids is a well-known aspect of lead toxicity (Seregin and Ivanov, 2001; Sharma and Dubey, 2005). Unexpectedly, in our conditions chlorophylls and carotenoids content decreased quickly, only 8 h after Pb exposure. Lead

toxicity on photosynthetic pigments is associated to its availability to inhibit their biosynthesis pathways (Wozny *et al.*, 1995 ; Łukaszek and Poskuta, 1998). However, in our case, according to the promptness of the decreases and the small amount of lead in leaves, it is very unlikely that this phenomenon could be due to biosynthesis inhibition, at least at 8 h. It could be due to the stimulation of chlorophyllase as previously demonstrated by Drazkiewicz (1994). However, pigment contents were inversely correlated with lipid peroxidation. This correlation indicates that Pb action on photosynthetic pigments can be mediated by ROS.

Chlo b is known to be more sensitive to lead than Chlo a (Stiborova *et al.*, 1986; Wozny *et al.*, 1995 ; Łukaszek and Poskuta, 1998). However, our data highlighted that Chlo b is less sensitive to low concentration of lead. This result is in agreement with results obtained by Xiong *et al* (2006) on Chinese cabbage exposed to low concentration of lead.

3.4 Antioxidant enzymes in leaves

In leaves, various antioxidant enzymes exhibited different responses during lead exposure (Table 1). No significant change was observed before 8 h of exposure. At 8 h, SOD activity was 1.34 higher than control one, but this activation was transient and its activity return to basal level at 24 h. Similar kinetic was observed with GPOX activity. However, its activation was two-fold higher and at 24 h, GPOX was significantly inhibited (49% of control). By contrast, GR and APX activities were not affected before 12 h but were increased between 12 h and 24 h of treatment. CAT was not affected until 12 h and was largely inhibited at 24 h (40.9 % of control).

In plants, SOD enzymes are major scavengers of O_2^- free radicals and convert them into O_2 and H_2O_2 . Hydrogen peroxide is then eliminated by various antioxidant enzymes such as catalases, guaiacol peroxidases and ascorbate peroxidases (Apel and Hirt, 2004). Thereby, modulations of their activities are indirect indicators of ROS levels. In agreement with results of leaves lipid peroxidation, all these results strongly suggest ROS generation in leaves after 8 h of exposure. According to SOD, GPOX and APX activities, the O_2^- generation was transient but H_2O_2 one lasted for a long time. It is interesting to note that these generations coincided with Pb arrival in leaves (Figure 1).

	SOD (U.g ⁻¹ protein)		CAT (U.g ⁻¹ protein)		GPOX (U.g ⁻¹ protein)		APX (U.g ⁻¹ protein)		GR (U.g ⁻¹ protein)		
	Means	S.D.	Means	S.D.	Means	S.D.	Means	S.D.	Means	S.D.	
Roots	Control	23.03 b	2,10	1.83 a	0.24	15.12 c	0.80	0.63 d	0.01	0.027 d	0.004
	Pb 1H	50,81 a	1,43	1.30 b	0.09	4.37 d	2.18	0.71 b	0.01	0.170 b	0.022
	Pb 4H	47,05 a	2,04	1.24 b	0.17	35.65 a	4.36	0.65 c	0.01	0.073 c	0.010
	Pb 8H	21,53 bc	1,27	0.83 c	0.07	18.99 bc	2.89	0.57 e	0.02	0.028 d	0.003
	Pb 12H	17,65 cd	1,70	1.08 bc	0.08	20.56 b	0.28	0.68 b	0.02	0.157 b	0.030
	Pb 24H	12,41 d	2,61	0.88 c	0.06	10.52 c	2.01	0.79 a	0.04	0.281 a	0.003
Leaves	Control	41.00 bc	3.71	1.63 ab	0.13	0.037 bc	0.002	0.19 b	0.04	0.046 b	0.006
	Pb 1H	40.36 bc	2.55	1.41 ab	0.39	0.028 cd	0.011	0.13 b	0.02	0.049 b	0.001
	Pb 4H	42.87 b	3.63	1.71 ab	0.18	0.040 bc	0.009	0.16 b	0.02	0.053 ab	0.004
	Pb 8H	55.21 a	2.26	1.27 b	0.07	0.076 a	0.005	0.16 b	0.02	0.063 ab	0.002
	Pb 12H	43.73 b	3.02	1.78 a	0.13	0.050 b	0.012	0.25 a	0.02	0.069 a	0.017
	Pb 24H	32.34 c	3.51	0.67 c	0.37	0.018 d	0.005	0.31 a	0.05	0.069 a	0.032

Table 1: Influence of Pb treatments on antioxidant enzyme capacities in *Vicia faba* roots. The values are means of three individual experiments with triplicates ± standard deviation (S.D.). Different letters indicate significantly different values at a particular duration.

3.3 Antioxidant enzymes in roots

Table 1 also shows that the antioxidant enzyme response was significantly different in roots. After 1 h, SOD activity was more than twice as high as in control and remained constant until 4 h. Then, it decreased to basal level and, at 24 h, was significantly inhibited (53.8 % of control). CAT activity decreased throughout Pb treatment and reached a minimum value after 8 h of lead treatment (45 % of control). In the case of roots-APX activity, a rapid and significant activation (10 %) was recorded after 1 h. Until 8 h, APX activity decreased to the basal level. Then, it anew increased and reached a maximum value after 24 h (125 % of control). By contrast, GPOX activity was firstly reduced (up to 70 %) at 1 h then elicited after 4 h, up to 129 % more than the activity measured on control plants. Until 24 h, GPOX activity decrease below control level. The kinetic of GR activation by lead was different. GR activity increased very significantly (up to 560 %) at 1 h. After a 4 h treatment, GR activity decreased strongly but remained 2.5 times higher than in untreated plants. Then, it still decreased to basal level at 8 h but was anew strongly stimulated after 12 h and 24 h of lead exposure (respectively 590 and 1053 % of control).

According to these results, many conclusions can be drawn. Lead strongly modulated the antioxidant enzymes (Table 1). Such an increase or decrease in the activity of these enzymes has been reported with a variety of heavy metals (Van Assche and Clijsters, 1990; Seregin and Ivanov, 2001; Schutzendubel and Polle, 2002). The abundant data available highlights that the antioxidant response depends on plant species, metal concentration and treatment duration. In our conditions, Pb stimulated SOD activity and this increase is an indicator of the $O_2^{\cdot -}$ presence during the first 4 h of lead treatment. This result is in agreement with our previous work which demonstrated the NADPH-oxidase dependent production of anion superoxide in *Vf* roots exposed to same concentration of lead (Pourrut *et al.*, 2008). Until 4 h, the activation of GPOX and APX underlines the presence of H_2O_2 in root tissues. GPOX and APX seemed to function complementary to remove H_2O_2 in roots. Indeed, APX activity was significantly inversely correlated to GPOX one ($r^2 = -0.542$; $P < 0.05$). However, CAT was inhibited throughout the experiment. This inhibition by lead was often reported (Verma and Dubey, 2003; Chen *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2007a). CAT inactivation is Pb dose-dependant and could be due to direct interaction between Pb and catalase. Indeed, lead ions could substitute iron ions in the catalase porphyrin hemes.

Results also showed that the lead-induced oxidative burst is transient and all enzyme activities, except CAT, return to basal level after 8 h of treatment. However, according to

GPOX, APX and GR activities lead seemed to induce a second wave of H₂O₂ after 12 h. The presence of O₂⁻ and H₂O₂ at 1 h and of H₂O₂ at 12 h was confirmed by histological experiments using KI+starch and NBT (data not shown). These observations are also confirmed by results obtained with lipid peroxidation assays. Indeed, these two distinct oxidative bursts coincided with the two peaks of peroxidation previously described. The occurrence of two oxidative bursts, the first within minutes and the second a few hours later, was also shown in copper-treated wheat roots (Sgherri *et al.*, 2007) has been widely documented in plants in response to abiotic or biotic stresses (Mika *et al.*, 2004).

Second major point to highlight is that GR appears to be the key enzyme in combating Pb in plant roots. GR activation was sequential but often important. As GR catalyses the NADPH-dependent reduction of oxidized-glutathione to reduced-glutathione, its over-activation could underline the pivotal role of GSH in *Vf* roots in response to lead.

3.5 GSH pool and PC content

In order to analyse the effect of lead treatment on PC synthesis, levels of total PC and its precursor, GSH, were estimated in *Vf* roots and leaves (Figure 4 and 5).

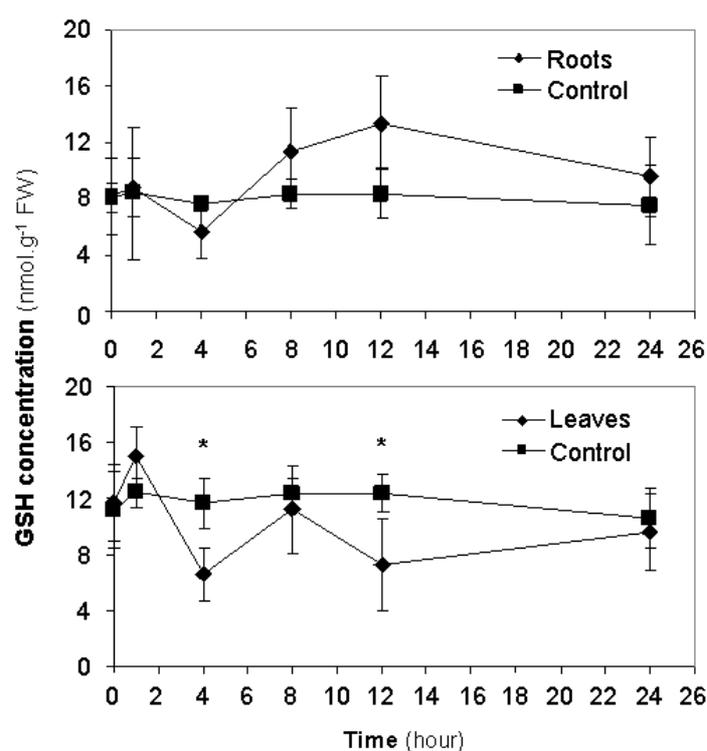


Figure 4: Changes of GSH contents in *Vicia faba* roots (A) and leaves (B).

Dark squares represent roots GSH content, dark diamonds represent leaves one and dark triangle represent GSH level in corresponding organ from control plants. Results are the means of three independent experiments \pm SD (n=3). * Indicates values significantly different from controls (p<0.01).

Results presented in Figure 4 show that, in roots, GSH pool was modified by lead application but was not significantly different from control one. In leaves, GSH content slightly decreased and this decrease was significant.

Several studies showed that, in plants, GSH pool modulation depends on plant species, heavy metal concentration and time exposure (Lima *et al.*, 2006; Mishra *et al.*, 2006a; Aina *et al.*, 2007). However, Mishra *et al* (2006b) demonstrated that after 24 h of 10 μ M Pb exposure, GSH content was not significantly affected in *Ceratophyllum demersum*. In our experimental conditions, GSH pool was not or slightly affected by lead exposure whereas PC synthesis was strongly stimulated (Figure 5). This relative stability could be correlated to the over-activity of GR previously observed (Table 1). However, the amplitude of this enzyme activation cannot be only explained by GSH utilisation to produce PC. This significant GR activation could underline the pivotal role of GSH in *Vf* roots in response to lead, as previously observed in *Arabidopsis* (Lee *et al.*, 2005). GSH could be involved in different detoxification pathways: (i) GSH is used in the Halliwell-Asada-Foyer cycle to regenerate ascorbate which is needed by APX to reduce H_2O_2 ; (ii) various free radicals and oxidants, and particularly H_2O_2 , are able to directly oxidise GSH to GSSG; (iii) GSH is the precursor of phytochelatins which are thought to play an important role in lead ion detoxification (Mehra *et al.*, 1995; Piechalak *et al.*, 2002).

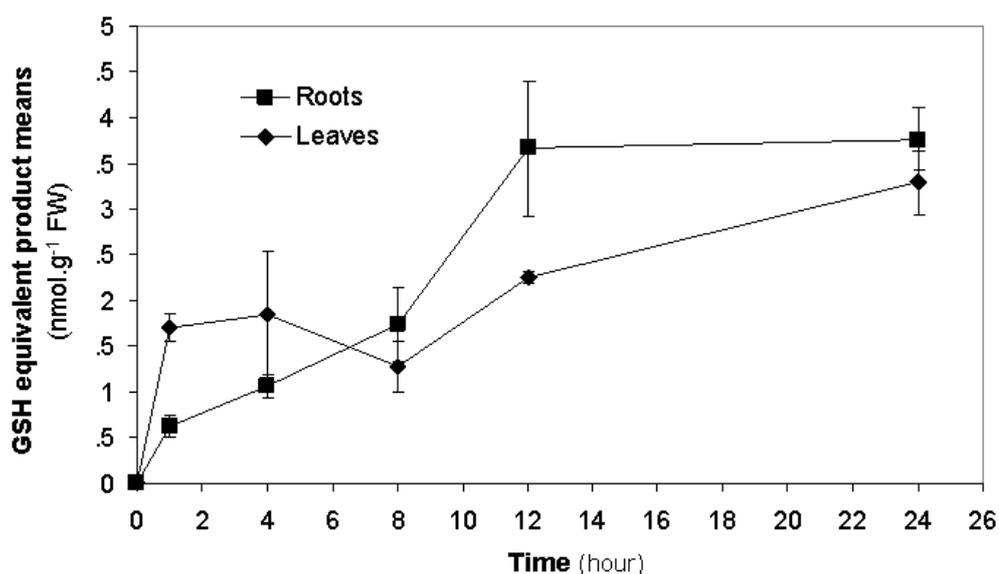


Figure 5: Effects of lead treatments on changes of phytochelatin contents in *Vicia faba* roots (dark squares) and leaves (dark diamonds).

Results are the means of three independent experiments \pm SD (n=3).

Data of Figure 5 show that PC synthesis was not linear in roots and leaves. In our experimental conditions, we only found PC₂, PC₅ and PC₆. PC₂ represented 90 % of the total PC (data not shown). However, in roots, PC content increased during the first twelve hours. This increase was not linear and was strong during the 1st hour and between the 8th and 12th hour. This PC synthesis is consistent with Piechalak *et al* (2002) results obtained in *Vf* roots treated with 1 mM of Pb(NO₃)₂. However, by contrast with Piechalak *et al.* results, in our conditions, PC content remained constant until 24 h.

Moreover, PC synthesis was strongly correlated with Pb concentration in roots (Figure 6A; $r^2 = 0,898$, $P < 0.05$). This result is in agreement with the fact that, in plants, PC synthesis was regulated by the activity of phytochelatin synthase (PCS) which is activated by heavy metals such as lead (Clemens, 2006a). Unexpectedly, PC accumulation kinetic in leaves was very different. Results show an important increase, during the first hour, which is 2.8 fold stronger than roots one. Then, PC level increased slightly but continuously until 24 h. PC accumulation had yet strongly begun at 1 h whereas Pb was not detected in leaves until 8 h of Pb treatment (Figure 1). Moreover, it was strongly correlated to Pb concentration in roots (Figure 6B; $r^2 = 0,893$, $P < 0.05$).

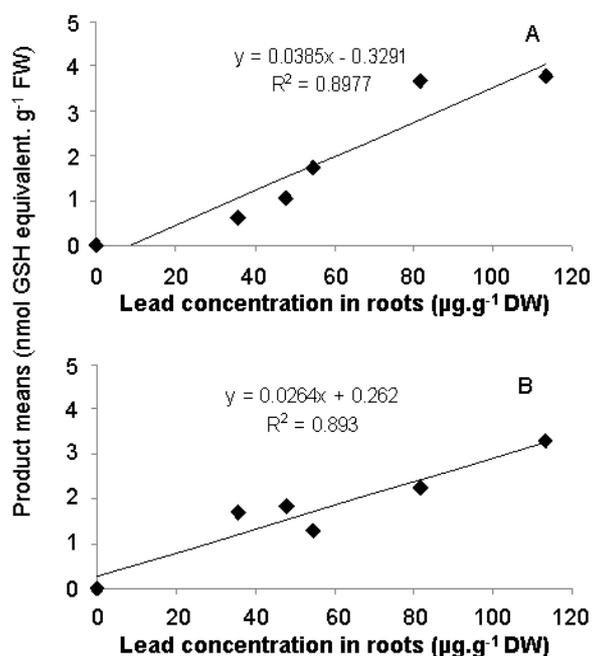


Figure 6: Relationship between phytochelatin accumulation in roots (Fig 6A) and in leaves (Fig 6B), and Pb accumulation in *Vicia faba* roots exposed to 10 µM Pb(NO₃)₂. Regression line is provided.

All these results support the idea of a strong network between roots and plant above parts, and the transduction of a Pb stress signal which can be able to stimulate PC synthesis or accumulation in absence of lead. Vatamaniuk *et al.* (2000) demonstrated that the presence of free ions of heavy metals is not necessary for the reaction catalysed by PCS. This high PC accumulation in leaves, in lead absence (or in presence of a very small amount of Pb, under our detection threshold: under $10 \text{ ng.g}^{-1} \text{ DW}$) could be an adaptive mechanism to deal with the metal. Therefore, leaves could be “prepared” before lead translocation and could be able to protect photosynthetic metabolism from Pb. Many hypotheses can be ventured to explain this phenomenon: (i) PC translocation from root-to-shoot, as previously observed by Gong *et al.* (2003) in *Arabidopsis*, could lead to an accumulation in leaves; (ii) PC synthesized in leaves could be transferred shoot-to-root to help roots to cope with lead. This mechanism was yet identified in Cd-treated *Arabidopsis* plants (Chen *et al.*, 2006); (iii) Rapid PC synthesis could be a mechanism to cope with lead in leaves and send it back to roots which are less sensitive, as it was identified in *Brassica napus* plants exposed to cadmium (Mendoza-Cozatl *et al.*, 2008). These authors highlighted the implication of PC in Cd shoot-to-root transport and showed that the concentration of Cd was more than four-fold higher in phloem sap compared to xylem sap.

4 Conclusions

In conclusion, our results demonstrate that lead uptake by roots was not linear along first day in *Vicia faba* plants treated with an environmentally realistic concentration of lead ($10 \mu\text{M}$). This result is important because elevations of Pb uptake rate caused an oxidative burst in roots and induced lipid peroxidation. This study also underlines the low Pb translocation rate between roots to shoot. However, *Vf* leaves are very sensitive to this little amount of Pb transferred from roots. Pb also generated an oxidative burst which was longer and more intense than in roots. Pb accumulation in leaves caused lipid peroxidation and a strong decrease of photosynthetic pigments. To limit this negative effect, large amounts of phytochelatins were synthesized in roots as well as in leaves. However, mechanism of the rapid accumulation in leaves and its purpose remains unclear. In addition, to cope with negative effects of this metal, GR appeared to be the key enzyme in *Vf* roots by maintaining GSH pool constant, despite its consumption to regenerate ascorbate, to synthesize PC or to directly scavenge ROS. Further work will be necessary (i) to determine more precisely the implication of Halliwell-Asada-Foyer pathway in combating Pb deleterious effects, (ii) to

elucidate the quick mechanism of PC accumulation in leaves and its implication in Pb detoxification.

References

- Aebi, H., 1984. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology* 105, 121-126.
- Aina, R., Labra, M., Fumagalli, P., Vannini, C., Marsoni, M., Cucchi, U., Bracale, M., Sgorbati, S., Citterio, S., 2007. Thiol-peptide level and proteomic changes in response to cadmium toxicity in *Oryza sativa* L. roots. *Environmental and Experimental Botany* 59, 381-392.
- Antosiewicz, D.M., 2005. Study of calcium-dependent lead-tolerance on plants differing in their level of Ca-deficiency tolerance. *Environmental Pollution* 134, 23-34.
- Apel, K., Hirt, H., 2004. Reactive oxygen species: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annual Review of Plant Biology* 55, 373-399.
- Bazzaz, F.A., Carlson, R.W., Rolfe, G.L., 1975. Inhibition of Corn and Sunflower Photosynthesis by Lead. *Physiologia Plantarum* 34, 326-329.
- Beraud, E., Cotelle, S., Leroy, P., Ferard, J.-F., 2007. Genotoxic effects and induction of phytochelatins in the presence of cadmium in *Vicia faba* roots. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 633, 112-116.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.
- Chen, A., Komives, E.A., Schroeder, J.I., 2006. An Improved Grafting Technique for Mature Arabidopsis Plants Demonstrates Long-Distance Shoot-to-Root Transport of Phytochelatins in Arabidopsis. *Plant Physiology* 141, 108-120.
- Chen, J., Zhu, C., Li, L.-p., Sun, Z.-y., Pan, X.-b., 2007. Effects of exogenous salicylic acid on growth and H₂O₂-metabolizing enzymes in rice seedlings under lead stress. *Journal of Environmental Sciences* 19, 44-49.
- Clemens, S., 2006. Evolution and function of phytochelatin synthases. *Journal of Plant Physiology* 163, 319-332.
- Demiral, T., Turkan, I., 2005. Comparative lipid peroxidation, antioxidant defense systems and proline content in roots of two rice cultivars differing in salt tolerance. *Environmental and Experimental Botany* 53, 247-257.
- Drazkiewicz, M., 1994. Chlorophyll-occurrence, functions, mechanism of action, effects of internal and external factors. *Photosynthetica* 30, 321-331.
- Dringen, R., Gutterer, J., 2002. Glutathione reductase from bovine brain. *Methods in Enzymology* 348, 281-288.

- Ernst, W.H.O., 1998. Effects of heavy metals in plants at the cellular and organismic level. In: Schuurman, G., Markert, B. (Eds.). *Ecotoxicology*. J Wiley and Sons Inc and Spectrum Akademisher Verlag, pp. 587-620.
- Giannopolitis, C.N., Ries, S.K., 1977. Superoxide Dismutases: I. Occurrence in Higher Plants. *Plant Physiology* 59, 309-314.
- Gong, J.-M., Lee, D.A., Schroeder, J.I., 2003. Long-distance root-to-shoot transport of phytochelatin and cadmium in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100, 10118-10123.
- Griffiths, G., Leverenz, M., Silkowski, H., Gill, N., Sanchez-Serrano, J.J., 2000. Lipid hydroperoxide levels in plant tissues. *Journal of Experimental Botany* 51, 1363-1370.
- Halliwell, B., Gutteridge, J., 1989. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Clarendon Press, Oxford, pp. 188-275.
- Hemeda, H.M., Klein, B.P., 1990. Effects of Naturally Occurring Antioxidants on Peroxidase Activity of Vegetable Extracts. *Journal of Food Science* 55, 184-185.
- Huang, C.-Y., Bazzaz, F.A., Vanderhoef, L.N., 1974. The Inhibition of Soybean Metabolism by Cadmium and Lead. *Plant Physiology* 54, 122-124.
- Huang, J.W., Cunningham, S.D., 1996. Lead phytoextraction: species variation in lead uptake and translocation. *New Phytologist* 134, 75-84.
- Jopony, M., Young, S.D., 1994. The solid solution equilibria of lead and cadmium in polluted soils. *European Journal of Soil Science* 45, 59-70.
- Lee, M., Lee, K., Lee, J., Noh, E.W., Lee, Y., 2005. AtPDR12 Contributes to Lead Resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 138, 827-836.
- Lichtenthaler, H.K., 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology* 148, 350-382.
- Lima, A.I.G., Pereira, S.I.A., de Almeida Paula Figueira, E.M., Caldeira, G.C.N., de Matos Caldeira, H.D.Q., 2006. Cadmium detoxification in roots of *Pisum sativum* seedlings: relationship between toxicity levels, thiol pool alterations and growth. *Environmental and Experimental Botany* 55, 149-162.
- Łukaszek, M., Poskuta, J., 1998. Development of photosynthetic apparatus and respiration in pea seedlings during greening as influenced by toxic concentration of lead. *Acta Physiologiae Plantarum* 20, 35-40.
- Maksymiec, W., 2007. Signaling responses in plants to heavy metal stress. *Acta Physiologiae Plantarum* 29, 177-187.

- Malecka, A., Jarmuszkiewicz, W., Tomaszewska, B., 2001. Antioxidative defense to lead stress in subcellular compartments of pea root cells. *Acta Biochimica Polonica* 48, 687-698.
- Malecka, A., Piechalak, A., Morkunas, I., Tomaszewska, B., 2008. Accumulation of lead in root cells of *Pisum sativum*. *Acta Physiologiae Plantarum*.
- Marmioli, M., Antonioli, G., Maestri, E., Marmioli, N., 2005. Evidence of the involvement of plant ligno-cellulosic structure in the sequestration of Pb: an X-ray spectroscopy-based analysis. *Environmental Pollution* 134, 217-227.
- Mehra, R.K., Kodati, V.R., Abdullah, R., 1995. Chain Length-Dependent Pb(II)-Coordination in Phytochelatins. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 215, 730-736.
- Mendoza-Cozatl, D.G., Butko, E., Springer, F., Torpey, J.W., Komives, E.A., Kehr, J., Schroeder, J.I., 2008. Identification of high levels of phytochelatins, glutathione and cadmium in the phloem sap of *Brassica napus*. A role for thiol-peptides in the long-distance transport of cadmium and the effect of cadmium on iron translocation. *The Plant Journal* 54, 249-259.
- Mika, A., Minibayeva, F., Beckett, R., Lühje, S., 2004. Possible functions of extracellular peroxidases in stress-induced generation and detoxification of active oxygen species. *Phytochemistry Reviews* 3, 173-193.
- Mishra, S., Srivastava, S., Tripathi, R.D., Govindarajan, R., Kuriakose, S.V., Prasad, M.N.V., 2006a. Phytochelatin synthesis and response of antioxidants during cadmium stress in *Bacopa monnieri* L[lozenge]. *Plant Physiology and Biochemistry* 44, 25-37.
- Mishra, S., Srivastava, S., Tripathi, R.D., Kumar, R., Seth, C.S., Gupta, D.K., 2006b. Lead detoxification by coontail (*Ceratophyllum demersum* L.) involves induction of phytochelatins and antioxidant system in response to its accumulation. *Chemosphere* 65, 1027-1039.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., Van Breusegem, F., 2004. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science* 9, 490-498.
- Nakano, Y., Asada, K., 1981. Hydrogen Peroxide is Scavenged by Ascorbate-specific Peroxidase in Spinach Chloroplasts. *Plant Cell Physiology* 22, 867-880.
- Nedelkoska, T.V., Doran, P.M., 2000. Characteristics of heavy metal uptake by plant species with potential for phytoremediation and phytomining. *Minerals Engineering* 13, 549-561.

- Piechalak, A., Tomaszewska, B., Baralkiewicz, D., 2003. Enhancing phytoremediative ability of *Pisum sativum* by EDTA application. *Phytochemistry* 64, 1239-1251.
- Piechalak, A., Tomaszewska, B., Baralkiewicz, D., Malecka, A., 2002. Accumulation and detoxification of lead ions in legumes. *Phytochemistry* 60, 153-162.
- Pourrut, B., Perchet, G., Silvestre, J., Cecchi, M., Guirese, M., Pinelli, E., 2008. Potential role of NADPH-oxidase in early steps of lead-induced oxidative burst in *Vicia faba* roots. *Journal of Plant Physiology* 165, 571-579.
- Schutzendubel, A., Polle, A., 2002. Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *Journal of Experimental Botany* 53, 1351-1365.
- Seregin, I.V., Ivanov, V.B., 2001. Physiological Aspects of Cadmium and Lead Toxic Effects on Higher Plants. *Russian Journal of Plant Physiology* 48, 523-544.
- Seregin, I.V., Shpigun, L.K., Ivanov, V.B., 2004. Distribution and Toxic Effects of Cadmium and Lead on Maize Roots. *Russian Journal of Plant Physiology* 51, 525-533.
- Sgherri, C., Quartacci, M.F., Navari-Izzo, F., 2007. Early production of activated oxygen species in root apoplast of wheat following copper excess. *Journal of Plant Physiology* 164, 1152-1160.
- Sharma, P., Dubey, R.S., 2005. Lead toxicity in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 17, 35-52.
- Stiborova, M., Doubravova, M., Brezinova, A., A., F., 1986. Effect of heavy metal ions on growth and biochemical characteristics of photosynthesis of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Photosynthetica* 20, 418-425.
- Van Assche, F., Clijsters, H., 1990. Effects of metals on enzyme activity in plants. *Plant cell and Environment* 13, 195-206.
- Vatamaniuk, O.K., Mari, S., Lu, Y.-P., Rea, P.A., 2000. Mechanism of Heavy Metal Ion Activation of Phytochelatin (PC) Synthase. Blocked thiols are sufficient for PC synthase-catalysed transpeptidation of glutathione and related thiol peptides. *Journal of Biological Chemistry* 275, 31451-31459.
- Verma, S., Dubey, R.S., 2003. Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. *Plant Science* 164, 645-655.
- Wang, C., Wang, X., Y Tian, Yu, H., Gu, X., Du, W., Zhou, H., 2007. Oxidative stress, defence response and early biomarkers for lead-contaminated soil in *Vicia faba* seedlings. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 1.

- Wierzbicka, M., 1998. Lead in the apoplast of *Allium cepa* L. root tips--ultrastructural studies. *Plant Science* 133, 105-119.
- Wierzbicka, M.H., Przedpeńska, E., Ruzik, R., Ouerdane, L., Połec-Pawlak, K., Jarosz, M., Szpunar, J., Szakiel, A., 2007. Comparison of the toxicity and distribution of cadmium and lead in plant cells. *Protoplasma* 231, 99-111.
- Wozny, A., Schneider, J., Gwozdz, E.A., 1995 The effects of lead and kinetin on greening barley leaves. *Biologia plantarum* 37, 541-552.
- Xiong, Z., Zhao, F., Li, M., 2006. Lead toxicity in *Brassica pekinensis* Rupr.: Effect on nitrate assimilation and growth. *Environmental Toxicology* 21, 147-153.

Chapitre IV :

Mécanismes oxydatifs

impliqués dans la

toxicité du plomb

A. Rôle potentiel joué par la NADPH-oxydase dans les premières étapes de flambée oxydative induite par le plomb dans les racines de *Vicia faba*

-Avant-propos-

Notre étude précédente a démontré la génération de flambées oxydatives suite à une exposition au plomb. Ce phénomène n'est pas spécifique au plomb et avait déjà été démontré pour d'autres métaux. Si les processus physiologiques sont des sources constitutives d'ERO, la flambée oxydative induite lors de différents stress est généralement le fait de l'activation de diverses sources enzymatiques (Bartosz, 1997; Arora *et al.*, 2002; Mittler, 2002). Plusieurs études se sont consacrées à ces sources enzymatiques d'ERO, et ont identifié, en utilisant des inhibiteurs pharmacologiques, les NADPH-oxydases, les peroxydases extracellulaires, les oxalate-oxydases et/ou les amine-oxydases à cuivre comme étant impliquées dans la production d'ERO induite par les ETM (Romero-Puertas *et al.*, 1999; Olmos *et al.*, 2003; Simonovicova *et al.*, 2004a; Garnier *et al.*, 2006; Groppa *et al.*, 2007). Aucune étude n'ayant porté sur le plomb, nous avons décidé de déterminer la (les) source(s) d'ERO responsable(s) de la flambée oxydative observée. L'ensemble de ces travaux ont révélé que, aussi bien sur plantes entières qu'en cultures cellulaires, l'induction de la flambée oxydative induite par les métaux lourds était très rapide. Nous avons donc choisi de nous intéresser à l'induction de la première flambée oxydative dans les racines de fèves. Pour cela, nous avons utilisé une technique de chimiluminescence développée au laboratoire et adaptée à la mesure d'ERO sur des racines. Dans un premier temps, l'exposition à des doses croissantes de plomb (5 à 20 μ M) nous a permis de mesurer l'induction de la production d'ERO dans les racines. Dans un second temps, l'utilisation d'inhibiteurs des différentes sources enzymatiques (hormis l'oxalate-oxydase qui n'a pas d'inhibiteur commercialisé) nous a permis de discriminer les sources responsables de la génération d'ERO. Enfin, une fois la source déterminée, nous nous sommes attachés à déterminer les mécanismes conduisant à son induction par le plomb.

-Publication-

Pourrut B, G Perchet, J Silvestre, M Cecchi, M Guiresse and E Pinelli (2008). Potential role of NADPH-oxidase in early steps of lead-induced oxidative burst in *Vicia faba* roots. *Journal of Plant Physiology* 165(6): 571-579.

Potential role of NADPH-oxidase in early steps of lead-induced oxidative burst in *Vicia faba* roots

Pourrut Bertrand, Geoffrey Perchet, Jérôme Silvestre, Marie Cecchi, Maritxu Guiresse, Eric Pinelli *

*Corresponding author: pinelli@ensat.fr

¹ EcoLab UMR 5245 CNRS-UPS-INPT, ENSAT Avenue de l'agrobiopole-Auzeville-Tolosane BP 107- F 31 326 Castanet-Tolosan Cédex.

Abstract

The mechanism of oxidative burst induced by lead in *Vicia faba* excised roots was investigated by luminol-dependent-chemiluminescence. Results showed that lead triggered a rapid and dose-dependent increase in chemiluminescence production. In this study, specific inhibitors of putative reactive oxygen species (ROS) sources were used to determine the mechanism of lead-induced ROS generation. This generation was sensitive to dephenylene iodonium (DPI), quinacrine and imidazole, some inhibitors of the NADPH-oxidase and not inhibited by other putative ROS sources inhibitors. Data reported in this work clearly demonstrated the pivotal role of NADPH-oxidase-like enzyme in early steps of lead-induced oxidative burst. To investigate the respective implication of calmodulin and protein kinase (PK) in lead induced NADPH-oxidase activation, excised roots were treated with the calmodulin inhibitor W7 or with the PK inhibitor staurosporine. The chemiluminescence generation inhibition by these inhibitors illustrated the role of PK in lead-induced NADPH-oxidase activation and revealed a calmodulin-dependant step. Using the calcium entry blocker La^{3+} or different concentrations of calcium in the extra cellular medium, our data highlighted the implication of Ca^{2+} channel in lead-induced oxidative burst.

Key words: lead, NADPH-oxidase, oxidative burst, reactive oxygen species, *Vicia faba*.

Abbreviations: AO, amine oxidase; CaMKs, calmodulin-dependent protein kinases; CAT, Catalase; CCaMKs, calcium-calmodulin-dependent protein kinases; CL, chemiluminescence; CNGC, cyclic nucleotide-gated channel; CuAO, Copper containing-amine oxidase; DPI, dephenylene iodonium; PAO, polyamine oxidase; PK, protein kinase; PKC, protein kinase C; ROS, reactive oxygen species; SOD, Superoxide dismutase; *Vf*, *Vicia faba*.

1 Introduction

Lead is one of the most abundant heavy metals polluting soil and environment. It originates from numerous sources and has become an environmental concern (Singh *et al.*, 1997). Lead is toxic to many organs: it is a proven animal carcinogen (Johnson, 1998) and an inducer of many toxic symptoms in plants such as decrease of growth due to interference with enzymes essential for normal metabolism and development, photosynthetic processes, water and mineral nutrient absorption and changes in cell ultrastructure (Singh *et al.*, 1997). Lead is reported to produce reactive oxygen species (ROS) and alter the activities of antioxidant enzymes (Malecka *et al.*, 2001; Verma and Dubey, 2003). These ROS include superoxide anions ($O_2^{\cdot-}$), hydroxyl radical (OH^{\cdot}), singlet oxygen (1O_2) and hydrogen peroxide (H_2O_2) which are produced during membrane-linked electron transport activities as well as by a number of metabolic pathways (Shah *et al.*, 2001).

The rapid production of ROS or “oxidative burst” was originally identified in mammalian phagocytes and later demonstrated in plants cells (Low and Merida, 1996). It is believed that, in plants, putative sources of ROS during biotic or abiotic stresses are cell-wall-bound peroxidases (Kawano *et al.*, 2003), xanthine oxidase, amine oxidases in the apoplast (Allan and Fluhr, 1997) and plasma-membrane-bound NADPH-oxidases (Bolwell and Wojtaszek, 1997). The key enzyme which contributes to ROS formation in phagocyte is a plasma membrane-bound NADPH-dependent oxidase (Segal and Abo, 1993), the activation of which involves the assembly of at least three cytosolic proteins ($p67^{phox}$, $p47^{phox}$, $p40^{phox}$), two plasma membrane-associated ones ($gp91^{phox}$, $p22^{phox}$) and two small GTP-binding proteins ($p21^{rac}$, *Rap1A*). The activation of this complex consists in the translocation and the association of the cytoplasmic proteins to the membrane bound components. This process involves the phosphorylation of at least $p47^{phox}$ by protein kinase C. Pharmacological approaches with dephenylene iodonium (DPI) demonstrate the involvement of a NADPH-oxidase-like enzyme in elicited cells of *Arabidopsis thaliana* (Desikan *et al.*, 1996). Moreover, immunological evidences using mammalian NADPH-oxidase subunit antibodies reported the presence of subunits of this enzyme complex (Desikan *et al.*, 1996; Razem and Bernards, 2003). Recently, Overmyer *et al.* (2003) have identified respiratory burst oxidase homologues (rboh) as plant homologues of the catalytic subunit of phagocyte NADPH-oxidase ($gp91^{phox}$) and which were reported to be responsible for ROS production during biotic stress (Simon-Plas *et al.*, 2002). Cadmium-induced oxidative stress is also thought to be mediated by an NADPH oxidase-like enzyme (Garnier *et al.*, 2006; Olmos *et al.*, 2003).

Garnier *et al.* (2006) suggested that cadmium enters cells via La^{3+} -sensitive transporters or calcium channel to generate this oxidative burst. Lead entry into plant cells also occurs, at least in part, through Ca^{2+} -permeable channel (Huang and Cunningham, 1996; Sunkar *et al.*, 2000).

Although, lead toxicity appears related to oxidative stress (Malecka *et al.*, 2001; Verma and Dubey, 2003), the mechanism leading to ROS production remains unclear. An attempt has been made in this work to determine the effect of lead on ROS production by chemiluminescence, in lead treated *Vicia faba* roots. Specific inhibitors of putative ROS sources were used to determine the mechanism at the origin of lead-induced ROS generation and the role of NADPH oxidase-like enzyme.

2 Material and methods

2.1 Plant material and growth

Broad beans (*Vicia faba*, L.) were germinated on filter paper moistened with deionised water at 25 °C in the dark. After 7 d, plants were grown in a PVC tank (4 plants per tank) containing 500 mL of aerated Hoagland solution. To keep the nutrient composition and pH constant, solutions were renewed daily. The culture systems were located in a growth chamber with day/night air temperatures of 24/22 °C and relative humidity of 70/75 %. Plants were lighted 16 h in a day by 600 W Osram Nav-T Super High Pressure Sodium (HPS) Lamp provided a minimum Photosynthetic Photon Flux Density (PPFD) of 500 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ at the top of the plant.

2.2 Oxidative burst assay

Lead effect on ROS production was determined based on the rate of superoxide radical ($\text{O}_2^{\cdot-}$) formation detected via luminol-dependent chemiluminescence (CL). $\text{O}_2^{\cdot-}$ generate CL that is enhanced by the reaction with luminol (Forgue *et al.*, 1991). CL was measured using a thermostatically controlled luminometer 1251 LKB (25 °C). CL response was expressed in mV.

For each sample, three segment roots (apex) of 1.5 cm, from 3-week old plant, were rinsed with sterile water and cut in thin slices of 1 mm. *Vf* root segments were then kept in 20 mM Tris HCl medium (pH 8.2). Each assay (800 μL) contained excised plant roots and luminol (1.25 mM) in Tris HCl. For the study of lead capacity to induced CL of excised roots, three concentrations (5 μM , 10 μM and 20 μM) of lead nitrate were tested. For each assay,

lead nitrate was added after basal line stabilization, directly on the luminometer chamber and CL was recorded every 5 s.

To determinate the nature of ROS produced during lead-induced oxidative burst, Superoxide Dismutase (SOD, EC 1.15.1.1; 5 and 50 units) or Catalase (CAT, EC 1.11.1.6; 50 and 150 units) were added to medium 10 min before lead treatment.

To investigate the potential source of ROS in lead induced oxidative burst, the excised roots were respectively preincubated 10 min at 25 °C with the NADPH-oxidase inhibitors DPI (0.1 µM and 1 µM), imidazole (5 mM and 50 mM) and quinacrine (0.1 mM and 1 mM), with horseradish peroxidase inhibitor sodium azide (NaN₃, 1 mM and 10 mM), with xanthine oxidase inhibitor allopurinol (0.2 mM and 2 mM), with polyamine oxidase (PAO) inhibitor N-prenylagmatine (G3, 1 µM and 10 µM) or with copper containing-amine oxidase (CuAO) inhibitors 2-bromoethylamine (1 µM and 10 µM) and aminoguanidine (1 mM and 10 mM); then excised roots were exposed to lead (10 µM).

To analyse the role of protein kinases (PKs) and calmodulin in NADPH oxidase system, excised roots were preincubated 10 min at 25 °C respectively with the PK inhibitor staurosporine (10 nM and 0.1 µM) or with the calmodulin antagonist W7 (0.2 mM and 2 mM) before lead treatment.

In order to determine the putative lead entry in cells via calcium channels, excised roots were exposed to lead in presence of CaCl₂ (1 µM or 10 µM) or were preincubated 10 min at 25 °C with the calcium channel antagonist LaCl₃ (4 µM and 40 µM) before lead exposure (10 µM).

Potential interference of lead nitrate, DPI, imidazole, quinacrine, NaN₃, allopurinol, G3, aminoguanidine, 2-bromoethylamine, staurosporine, W7 and LaCl₃ with the CL assay system (oxidation of luminol by ROS), was tested, in absence of roots using the ROS generating systems: H₂O₂-peroxidase and xanthine-xanthine oxidase systems according to the method previously described (Forgue *et al.*, 1990). In addition, the lack of CL production by direct interaction between luminol and H₂O₂ was also evaluated.

2.3 Evaluation of calcium competition for lead entry into the roots

In order to test the antagonism of calcium on lead entry into the roots, lead uptake in *Vf* roots was analysed in presence or absence of calcium in the culture medium. A stock solution of lead nitrate salt was prepared in Tris HCl medium (pH 8.2) just before the experiments. Three segment roots (apex) of 1.5 cm, from 3-week old plant, were rinsed with sterile water

and cut in thin slices of 1 mm. *Vf* root segments were put in Tris HCl medium and exposed to lead (10 μM). For investigations with calcium, CaCl_2 (1 μM and 10 μM) was added to medium 10 min before the start of the experiment. Root fragments were collected after 10 min or 1 h of lead exposition and rapidly washed in distilled water. Lead bound to the rhizoderm was removed as follows: fragments were shaken end over end with 40 mL of 0.001 M HCl during 3 min, and then 360 μL of 1 M HCl were added to yield a final concentration of 0.01 M HCl. After shaking for another 5 min, root fragments were washed in distilled water, weight fresh, oven-dried at 80 °C for 48 h and then weight dry.

Roots were mineralized in a 1:1 mixture of 65 % HNO_3 and 30 % H_2O_2 at 80 °C during 6 h. After filtration, lead concentrations were determined with an IRIS Intrepid II XDL ICP-OES. The accuracy of the analytical procedure was verified using a reference material: Virginia tobacco leaves (CTA-VTL-2, polish certified reference material; ICHTJ) with $22.1 \pm 1.2 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ Pb.

2.4 Statistical analysis

Results were expressed as mean \pm SE of five separate experiments. For each experiment, statistical analysis was performed using a one-way ANOVA and the multiple comparison method of Tukey (Keppel, 1973).

3 Results

3.1 Induction of oxidative burst by lead

Induction of *Vicia faba* excised roots chemiluminescence (CL) activity was measured in the presence of luminol as enhancer, for 120 s at 25 °C after lead treatment (Fig. 1A).

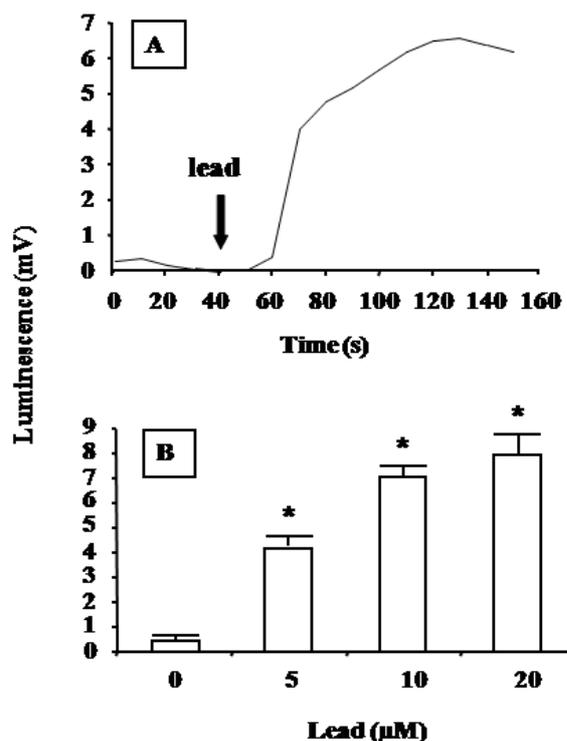


Figure 1: Oxidative metabolism of *Vicia faba* excised roots investigated by luminol-dependent chemiluminescence (CL).

CL was measured using a thermostatically controlled luminometer 1251 LKB (25°C). CL response was expressed in mV. (A) Excised roots were exposed to 10 μM of lead nitrate. The curve is representative of five different experiments with identical results. (B) Mean of CL peak value reached for 0, 5, 10 and 20 μM of lead nitrate treatment. * Indicates values significantly different from control (p < 0.01).

Lead stimulation was carried out under continuous CL recording. In absence of lead, the time course of CL production remained constant at a low level (0.45 ± 0.05 mV). In the presence of lead, after a lag time of 15 ± 3 s, CL production increased rapidly and reached a maximum value after 90 ± 15 s of lead stimulation. Then, CL decreased slowly to the basal line after 350 ± 20 s (data not shown). Excised roots exposed to a lead concentration range from 5 to 20 μM, demonstrated a dose effect on the peak of CL (Fig. 1B). The maximum effect was observed for 20 μM. In these conditions, whatever lead concentration was, CL

production lag time after lead treatment remained constant (data not shown). Even if the maximum CL values were reached more rapidly for the higher concentrations of lead, results were not significantly different between 5 and 20 μ M.

To analyse the nature of ROS produced during lead treatment, root fragments were co-treated with two antioxidant enzymes, the $O_2^{\cdot -}$ scavenger SOD or the H_2O_2 scavenger CAT.

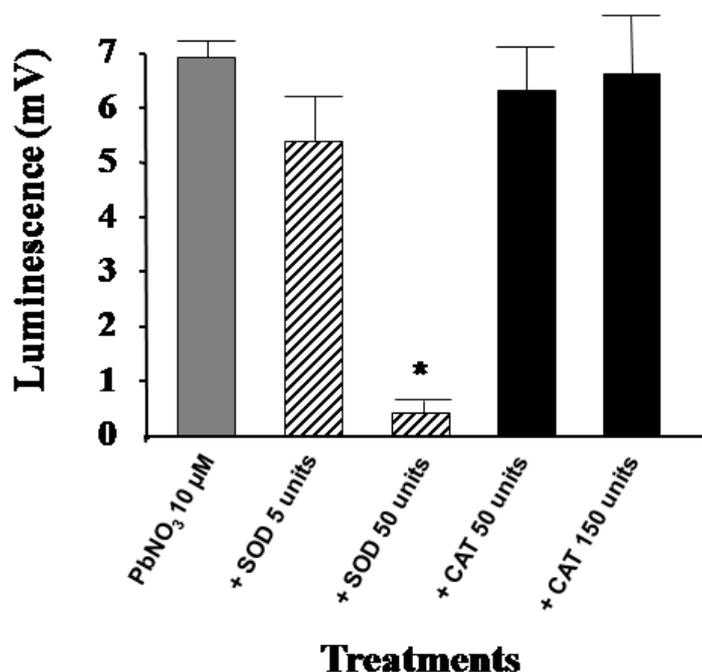


Figure 2: Nature of ROS produced during lead-induced oxidative burst, investigated by CL.

Excised roots were preincubated 10 min with the $O_2^{\cdot -}$ scavenger SOD or the H_2O_2 scavenger CAT before lead exposure. Means of CL peak value \pm SE of five experiments are reported. * Indicates values significantly different from lead treated roots ($p < 0.01$).

Results of figure 2 showed that CL production was dose dependently reduced by SOD (5 and 50 units). In contrast, lead-induced CL production was not modulated by CAT (50 and 150 units).

3.2 Potential source of ROS

To determine the role of NADPH-oxidase-like in lead enhanced CL, excised roots were pre-incubated with two concentrations of imidazole, quinacrine and DPI, 10 min before lead treatment.

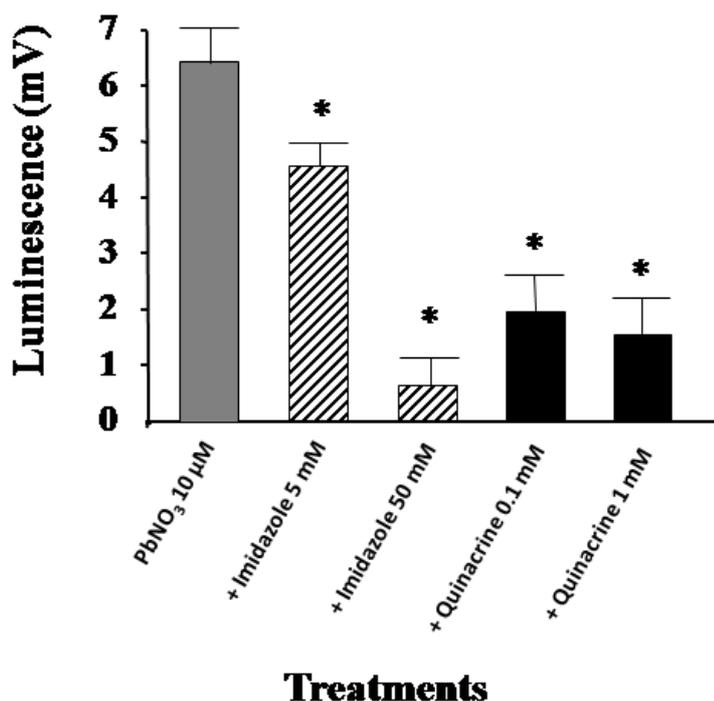


Figure 3: Potential role of NADPH oxidase in lead-induced oxidative burst investigated by CL.

Excised roots were preincubated 10 min with the NADPH-oxidase inhibitor imidazole and quinacrine before lead exposure. Means of CL peak value \pm SE of five experiments are reported. * Indicates values significantly different from lead treated roots ($p < 0.01$).

Results of figure 3 and 4 showed that CL production enhanced by lead (10 μ M) was dose dependently inhibited by imidazole (5 and 50 mM) and low concentration of DPI (0.1 and 1 μ M). Results of figure 3 also demonstrated that lead-induced ROS generation was inhibited by quinacrine (0.1 and 1 mM).

The potential role of peroxidases in ROS production was investigated using the peroxidase inhibitor NaN₃. After 10 min of pre-incubation with NaN₃ (1 mM and 10 mM), results showed that this inhibitor had no effect on lead dependent CL production (Fig. 4).

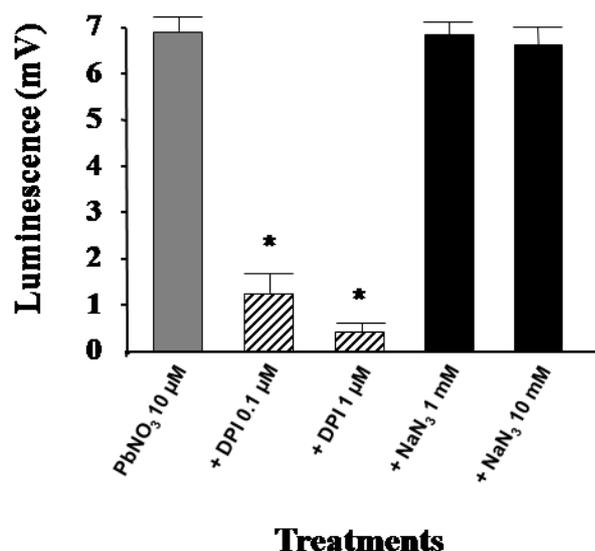


Figure 4: Potential role of NADPH oxidase and peroxidases in lead-induced oxidative burst investigated by CL.

Excised roots were preincubated 10 min with the NADPH-oxidase inhibitor DPI or with horseradish peroxidase inhibitor sodium azide (NaN₃) before lead exposure. Means of CL peak value ± SE of five experiments are reported. * Indicates values significantly different from lead treated roots (p<0.01).

Similar results were found (Fig. 5) using the xanthine oxidase inhibitor allopurinol (0.2 mM and 2 mM) and the PAO inhibitor G3 (1 µM and 10 µM).

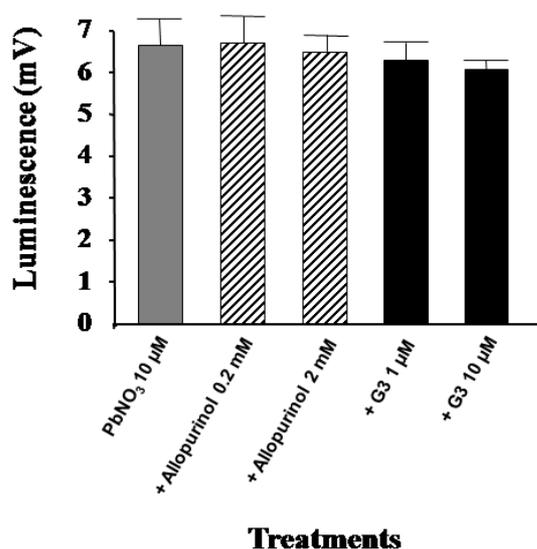


Figure 5: Potential role of xanthine oxidases and polyamine oxidases in lead-induced oxidative burst investigated by CL.

Excised roots were preincubated 10 min with the xanthine oxidase inhibitor allopurinol or with the PAO inhibitor N-prenylgmatine (G3) before lead exposure. Means of CL peak value ± SE of five experiments are reported.

In order to investigate the role of the copper containing-amine oxidases (CuAOs) in lead-induced NADPH-oxidase-like activation, excised roots were incubated 10 min with the CuAO inhibitors aminoguanidine (1 mM and 10 mM) and 2-bromoethylamine (1 μ M and 10 μ M) before addition of lead. The lead-induced ROS generation was not modulated by these inhibitors (Fig. 6).

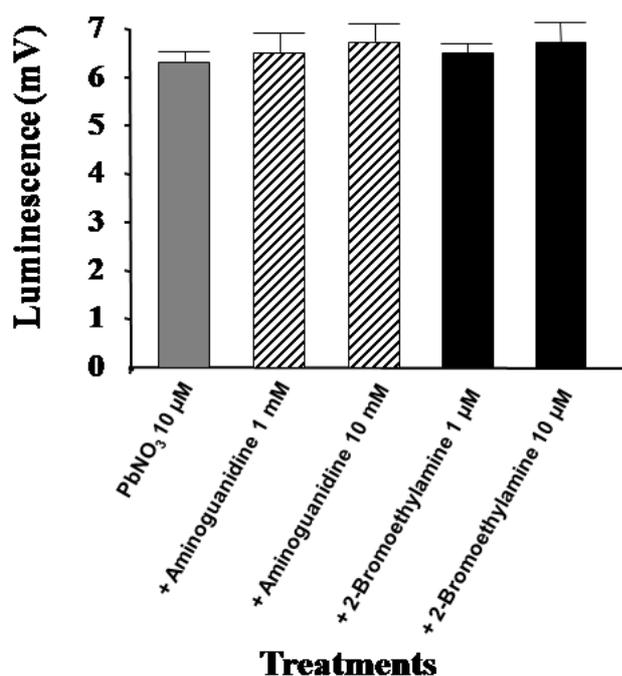


Figure 6: Potential role of copper containing-amine oxidases in lead-induced oxidative burst investigated by CL.

Excised roots were preincubated 10 min with CuAO inhibitors 2-bromoethylamine or aminoguanidine before lead exposure. Means of CL peak value \pm SE of five experiments are reported.

Results of figure 7 showed that CL production was dose dependently inhibited by the PK inhibitor staurosporine (10 nM and 0.1 μ M). In the presence of the calmodulin inhibitor W7 (0.2 mM and 2 mM), a huge inhibition of CL production was observed (Fig. 7).

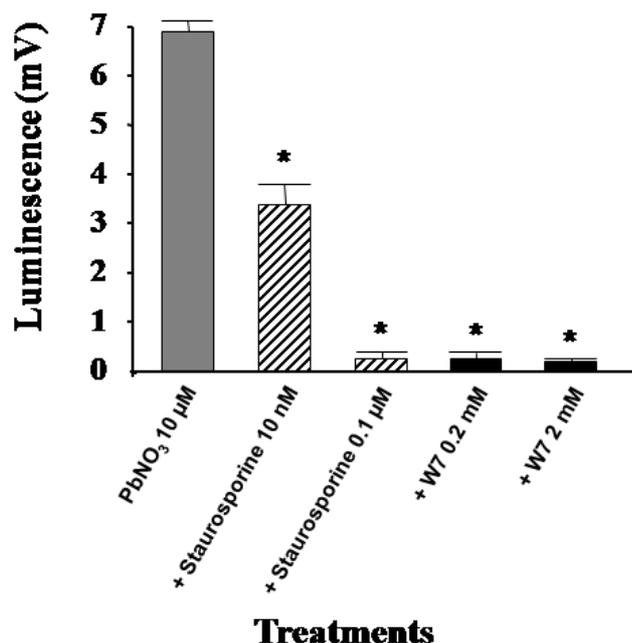


Figure 7: Potential role of protein kinases and calmodulin in lead-induced oxidative burst investigated by CL.

Excised roots were preincubated 10 min with the PK inhibitor staurosporine or with the calmodulin antagonist W7 before lead exposure. Means of CL peak value \pm SE of five experiments are reported. * Indicates values significantly different from lead treated roots ($p < 0.01$).

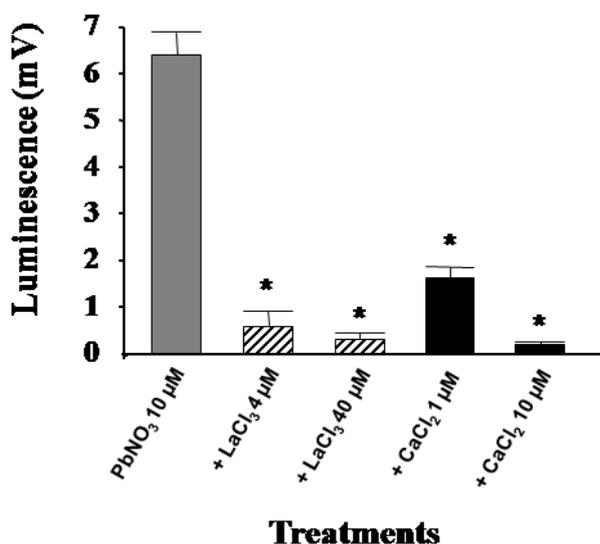


Figure 8: Implication of Calcium channel in lead-induced oxidative burst investigated by CL.

Excised roots were exposed to lead in presence of CaCl₂ or were preincubated 10 min with the calcium channel antagonist LaCl₃ before lead exposure. Means of CL peak value \pm SE of five experiments are reported. * Indicates values significantly different from lead treated roots ($p < 0.01$).

The role of calcium channel in the lead-stimulated oxidative burst was investigated using the calcium entry blocker La^{3+} . In excised plant roots exposed to lead, La^{3+} (4 μM and 40 μM) strongly reduced ROS production (Fig. 8), more than 90 %. Similar results were obtained in presence of 10 μM CaCl_2 in the culture medium. Data also showed that calcium inhibition is dose dependent.

3.3 Lead content in roots

In order to investigate the calcium antagonism on lead entry into the roots, *Vf* root fragments were preincubated with CaCl_2 (1 and 10 μM).

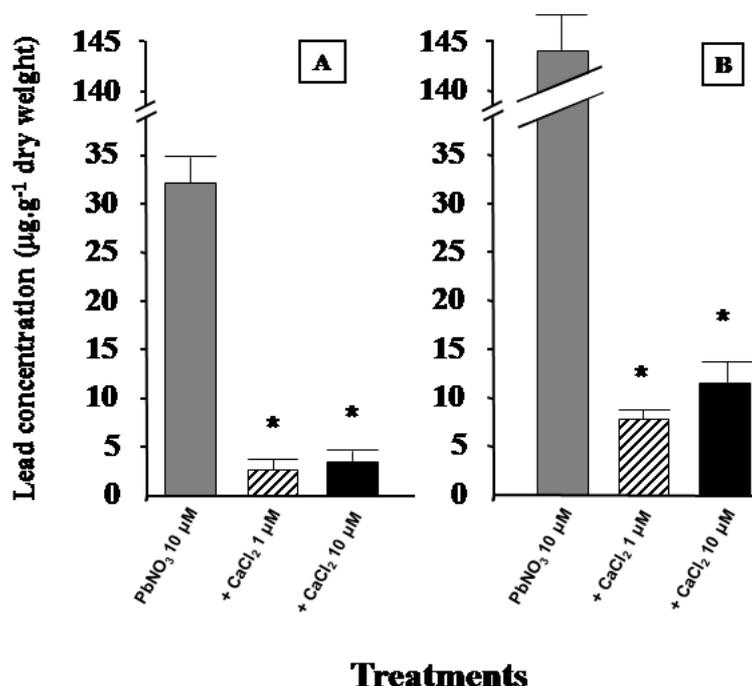


Figure 9: Calcium completion for Pb entry into roots investigated by ICP-OES.

Excised roots were exposed to lead in presence of CaCl_2 10 min (Fig 9A) or 1 h (Fig 9B). Means of lead concentration \pm SE of five experiments are reported. * Indicates values significantly different from lead treated roots ($p < 0.01$).

After 10 min of co-treatment, results showed that lead entry into roots was strongly reduced by 93 % with 1 μM of CaCl_2 and by 90 % with 10 μM CaCl_2 (Fig. 9A). After 1 h of incubation, for all treatments, lead uptake was higher than that of 10 min treated-roots (Fig 9B). However, lead uptake inhibition by the presence of calcium in the medium culture was also strong. 1 μM and 10 μM CaCl_2 drastically reduced lead uptake by respectively 95 % and 91 %. Differences observed between 1 μM CaCl_2 and 10 μM CaCl_2 co-treatments were not significant.

4 Discussion

In this study, oxidative burst was investigated by luminol-dependent-chemiluminescence. In excised *Vicia faba* roots, lead triggered a rapid and dose-dependent increase in ROS production (Fig. 1A and 1B). Results obtained in Figure 2 suggested that, at least in first step, lead-induced oxidative burst is mediated by O_2^- and not by H_2O_2 . In plants, four biological systems are putative sources of ROS during biotic or abiotic stresses: plasma-membrane-bound NADPH-oxidases, cell-wall-bound peroxidases, amine oxidases in the apoplast and xanthine oxidase. In this study, specific inhibitors of these putative ROS sources were used to determine the mechanism of lead-induced ROS generation. Our results (Fig. 4) showed that ROS production by lead-exposed excised roots was sensitive to millimolar concentration of two widely used NADPH-oxidase inhibitors, imidazole and quinacrine (Auh and Murphy, 1995; Van Gestelen *et al.*, 1997). Data also demonstrated that ROS production was extremely sensitive to micromolar concentration of DPI (Fig. 4). This compound has been reported to inhibit the mammalian neutrophil NADPH-oxidase activity by binding itself to the two structural components of the protein (Doussière *et al.*, 1999). These results underlined the potential role of NADPH-oxidase-like enzyme in generating ROS in lead-treated *Vf* roots. Using DPI, some authors suggested that cadmium-induced oxidative stress is also mediated by an NADPH-oxidase-like enzyme (Garnier *et al.*, 2006; Olmos *et al.*, 2003). However, Frahry and Schopfer (1998) have shown that DPI can also inhibit peroxidase activity. In barley seedlings treated by Co, Cd, Cu or Al, Simonovicova *et al.* (2004) showed that hydrogen peroxide production is mediated by peroxidase. In this study (Fig. 4), lead-induced ROS production was insensitive to millimolar concentration of NaN_3 , a well-known peroxidase and cytochrome oxidase inhibitor (Keilin, 1936). These data demonstrated that peroxidase activation is not associated to lead-induced ROS generation. Amine oxidases (AOs) are hydrogen peroxide-producing enzymes that play a role in defence responses to wounding and pathogen invasion (Rea *et al.*, 2002; Yoda *et al.*, 2006). In plants, two main types of AOs are known: the copper containing-AO (CuAO) and the polyamine oxidase (PAO). *In vitro* and *in vivo*, in maize mesocotyl segments, DPI has been reported to be a good PAO inhibitor (Cona *et al.*, 2006). Moreover, PAO activity was modulated by cadmium and copper (Groppa *et al.*, 2007). Cona *et al.* (2006) demonstrated that N-prenylagmatine (G3) is a powerful and selective inhibitor of PAO activity either *in vitro* or *in vivo*. Our data showed (Fig. 5) that lead-induced oxidative burst was not modulated by this PAO inhibitor. Similar results (Fig. 6) were found using the CuAO reversible inhibitor 2-bromoethylamine (Yu *et al.*,

2001) and with the CuAO irreversible inhibitor aminoguanidine (Yu and Zuo, 1997). Our results demonstrated that AOs are not implicated in ROS generation in early step of lead-induced oxidative stress. In addition, data demonstrated that ROS production was insensitive to allopurinol (Fig. 5), a well-known inhibitor of the xanthine oxidase (Delgado *et al.*, 1966). No work underlined the specific role of xanthine oxidase during metal stress. Romero-Puertas *et al.* (1999) showed that cadmium had no effect on xanthine oxidase activity in cadmium treated pea leaf peroxisomes. Moreover, metal ions could also inhibit bovine xanthine oxidase activity (Mondal and Mitra, 1996). According to the results obtained with DPI and the other inhibitors, data reported in this work clearly demonstrated the pivotal role of NADPH-oxidase-like enzyme in lead induction of the oxidative burst.

The inhibition of chemiluminescence production in *Vf* root tissues treated by lead in presence of the PK inhibitor staurosporine revealed the role of PK enzyme in lead-induced NADPH-oxidase-like activation (Fig. 7). In mammalian cells, protein kinase C (PKC) is involved in NADPH-oxidase activation. In PC12 cells, Jadhav *et al.* (2000) demonstrated that lead modulate PKC activity. However, there are few reports on the existence and functions of PKC homologues in plants. Although PKC-like enzyme activity has been shown in plants (Subramaniam *et al.*, 1997), its corresponding gene in the *Arabidopsis* genome has not been identified. However, diacyl glycerol-dependent PKC homologous genes have been isolated from other plants, and showed to function in plant defense responses including production of defensive secondary metabolites (Chandok and Sopory, 1998; Subramaniam *et al.*, 1997; Vasconsuelo *et al.*, 2003, 2004). In this work, the complete inhibition of lead-induced ROS production by the calmodulin inhibitor W7 (Fig. 7) suggested the role of calmodulin in NADPH-oxidase-like enzyme activation. In plants, calcium-calmodulin-dependent protein kinases (CCaMKs) and calmodulin-dependent protein kinases (CaMKs) are the only PKs with a calmodulin binding domain. Although CaMKs are well characterized from animals and yeast, only one putative representative is known in plants (Watillon *et al.*, 1995). CCaMKs are also rare in plants and might be expressed in the tissues of few plants only (Poovaiah *et al.*, 1999). Moreover, their exact roles and functions in plant are not well known. Even if this study underlined the importance of PK in NADPH oxidase-like enzyme activation and revealed a calmodulin-dependant step in lead-induced ROS production, the link between PK and calmodulin is not clear.

Our results underlined the possible relationship between calcium channels and lead-induced oxidative burst in *Vf* roots. The calcium entry blocker La^{3+} was efficient in inhibiting chemiluminescence production (Fig. 8). La^{3+} may block voltage-operated channels by inhibiting not only ATPases, but also $\text{Ca}^{2+}/\text{nH}^+$ antiporters (Bush, 1995). In plants, Ca^{2+} transport in isolated membrane vesicles has been attributed to the P-type- Ca^{2+} -ATPase (Bush, 1995). It has been observed that La^{3+} inhibited linear as well as saturable cadmium uptake kinetics. Some authors have suggested that La^{3+} may act by competing with cadmium for plasma membrane transporters (Cohen *et al.*, 1998). In addition, similarly studies experiments with simultaneous application of cadmium and extra cellular Ca^{2+} have shown a competitive response with the inhibition of oxidative burst by Ca^{2+} (Garnier *et al.*, 2006; Olmos *et al.*, 2003). In this work, the results obtained with simultaneous application of Ca^{2+} and lead showed the same competitive response and the total inhibition of lead-induced oxidative burst by extra cellular Ca^{2+} (Fig. 8). Results obtained in Figures 9A and 9B strongly suggested that the inhibition of lead-induced oxidative burst by calcium could be due to the huge inhibition of lead entry into the roots. Huang and Cunningham (1996) suggested that lead entry into plant cells occurs, at least in part, through Ca^{2+} -permeable channel. Some authors found that cyclic nucleotide-gated channel (CNGC) may serve as entry pathways for lead in plant cells (Sunkar *et al.*, 2000). These proteins are similar to the mammalian cyclic nucleotide-gated nonselective cation channels and have a calmodulin binding domain. Tobacco transgenic lines which over-expressed a CNGC isoform NtCBP4, exhibited hypersensitivity to Pb^{2+} , associated with enhanced Pb^{2+} accumulation. In contrast, seedlings that expressed a truncated version of this protein, from which the C-terminal, with the calmodulin-binding domain was removed, showed improved tolerance to Pb^{2+} , with attenuated accumulation of this metal. Therefore, calmodulin could modulate lead uptake in plant cell roots. Our data, which highlighted the complete inhibition of lead-induced ROS production by the calmodulin inhibitor W7 (Fig. 7), could confirm these results. Disruption of the *Arabidopsis* CNGC1 gene, which encodes a homologous protein to NtCBP4, reduced Pb^{2+} and Ca^{2+} uptake into plants (Ma *et al.*, 2006). Thus, NtCBP4 and AtCNGC1 are probably Ca^{2+} -permeable channels providing a route for Pb^{2+} entry across the plasma membrane.

5 Conclusion

In summary, our results suggested that lead entry in root cells may occur via calcium-permeable channels. Data also demonstrated that the early step in lead-induced oxidative burst in *Vicia faba* roots is strongly associated to NADPH-oxidase activation. This study underlined the importance of a PK in NADPH-oxidase-like enzyme activation and revealed a calmodulin-dependant step in lead-induced ROS production. However, NADPH-oxidase may not be the only source of ROS after hours of exposure. Garnier *et al.* (2006) highlighted that cadmium-induced oxidative burst in tobacco cells was composed of three waves of reactive oxygen species. The first wave consisted in a transient NADPH oxidase-dependent accumulation of ROS, followed by a second wave of O_2^- production by mitochondria. The third wave consisted in fatty acid hydroperoxide accumulation. In this work, a transient NADPH oxidase-dependent accumulation of ROS in lead-treated *Vicia faba* roots has been observed. In addition, Romanowska *et al.* (2002) observed that, at low concentrations, lead significantly stimulated respiratory rate in mitochondria. All these results suggest close mechanisms for lead and cadmium induction of ROS production. Further work will be necessary to determine other potential sources of ROS in lead-induced oxidative stress.

References

- Allan AC, Fluhr R. Two distinct sources of elicited reactive oxygen species in tobacco epidermal cells. *Plant Cell* 1997;9:1559-72.
- Auh CK, Murphy TM. Plasma membrane redox enzyme is involved in the synthesis of O_2^- and H_2O_2 by Phytophthora elicitor-stimulated rose cells. *Plant Physiol* 1995;107:1241-7
- Bolwell G, Wojtaszek P. Mechanism for the generation of reactive oxygen species in plant defense – a broad perspective. *Physiol Mol Plant Pathol* 1997;51:347-66.
- Bush DS. Calcium regulation in plant cells and its role in signaling. *Annual Review of Plant Physiol and Plant Mol Biol* 1995;46:95-122.
- Chandok MR, Sopory SK. ZmcPKC70, a protein kinase C-type enzyme from maize. *J Biol Chem* 1998;273:19235-42.
- Cohen CK, Fox TC, Garvin DV, Kochian LV. The role of iron-deficiency stress responses in stimulating heavy-metal transport in plants. *Plant Physiology* 1998;116:1063-72.
- Cona A, Rea G, Angelini R, Federico R, Tavladoraki P. Functions of amine oxidases in plant development and defence. *Trends Plant Sci* 2006;11:80-8
- Delgado JN, Cosgrove FP, Isaacson EI. Allopurinol: xanthine oxidase inhibitor. *Tex Med* 1966;62:100-1
- Desikan R, Hancock JT, Coffey MJ, Niell SJ. Generation of active oxygen in elicited cells of *Arabidopsis thaliana* is mediated by a NADPH oxidase-like enzyme. *FEBS Lett* 1996;382:213-7.
- Doussière J, Bouzidi F, Poinas A, Gaillard J, Vignais PV. Kinetic study of the activation of the neutrophil NADPH oxidase by arachidonic acid. Antagonistic effects of arachidonic acid and phenyl arsine oxide. *Biochemistry* 1999;38:16394-406.
- Forgue MF, Pipy B, Beraud M, Pinelli E, Cambon C, Didier A, Souqual MC, Vandaele J. Possible implication of arachidonic acid metabolism in the decrease of chemiluminescence production after exposure of murine peritoneal macrophages to diethylnitrosamine and tumour promoter, 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Carcinogenesis* 1991;12:449-57.
- Forgue MF, Pipy B, Beraud M, Souqual MC, Combis JM. 1-naphthyl N-methyl carbamate effect on intra- and extracellular concentrations of arachidonic acid metabolites, and on the chemiluminescence generation by mouse peritoneal macrophages. *Int J Immunopharmacol* 1990;12:155-63.

- Frahry G, Schopfer P. Inhibition of O₂-reducing activity of horseradish peroxidase by diphenyleneiodonium. *Phytochemistry* 1998;48:223-7.
- Garnier L, Simon-Plas F, Thuleau P, Agnel JP, Blein JP, Ranjeva R, Montillet JL. Cadmium affects tobacco cells by a series of three waves of reactive species that contribute to cytotoxicity. *Plant, Cell and Environ* 2006;29:1956-69.
- Groppa MD, Ianuzzo MP, Tomaro ML, Benavides MP. Polyamine metabolism in sunflower plants under long-term cadmium or copper stress. *Amino acids* 2007;32:265-75.
- Huang JW, Cunningham SD. Lead phytoextraction: species variation in lead uptake and translocation. *New Phytol* 1996;134:75-84.
- Keilin D. The action of sodium azide on cellular respiration and on some catalytic oxidation reactions. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 1936;121:165-73
- Jadhav AL, Ramesh GT, Gunasekar, PG. Contribution of protein kinase C and glutamate in Pb²⁺-induced cytotoxicity. *Toxicol Lett* 2000;115:89-98.
- Johnson FM. The genetic effects of environmental lead. *Mut Res* 1998;410:123-40.
- Kawano T. Roles of the reactive oxygen species-generating peroxidase reactions in plant defense and growth induction. *Plant Cell Rep* 2003;21:829-37.
- Keppel G. *Design and analysis: a researcher's handbook*. Prentice Hall, NJ: Englewood Cliffs;1973, p 658-63
- Low PS, Merida JR. The oxidative burst in plant defense: function and signal transduction. *Physiol Plant* 1996;96:533-42.
- Ma W, Ali R, Berkowitz GA. Characterization of plant phenotypes associated with loss-of-function of AtCNGC1, a plant cyclic nucleotide gated cation channel. *Plant Physiol. Biochem.* 2006;44:494–505.
- Malecka A, Jarmuszkiewicz W, Tomaszewska B. Antioxidative defense to lead stress in subcellular compartments of pea root cells. *Acta Biochim Pol* 2001;48:687–98.
- Mondal MS, Mitra S. The inhibition of bovine xanthine oxidase activity by Hg²⁺ and other metal ions. *J Inorg Biochem* 1996;62:271-9
- Olmos E, Martínez-Solano JR, Piqueras A, Hellín E. Early steps in the oxidative burst induced by cadmium in cultured tobacco cells (BY-2 line). *J Exp Bot* 2003;54:291-301.
- Overmyer K, Brosche M, Kangasjarvi J. Reactive oxygen species and hormonal control of cell death. *Trends in Plant Sci* 2003;8:335–42.

- Poovaiah BW, Xia M, Liu Z, Wang W, Yang T, Sathyanarayanan PV, Franceschi VR. Developmental regulation of the gene for chimeric calcium/calmodulin-dependent protein kinase in anthers. *Planta* 1999;209:161-71
- Razem FA, Bernards MA. Reactive oxygen species production in association with suberization : evidence for an NADPH-dependent oxidase. *J Exp Bot* 2003;54:935-41.
- Rea G, Metoui O, Infantino A, Federico R, Angelini R. Copper amine oxidase expression in defense responses to wounding and *Ascochyta rabiei* invasion. *Plant Physiol* 2002;128:865-75
- Romero-Puertas MC, McCarthy I, Sandalio LM, Palma JM, Corpas FJ, Gomez M, del Rio LA. Cadmium toxicity and oxidative metabolism of pea leaf peroxisomes. *Free Radic Res* 1999;31:S25-31
- Segal AW, Abo A. The biochemical basis of the NADPH oxidase of phagocytes. *Trends Biochem Sci* 1993;18:43-7.
- Shah K, Kumar RG, Verma S, Dubey RS. Effect of cadmium on lipid peroxidation, superoxide anion generation and activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. *Plant Sci* 2001;161:1135-44.
- Simonovicova M, Huttova J, Mistrik I, Siroka B, Tamas L. Peroxidase mediated hydrogen peroxide production in barley roots grown under stress conditions. *Plant Growth Reg* 2004;44:267-75
- Simon-Plas F, Elmayan T, Blein JP. The plasma membrane oxidase NtrbohD is responsible for AOS production in elicited tobacco cells. *Plant J* 2003;31:137-47
- Singh RP, Tripathi RD, Sinha SK, Maheshwari R, Srivastava HS. Response of higher plants to lead contaminated environment. *Chemosphere* 1997;34:2467-93.
- Smith IK, Vierheller TL, Thorne CA. Assay of glutathione reductase in crude tissue homogenates using 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid). *Anal Biochem* 1988;175:408-23.
- Subramaniam R, Despres CH, Brisson N. A functional homolog of mammalian protein kinase C participates in the elicitor-induced defense response in potato. *Plant Cell* 1997;9:653-64.
- Sunkar R, Kaplan B, Bouché N, Arazi T, Dolev D, Talke IN, Maathuis FJM, Sanders D, Bouchez D, Fromm H. Expression of a truncated tobacco *NtCBP4* channel in transgenic plants and disruption of the homologous *Arabidopsis CNGC1* gene confer Pb^{2+} tolerance. *Plant J* 2000;24:533-42.

- Van Gestelen P, Asard H, Caubergs RJ. Solubilization and separation of a plant plasma membrane NADPH-O₂⁻ synthase from other NAD(P)H oxidoreductases. *Plant Physiol* 1997;115:543-50
- Vasconsuelo A, Giuletti AM, Picotto G, Rodriguez-Talou J, Boland R. Involvement of the PLC/PKC pathway in chitosan-induced anthraquinone production by *Rubia tinctorum* L cell cultures. *Plant Sci* 2003;165:429– 36.
- Vasconsuelo A, Giuletti AM, Boland R. Signal transduction events mediating chitosan stimulation of anthraquinone synthesis in *Rubia tinctorum*. *Plant Sci* 2004;166:405–13.
- Verma S, Dubey RS. Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. *Plant Sci* 2003;164:645-55.
- Wojtaszek P. Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochem J* 1997;322:681-92.
- Watillon B, Kettmann R, Boxus P, Burny A. Structure of a Calmodulin-Binding Protein Kinase Gene from Apple. *Plant Physiol* 1995;108:847-8
- Yoda H, Hiroi Y, Sano H. Polyamine oxidase is one of the key elements for oxidative burst to induce programmed cell death in tobacco cultured cells. *Plant Physiol* 2006;142:193-206
- Yu PH, Zuo DM. Aminoguanidine inhibits semicarbazide-sensitive amine oxidase activity: implications for advanced glycation and diabetic complications. *Diabetologia* 1997;40:1243-50
- Yu PH, Davis BA, Deng Y. 2-bromoethylamine as a potent selective suicide inhibitor for semicarbazidesensitive amine oxidase. *Biochem Pharmacol* 2001;61:741–8

B. Induction du stress oxydatif dans les racines de *Vicia faba* au cours d'une exposition de courte durée au plomb : implication de la NADPH-oxydase

-Avant-propos-

L'étude des sources enzymatiques productrices d'ERO a révélé le rôle fondamental de la NADPH-oxydase dans l'induction de la flambée oxydative durant les premières minutes d'exposition au plomb. Les NOX semblent jouer un rôle très important dans les racines des plantes, puisque sur les dix gènes composant cette famille multigénique, sept s'y expriment dont cinq spécifiquement (Zimmermann *et al.*, 2004). L'objectif de cette étude était de déterminer si la flambée oxydative générée par le plomb dans les premières minutes d'exposition, et sur racines excisées, était responsable du stress oxydatif évalué dans les racines de plantes entières après une heure d'exposition (Chapitre III). Nous avons donc traité des fèves avec 10 μM de plomb, et certaines plantes ont été prétraitées avec du diphenylène iodonium (DPI), un inhibiteur de la NOX. Nous avons évalué, sur les racines traitées, l'évolution des mêmes biomarqueurs de stress que ceux analysés lors de la première étude (PC, enzymes antioxydantes, peroxydation lipidique). Cependant, pour éviter les effets potentiellement néfastes du DPI sur de longues durées, nous avons limité l'étude à huit heures d'exposition.

La technique de chimiluminescence utilisée précédemment n'est pas adaptée pour évaluer la production d'ERO sur plantes entières. Nous avons procédé à des mesures de production d'ERO dans les racines de fèves par des techniques de localisation histochimique de l' H_2O_2 avec une solution contenant un mélange de KI et d'amidon, et de l' O_2^- avec une solution de NBT.

-Publication-

Pourrut B. and E Pinelli. En révision avant d'être re-soumise à *Physiologia Plantarum*. Short term exposure to Pb induces oxidative stress in *Vicia faba* roots: involvement of NADPH-oxidase.

Short term exposure to Pb induces oxidative stress in *Vicia faba* roots: involvement of NADPH-oxidase

Bertrand Pourrut and Eric Pinelli ¹

*Corresponding author: pinelli@ensat.fr

¹ EcoLab UMR 5245 CNRS-UPS-INPT, ENSAT Avenue de l'agrobiopole-Auzeville-Tolosane BP 107- F 31 326 Castanet-Tolosan Cédex.

Abstract

The mechanism by which NADPH-oxidase mediates lead-induced oxidative stress was investigated in *Vicia faba* (*Vf*) roots. The changes in the antioxidant enzymes activity, apoplastic ROS production, phytochelatin (PC) content, and lipid peroxidation rate were evaluated after short-term exposure (1 to 8 h) to low concentrations of lead (10 μ M) in the presence or absence of the NADPH-oxidase inhibitor, diphenylene iodonium (DPI). After 1 h, lead strongly modulated the antioxidant response, induced an oxidative burst in apoplast and generated lipid peroxidation. In the presence of DPI, some antioxidant enzyme activities were significantly inhibited at 1 h of lead exposure. Lipid peroxidation and oxidative burst were also abolished. These data suggest that NADPH-oxidase is strongly involved in the early steps of lead-induced oxidative stress. However, resumption of some antioxidative enzyme activities at 4 h of lead treatment suggested the occurrence of an alternative source of ROS. This study also underlined the importance of glutathione during lead exposure. Our results revealed a strong induction of glutathione reductase (GR, EC 1.6.4.2) activity that suggests a key role for GSH in lead-induced oxidative stress regulation. GSH is crucial for the correct operation of the antioxidative system as well as in the primary detoxification pathway requiring PC synthesis. In our conditions, PCs synthesis had begun after 1 h of lead exposure whereas the GSH pool remained constant.

Key words: antioxidative enzyme, DPI, glutathione, glutathione reductase, lipid peroxidation, Pb, reactive oxygen species.

Abbreviations: APX, ascorbate peroxidase; BHT, butylated hydroxytoluene; CAT, catalase; GPOX, guaiacol peroxidase; GR, glutathione reductase; GSH, reduced glutathione; GSSG, oxidised glutathione; LHPO, lipid hydroperoxides; MDA, malondialdehyde; NBT, Nitro Blue Tetrazolium; PC, phytochelatin; PCS, phytochelatin synthase; ROS, Reactive oxygen species; SOD, superoxide dismutase; TBARS, Thiobarbituric acid reactive substances; *Vf*, *Vicia faba*.

1 Introduction

Lead (Pb) has been used since ancient times and is one of the most widespread toxic metals found in the environment. It enters plants mainly through the root system. However, plants have several defense mechanisms allowing them to deal with heavy metal stress. Phytochelatins (PC) synthesis is one of the principal responses of plants to metal exposure and PC enables heavy metal storage and detoxification. Piechalak *et al.* (1997) demonstrated that PC synthesis was very quickly induced in lead-treated *Vicia faba* roots. Moreover, *in vitro* study of PC synthase expressed in *E. coli*, showed that this enzyme, which catalyses PC synthesis, is activated by Pb ions (Ha *et al.*, 1999).

When lead enters the cell it may cause a range of morphological and physiological disorders (Sharma and Dubey, 2005). One general mechanism proposed for its toxicity is through generation of reactive oxygen species (ROS) resulting in an unbalanced cellular redox status (Maksymiec, 2007). In plants, lead is reported to produce ROS (Pourrut *et al.*, 2007) and alter the activities of antioxidant enzymes (Verma and Dubey, 2003; Reddy *et al.*, 2005). Formation of lipid peroxides is a prolonged consequence of lead-induced oxidative stress (Griffiths *et al.* 2000).

In plants, various enzymes have been described to protect the system against the damage caused by oxidative stress. Among these is superoxide dismutase (SOD, EC 1.15.1.1) which catalyses the dismutation of $O_2^{\cdot -}$ into H_2O_2 , which in turn diffuses into different cellular compartments. In chloroplast and cytosol compartments, H_2O_2 is readily eliminated by scavenging metabolic pathways, involving catalase (CAT, EC 1.11.1.6), ascorbate peroxidase (APX, EC 1.11.1.11), guaiacol peroxidase (GPOX, EC 1.11.1.7). Glutathione reductase (GR, EC 1.6.4.2) functions, in a complementary way, with APX in the ascorbate-glutathione cycle. By converting oxidised glutathione (GSSG) into reduced glutathione (GSH), GR maintains the GSH/GSSG ratio. Thus, GR is a crucial element in the antioxidative system (Foyer and Noctor, 2005; Maughan and Foyer, 2006) as well as in primary detoxification pathway for the synthesis of PCs (Asada, 1994).

Because lead (Pb) cannot readily undergo valence changes, the mechanisms that make lead cause oxidative stress are not clear. Only few, unclear data are known about molecular events effecting the course of lead-induced oxidative burst. Using pharmacological approaches with compounds such as diphenylene iodonium (DPI) we demonstrated that lead-induced ROS generation is mediated, at least in the first step, by NADPH-oxidase (Pourrut *et al.*, 2007). This plasma-membrane-bound enzyme, which produces superoxide anions ($O_2^{\cdot -}$), is

also thought to mediate cadmium-induced oxidative stress (Garnier *et al.*, 2006; Olmos *et al.*, 2003). The present paper is focused on lead-induced molecular changes in *Vicia faba* (Vf) roots after short lead exposure and the involvement of NADPH-oxidase in these changes. The lead uptake by the roots, antioxidant enzyme activities (SOD, CAT, APX, GPOX and GR), lipid peroxidation and PC synthesis were analysed in Vf roots treated by lead in the presence or absence of the NADPH-oxidase inhibitor DPI.

2 Materials and methods

2.1 Plant material and treatments

Broad beans (*Vicia faba* L.) were germinated on filter paper moistened with deionised water at 25 °C in the dark. After 7 d, the plants were grown in a PVC tank (4 plants per tank) containing 500 mL of aerated Hoagland solution (Sigma). After a growth period of two weeks, the plants were exposed to low concentrations of lead (10 µM, VWR). A stock solution of lead nitrate in culture medium was prepared just before the experiments. For investigations with the NADPH-oxidase inhibitor, DPI (1 µM, Sigma) was added to culture medium 30 min before the start of the experiment. To keep the nutrient composition and pH constant, solutions were renewed daily. The culture systems were located in a growth chamber with day/night air temperatures of 24/22 °C and relative humidity of 70/75 %. Plants were lit 16 h per day by a 600 W Osram Nav-T Super High Pressure Sodium Lamp providing a minimum photosynthetical photon flux density of 500 µmol.m⁻².s⁻¹ at the top of the plant. After the treatments, the plants were harvested. The roots were rapidly washed in distilled water and divided into two batches: in the first, intended for enzyme assay, lipid peroxidation assay and phytochelatin determination, roots were flash frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C until required. In the second batch, for Pb content measurement, lead bound to the rhizoderm was removed as follows: root fragments were shaken with 40 mL of 0.001 M HCl (VWR) for 3 min, and then 360 µL of 1 M HCl were added to yield a final concentration of 0.01 M HCl. After shaking for another 5 min, the fragments were washed in distilled water, oven-dried at 80 °C for 48 h and then weighed.

2.2 Evaluation of lead uptake by the roots

The possible inhibition of lead uptake by the roots was tested using the NADPH-oxidase inhibitor DPI in the culture medium. Dry roots were mineralized in a 1:1 mixture of 65 % HNO₃ (VWR) and 30 % H₂O₂ (VWR) at 80 °C for 6 h. After filtration, lead

concentrations were determined with an IRIS Intrepid II XDL ICP-OES. The accuracy of the analytical procedure was verified using the reference material Virginia tobacco leaves (CTA-VTL-2, Polish certified reference material; ICHTJ) with $22.1 \pm 1.2 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ Pb.

2.3 Enzyme assay

In order to evaluate the possible relationship between NADPH oxidase-like activation induced by lead and the enzyme involved in the antioxidative pathway, lead activation of CAT, APX, GPOX, SOD and GR were analysed in the presence or absence of the NADPH oxidase inhibitor DPI.

Frozen *Vicia faba* roots (300 mg) were homogenised in 2 ml of ice cold phosphate buffer (100 mM pH 7, Sigma) containing 10 mM EDTA (Sigma), 1% (w/v) polyvinylpyrrolidone (Sigma), 10 mM β -mercaptoethanol (Sigma), 5 mM ascorbic acid (Sigma) and antiproteases (chymostatin 10 mM and Sigma protease inhibitor cocktail). The suspension was centrifuged for 15 min at 12,000 g (4 °C). The supernatant was then assayed for antioxidant enzyme activity. Each enzyme activity was measured against a protein extract-free blank. The protein content was determined according to Bradford (1976), using bovine serum albumin (BSA, Sigma) as standard.

Catalase (CAT) activity was measured spectrophotometrically by following the consumption of H_2O_2 (VWR) at 240 nm at 25 °C (Aebi, 1984). The reaction mixture contained the enzyme extract (50 μg protein) in 50 mM phosphate buffer (pH 7.5). Addition of 10 mM H_2O_2 started the enzymatic reaction. The molar extinction coefficient of H_2O_2 at 240 nm was taken as $39.4 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. Enzyme activity was expressed as $\mu\text{moles of H}_2\text{O}_2$ degraded. $\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ protein.

Ascorbate peroxidase (APX) activity was evaluated by the decrease of absorbance at 290 nm due to ascorbate oxidation (Nakano and Asada, 1981). The reaction mixture contained 50 mM phosphate buffer (pH 7.5), 20 mM H_2O_2 , 0.5 mM ascorbic acid and enzyme extract (45 μg protein). The amount of ascorbate oxidised was calculated from the extinction coefficient of $2.6 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. The enzyme activity was expressed as $\mu\text{moles of H}_2\text{O}_2$ degraded. $\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ protein.

Glutathione reductase (GR) was assayed as the decrease in absorbance at 340 nm caused by the oxidation of NADPH (Dringen and Gutterer, 2002). This assay is based on the reduction of oxidised glutathione (GSSG) by NADPH in the presence of GR. The reaction mixture contained 50 mM phosphate buffer (pH 7.5), 0.5 mM EDTA, 1 mM GSSG (Sigma),

0.1 mM NADPH (Sigma) and enzyme extract (100 µg protein). The amount of NADPH oxidised was calculated from the extinction coefficient of $6.22 \text{ mM}^{-1}.\text{cm}^{-1}$. The enzyme activity was expressed as µmoles of NADPH oxidised. $\text{min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ protein.

The total activity of superoxide dismutase (SOD) was determined by measuring its ability to inhibit the photochemical reduction of nitro blue tetrazolium (NBT) according to the method of Giannopolitis and Ries (1977). The 3 ml reaction mixture contained 75 µM NBT (Sigma), 2 µM riboflavin (Sigma), 13 mM methionine (Sigma), 0.1 mM EDTA, 50 mM phosphate buffer (pH 7.8), and 50 µg enzyme extract. The test tubes containing the mixture were placed 30 cm below a light source (30 W fluorescent lamps). The reaction was started by switching on the light and was allowed to run for 10 min. The reaction was stopped by switching off the light and the absorbance at 560 nm. An unirradiated reaction mixture that did not develop color served as the control, and its absorbance was subtracted from that of the test tube. One unit of SOD activity was defined as the amount of enzyme required to cause 50 % inhibition of NBT reduction.

Guaiacol peroxidase (GPOX) activity was measured by following the decrease of absorbance at 470 nm due to guaiacol oxidation. The reaction mixture contained 50 mM phosphate buffer (pH 7.5), 4 mM guaiacol (Sigma), H_2O_2 (15 mM) and enzyme extract (70 µg protein). The amount of guaiacol oxidised was calculated from the extinction coefficient of $26.6 \text{ mM}^{-1}.\text{cm}^{-1}$. The enzyme activity was expressed as µmoles of guaiacol oxidised (GO). $\text{min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ protein.

2.4 ROS histochemical detection

The production of $\text{O}_2^{\cdot -}$ *in vivo* was visualized by incubating microtome-cut root sections 5 min in 10 mM K-citrate buffer (pH 6.0) containing 0.5 mM NBT (Frahry and Schopfer, 2001). H_2O_2 production was monitored by staining for 5 min root sections with the KI/starch reagent, which was composed of 4 % (w/v) starch and 0.10 M KI adjusted to pH 5.0 with KOH (Barcelo, 1998). Stained sections were placed on a microscope slide with a coverslip, then observed and photographed under a Olympus microscope.

2.5 Induction of phytochelatins and glutathione

To determine the relationship between lead, NADPH-oxidase-dependent ROS generation and PC synthesis, PC and GSH contents were evaluated as described previously (Béraud et al. 2007).

2.5 Evaluation of lipid peroxidation

The TBARS assay is the most commonly used to assess lipid peroxidation. However, malondialdehyde can only be formed from fatty acids with three or more double bonds (Halliwell and Gutteridge, 1989) and plant root tissues mainly contain high levels of 18:2 ($\Delta^{cis,9,12}$). Thus, to determine the lead-induced oxidative damage to the membrane and the potential role of NADPH-oxidase in this damage generation, lipid hydroperoxides (LHPO) were assayed according to Griffiths *et al.* (2000) in *Vf* roots treated by lead in presence or in absence of DPI.

FOX2 reagent was prepared according to a method described previously (Nourooz-Zadeh *et al.*, 1995). Xylenol orange (1 mM, Sigma) and ammonium ferrous sulphate (2.5 mM, Sigma) were dissolved in 250 mM H₂SO₄ (VWR). This concentrated reagent was diluted by a 1:9 volume of HPLC grade methanol (VWR) containing 4.4 mM butylated hydroxytoluene (BHT, Sigma) to make the working FOX2 reagent which comprised 250 μ M ammonium ferrous sulphate, 100 μ M xylenol orange, 25 mM H₂SO₄, and 4 mM BHT in 90% (v/v) methanol.

Total lipids were rapidly extracted from tissues by modification of the previously used method (Bligh and Dyer, 1959) according to Griffiths *et al.* (1997). All procedures were performed in dim light at 4 °C using chilled solvents (containing BHT, 0.01% w/v). Root tissues (approximately 0.2 g fresh weight) were homogenized with a pestle and mortar containing 1 mL acetic acid (0.15 M, VWR) and 7.5 mL chloroform/methanol (1:2, v/v; VWR). The pestle and mortar were rinsed with 2.25 mL chloroform and combined with the extract to which was added 2.25 mL distilled water. The suspension was centrifuged 5 min at 800 g and the lower chloroform phase containing the lipids was removed and aliquots dispensed into microtubes. Chloroform was then evaporated under N₂. The pellets were resuspended in 100 μ L HPLC grade methanol. The samples were left to incubate at room temperature for 30 min in the dark. 900 μ L of the FOX2 reagent were added. The samples were again incubated at room temperature for 30 min then centrifuged for 10 min at 2,400 g. Absorbance of the supernatant was measured at 560 nm. The concentration of hydroperoxides

was determined using the molar absorption coefficient of $6.0 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ derived for standard linoleate hydroperoxide (Gay *et al.*, 1999).

2.6 Statistical analysis

Results were expressed as mean \pm SD of three separate experiments. For each experiment, statistical analysis was performed using one-way ANOVA and the multiple comparison method of Tukey (Keppel, 1973).

3 Results

3.1 Lead accumulation in roots

In order to investigate the possible antagonism of DPI on the uptake of lead by the roots, *Vicia faba* were incubated with lead (10 μM) in the presence or in absence of the NADPH-oxidase inhibitor DPI (1 μM). The data reported in Table 1 demonstrate that lead uptake was high during first hour of incubation ($37.8 \pm 1.2 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1} \text{ DW}$). However, uptake then only increased slightly between 1 h and 8 h of treatment. DPI did not affect Pb uptake by the roots (Table 1).

Time (h)	Pb content ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1} \text{ DW}$)	
	Pb treatment	Pb + DPI treatment
0	n.d.	n.d.
1	37.8 ± 1.2	36.1 ± 2.1
4	49.3 ± 2.7	50.2 ± 3.6
8	61.3 ± 4.5	62.1 ± 3.9

Table 1: Influence of Pb, DPI and Pb+DPI treatments on the lead uptake by *Vicia faba* roots.

The values are means of three individual experiments with triplicates \pm standard deviation (S.D.). n.d. = not detected.

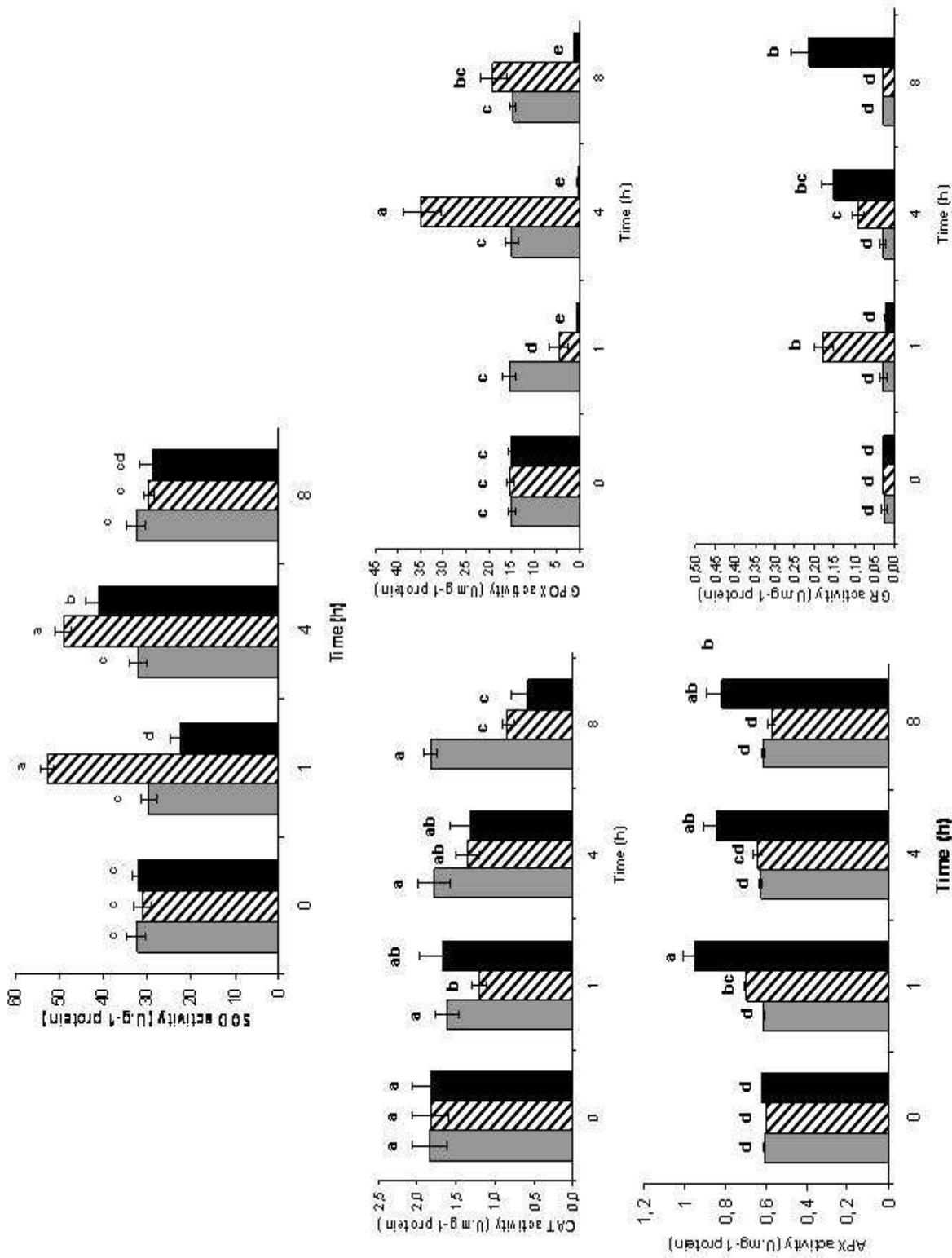


Figure 1: Influence of Pb and Pb+DPI treatments on antioxidant enzyme capacities in *Vicia*

faba roots.

Grey bars: control; Drawing bars: Pb; Black bars: Pb + DPI. The values are means of three individual experiments with triplicates ± standard deviation (S.D.). Different letters indicate significantly different values at a particular duration.

3.2 Enzymatic antioxidant response in *Vicia faba* roots

Antioxidant enzyme activities in response to lead (10 μ M) are shown in Fig. 1. After 1 and 4 h of lead exposure, SOD activity in the plant roots was more than 1.5-fold higher than in controls. Then it decreased to basal level. The kinetics of CAT activation were different. After lead exposure, CAT activity decreased significantly (more than 25 %) whatever the time of exposure. In the case of GPOX, its activity was firstly reduced (more than 68 %) at 1 h of lead exposure then elicited at 4 h, up to 130 % more than the control plants. After 8 h, GPOX activity decreased to the control level. Unlike GPOX, APX activity showed a rapid and significant activation (10 %) at 1 h of lead incubation. Then, APX activity decreased to basal levels. At 1 h of lead exposure, GR activity increased strongly, up to 560 %. Then, at 4 h, a huge decrease of GR activity was recorded, although it still remained 2.5 fold higher than in the controls. After 8 h of exposure it also decreased to basal level.

3.3 Effect of DPI on antioxidant response induced by lead

Modifications of lead-induced-antioxidant response by DPI are also reported in Fig. 1. At 1 h of lead exposure, DPI co-treatment completely inhibited lead-induced SOD activation. In these conditions, SOD activity was 33 % lower than the untreated plants. At 4 hours, in presence of DPI and lead, SOD activity increased, but this induction remained lower than in lead-treated plants. Then, at 8 hours of co-treatment SOD activity decreased to the control level. The NADPH-oxidase inhibitor had no significant effect on lead-induced modification of CAT activity, whatever the time of incubation. As previously observed for DPI alone, co-treatment with lead and DPI almost abolished GPOX activity. By contrast, lead-induced-APX activity was strongly increased in the presence of DPI whatever the exposure time. In the presence of DPI, lead-induced GR activation was drastically reduced (around 9-fold) at 1 h of co-treatment. At 4 h of co-treatment, DPI strongly stimulated lead-induced-GR activation to about 2 fold lower than that of lead treatment alone. Then, GR activity still increased up to 5 fold higher than in control and in lead-treated plants

3.4 ROS histochemical localisation

In vivo ROS productions were detected using histochemical localisation. Our results shown that $O_2^{\cdot -}$ and H_2O_2 were detected in root apoplasm after 1 h of lead exposure (Fig 2). After 4 and 8 h, ROS could not be observed (data not shown). However, in our conditions, the

exposure time to staining reagent was too short to detect ROS inside cells. Results obtained in DPI co-treated plants shown that DPI totally prevented ROS generation (Fig. 2).

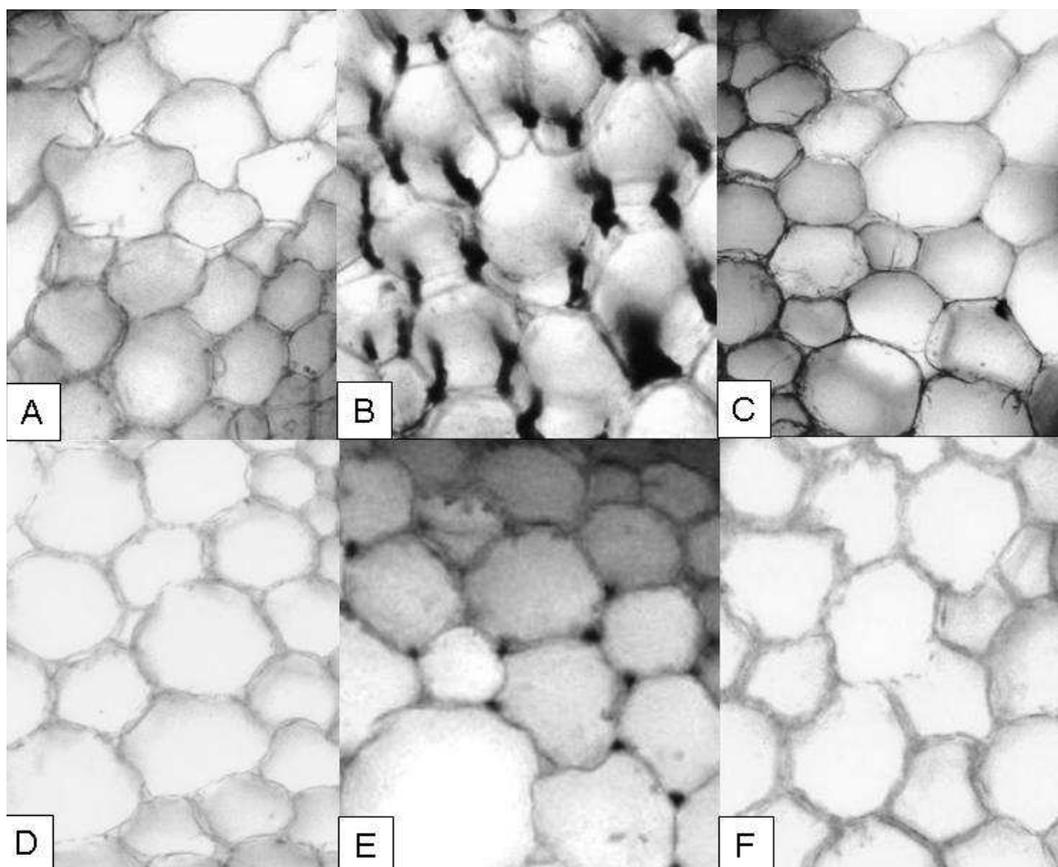


Figure 2: Histochemical assay for H_2O_2 (A, B and C) and $O_2^{\bullet-}$ (D, E and F) detection in *Vicia faba* roots.

A and D : control; B and E : *Vf* roots treated with 10 μ M Pb for 1 h ; C and F : *Vf* roots co-treated with lead and DPI.

3.5 Evaluation of lipid peroxidation

In order to estimate the lead-induced oxidative damage to membrane, lipid derivatives were evaluated by the FOX2 spectrophotometric method. Lead was found to increase strongly LHPO level (around 1.6-fold higher than in untreated plants) at 1 h (Fig 3). However, this increase was transient and LHPO returned to control levels at 4 h. Co-treatment with DPI totally prevented lead from generating LHPO. Lipid hydroperoxides remained at basal levels until 4 h. However, after 8 h DPI co-treatment decreased LHPO concentration under control level.

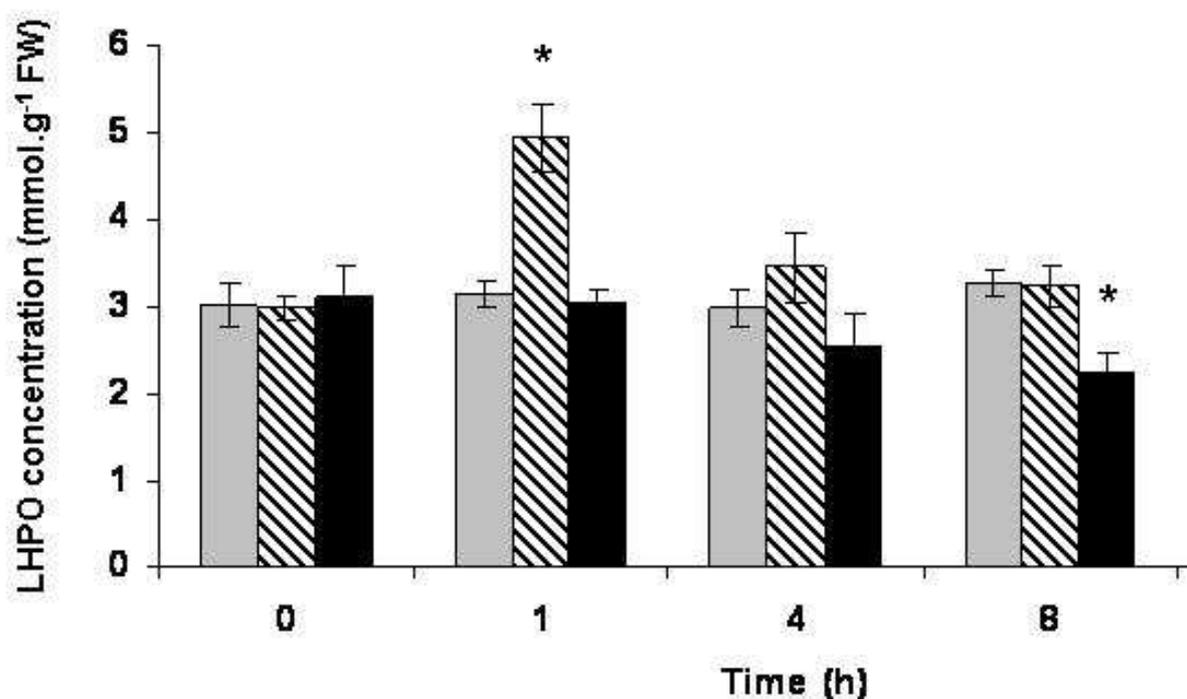


Figure 3: Influence of Pb, DPI and Pb+DPI treatments on the lipid peroxidation in *Vicia faba* roots was evaluated with FOX2 assay.

Grey bars : control; Drawing bars : Pb; Black bars : Pb + DPI. Results are the means of three independent experiments \pm SD (n=3). * Indicates values significantly different from controls ($p < 0.01$).

3.6 Estimation of thiol content

Induction of phytochelatin (PC) synthesis and evolution of GSH pool were monitored using HPLC. In the absence of lead no PC was detected in *Vf* whole plant roots (data not shown). In lead-treated roots, PC accumulation began very quickly (Fig. 4). Indeed, PC synthesis had already begun at 1 h (0.84 nmol equivalent GSH.g⁻¹ FW). After 1 h, PC synthesis carried on until 8 h in a nearly linear way (1.89 nmol equivalent GSH.g⁻¹ FW). In our conditions, only PC₂ were detected until 8 h of exposure. At 8 and 12 h of treatment, PC₃ and PC₅ were also detected. However, PC₂ represented 95 % of total PC (data not shown). Co-treatment with DPI did not modified the kinetics of lead-induced PCs synthesis (Fig. 4). Unlike PCs, values of GSH content did not show any significant change during any of the treatments (data not shown).

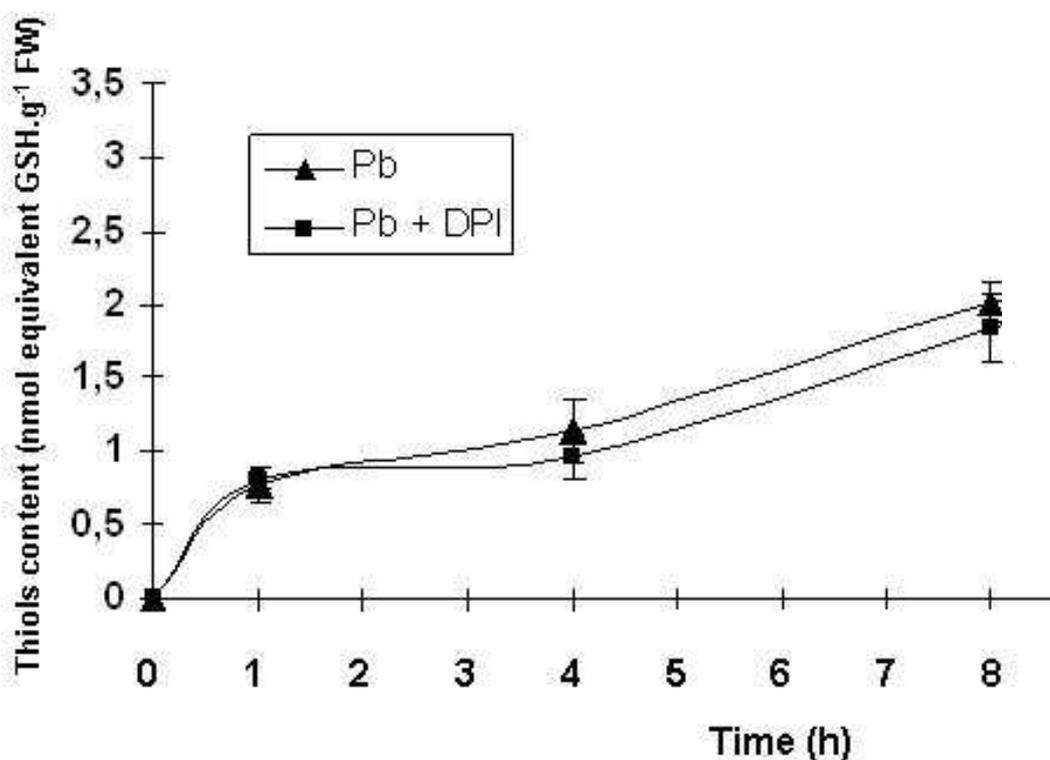


Figure 4: Effects of different treatments on phytochelatin content changes in *Vicia faba* roots was investigated by HPLC.

Vf whole plants were treated with 10 μM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (dark triangle). The potential role of NADPH-oxidase in lead-induced PCs synthesis was also investigated in *Vf* co-treated with lead (10 μM) and 1 μM DPI (dark square). Results are the means of three independent experiments \pm SE (n=3).

4 Discussion

In previous work, we demonstrated the efficiency of the NADPH-oxidase inhibitor DPI to significantly inhibit lead-induced ROS production in *Vicia faba* roots (Pourrut *et al.*, 2008). Based on this pharmacological tool, the aim of the present work was to investigate the potential role of NADPH-oxidase in early steps of lead-induced oxidative stress in whole plant roots.

Results presented in this work showed that lead uptake was high after 1 h of lead treatment (10 μ M) and increased slightly between 1 and 12 h of exposure (Table 1). Results obtained with DPI showed that this uptake was not affected by the use of this NADPH-oxidase inhibitor (Table 1). Previous results obtained with simultaneous applications of lead and Ca^{2+} or the calcium uptake blocker La^{3+} suggested that lead uptake by root cells may occur via calcium-permeable channels (Pourrut *et al.*, 2008). Even if some calcium channels are activated by ROS produced by NADPH-oxidase (Foreman *et al.*, 2003), our results demonstrated that lead entry into roots is independent of NADPH-oxidase.

Our results suggest that lead induced a strong oxidative burst in *Vicia faba* roots. Low concentration of lead modulated some of the key enzymes of the antioxidant defence system in *Vicia faba* whole plant roots (Fig 1). Cellular H_2O_2 level is determined by the rate of H_2O_2 production by SOD and catabolism via catalase, peroxidases and the ubiquitous ascorbate-glutathione cycle. This cycle involves ascorbate peroxidase, dehydroascorbate reductase and glutathione reductase. In addition, APX and GR are indispensable components of the ascorbate-glutathione pathway which is required to scavenge H_2O_2 and to maintain the redox state of the cell (Asada, 1992; Noctor, 2006). After one hour of treatment, lead activated SOD and the enzymes of Asada-Halliwell-Foyer pathway (GR and APX). These results suggest $\text{O}_2^{\cdot-}$ generation and H_2O_2 formation due to the SOD activation. This hypothesis is confirmed

by histochemical assays which revealed $O_2^{\cdot-}$ and H_2O_2 generations in root apoplast (Fig. 2). Our data also suggest that this ROS production affected cell components such as membrane phospholipids and induced a strong lipid peroxidation (Fig 3). All these results highlight the fact that Pb generated a strong oxidative stress in *Vicia faba* roots apoplast. Such a quick and strong apoplastic oxidative burst has already been reported by many authors working with cadmium or copper (Garnier *et al.*, 2006; Sgherri *et al.*, 2007). These authors observed that the oxidative burst was strongly associated with a NADPH-oxidase activation. Our results demonstrated that the NADPH-oxidase inhibitor, DPI, totally prevented ROS generation (Fig. 1 and 3) and lipid peroxidation (Fig. 2). This result is in agreement with our previous work which demonstrated the NADPH-oxidase dependent production of anion superoxide in *Vf* roots exposed to same concentration of lead (Pourrut *et al.*, 2008). All these data underline the implication of NADPH-oxidase in lead-induced oxidative burst in *Vicia faba* roots apoplast.

After 4 h of treatment, SOD, GPOX and GR activities were induced (Fig. 1). However, neither ROS in apoplast (Fig. 2) nor lipid peroxidation (Fig 3) were detected. Co-treatment with DPI was enabled to totally inhibit lead-induced SOD and GR activations. In these conditions, GPOX activity was also completely abolished and APX activity was strongly stimulated. However, GPOX inactivation could be associated with direct interaction between GPOX and DPI (Frahry and Schopfer, 1998). APX overactivation seems to balance DPI-induced GPOX inactivation as we as well observed in *Vf* plants treated with DPI alone (data not shown). Taken together, all these data support the hypothesis of an alternative source of ROS remote from the plasma membrane. Garnier *et al.* (2006) identified mitochondria as a source of ROS in cadmium-treated tobacco. These authors observed a first transient NADPH oxidase-dependent accumulation of ROS, followed by a second wave of $O_2^{\cdot-}$ production by mitochondria. Romanowska *et al.* (2002) also observed that at low concentrations, lead significantly stimulated mitochondrial respiration. Considering the fact that our histochemical

tool was incapable of detecting ROS inside cells, our results obtained with this approach do not undermine this hypothesis. Results obtained with lead-treated plant (Fig 1, 2 and 3) also demonstrated that the lead-induced oxidative burst was transient in *Vicia faba* roots and did not last until 8 h of treatment

Results of Fig. 1 also revealed that catalase was significantly inhibited whatever the treatment. CAT inactivation by lead was often reported in literature (Verma and Dubey, 2003; Chen *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2007a). Kono and Fridovich (1982) reported that catalase could be inhibited by $O_2^{\cdot -}$ flux. The possible inhibition of catalase by lead-induced- $O_2^{\cdot -}$ flux could in part be supported by the enhanced SOD activity which was 1.5 fold higher than in control plants at 1 and 4 h of lead treatment (Fig 1). However, in the presence of DPI, CAT activity was not significantly different from that of lead-treated plants. This suggested that (i) CAT inhibition observed in lead-treated roots was not a consequence of an interaction between ROS and this enzyme; (ii) lead-induced CAT inhibition could be due to a direct interaction between Pb and this enzyme. This hypothesis is supported by the Pb dose-dependent inhibition of CAT reported in several works. (Verma and Dubey, 2003; Chen *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2007a). Lead ions could substitute iron ions in the catalase porphyrin hemes.

The second conclusion of our work is that GSH and GR play a pivotal role in combating stress induced by low concentration of lead. GSH is involved in different detoxification pathways: (i) GSH is used in the Halliwell-Asada-Foyer cycle to regenerate ascorbate which is needed by APX to reduce H_2O_2 ; (ii) various free radicals and oxidants, and particularly H_2O_2 , are able to directly oxidise GSH to GSSG ; (iii) GSH is the precursor of phytochelatin (PCs) which are thought to play an important role in lead ion detoxification (Mehra *et al.*, 1995; Piechalak *et al.*, 2002). Piechalak *et al.* (2002) reported that in *Vicia faba* roots, after 2

h of treatment, lead induced a strong decrease in the GSH pool and also rapid generation of PCs. Our findings also showed rapid PC synthesis during the first hours (Fig. 4) but, in our conditions, the GSH pool remained constant (data not shown). This difference between our results and those of Piechalak *et al.* (2002), obtained on the same plant species, could be explained by the difference in stress intensity. Indeed, these authors used a 100-fold more concentrated solution of lead. It was also found that the GSH pool increased or remained constant in lead-treated spruce (Supalkova *et al.*, 2007) or coontail (Mishra *et al.*, 2006). Our data suggest a pivotal role of GR in combating Pb-induced oxidative stress and its involvement in regenerating GSH as previously observed by Verma and Dubey (2003) in lead-treated rice. Indeed, after 1 h of lead exposure, GR activation reached 560 % while the APX activity only increased by 10 %. This huge GR activation underlines the pivotal role of GSH in *Vf* roots in response to lead, as previously observed in *Arabidopsis* (Lee *et al.*, 2005). Results obtained in co-treated plants revealed a lag time in GR activation in comparison with the one observed in lead-treated plants (Fig. 1). However, GSH pool was not affected (data not shown) whereas GSH demand for APX activity (Fig. 1), PC synthesis (Fig 4) and for direct chelation of lead, was not reduced. The only difference between plants of the two treatment groups was the absence of the initial oxidative burst in DPI-treated plant. These results strongly support the GSH implication in direct detoxication of ROS or ROS-related products such as lipid peroxides.

5. Conclusion

In conclusion, our results show that, after short term exposure to Pb, NADPH-oxidase activation strongly modulated the antioxidant response and led to lipid peroxidation. These data indicate that the early steps of lead-induced oxidative stress in whole *Vicia faba* roots are strongly associated to NADPH-oxidase activation. Our study also underlines the importance of GSH and GR during lead exposure. Indeed, GR appeared to be the key enzyme in combating the negative effects of Pb. This enzyme maintains the GSH pool constant which is crucial for the antioxidative system and for the primary detoxification pathway involving synthesis of PCs. Although an NADPH oxidase-like enzyme plays a pivotal role in the early steps of lead-induced oxidative burst, our results also suggest that this enzyme could be not the only source of ROS after a few hours of exposure to lead.

References

- Aebi H (1984) Catalase *in vitro*. Methods Enzymol 105: 121-126
- Asada K (1992) Ascorbate peroxidase-a hydrogen peroxide scavenging enzymes in plants. Plant Physiol 85: 235-241
- Asada K (1994) Production and action of active oxygen species in photosynthetic tissues In: Foyer CH, Mullineaux PM (eds) Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defense Systems in Plants, CRC Press, Boca Raton FL, pp 77-104
- Barcelo AR (1998). "Hydrogen Peroxide Production is a General Property of the Lignifying Xylem from Vascular Plants." Ann Bot 82(1): 97-103.
- Béraud E, Cotelle S, Leroy P, Féraud JF (2007) Genotoxic effects and induction of phytochelatins in the presence of cadmium in *Vicia faba* roots. Mutat Res-Gen Tox En 633: 112-116
- Bligh EG, Dyer WJ (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. Can J Biochem Physiol 37: 911-917
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. Anal Biochem 72: 248-254
- Chen, J., Zhu, C., Li, L.-p., Sun, Z.-y., Pan, X.-b., 2007. Effects of exogenous salicylic acid on growth and H₂O₂-metabolizing enzymes in rice seedlings under lead stress. Journal of Environmental Sciences 19, 44-49.
- Dringen R, Gutterer JM (2002) Glutathione reductase from bovine brain. Methods in Enzymol 348: 281-288
- Foreman J, Demidchik V, Bothwell JH, Mylona P, Miedema H, Torres MA, Linstead P, Costa S, Brownlee C, Jones JD, Davies JM, Dolan L (2003) Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. Nature 422: 444-446

- Foyer CH, Noctor G (2005) Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant, Cell and Environ* 28: 1056-1071
- Frahry G, Schopfer P (1998) Inhibition of O₂-reducing activity of horseradish peroxidase by diphenyleneiodonium. *Phytochemistry* 48: 223-227
- Frahry G and P Schopfer (2001). "NADH-stimulated, cyanide-resistant superoxide production in maize coleoptiles analyzed with a tetrazolium-based assay." *Planta* 212(2): 175-183.
- Garnier L, Simon-Plas F, Thuleau P, Agnel JP, Blein JP, Ranjeva R, Montillet JL (2006) Cadmium affects tobacco cells by a series of three waves of reactive species that contribute to cytotoxicity. *Plant, Cell and Environ* 29: 1956-1969
- Gay C, Collins J, Gebicki JM (1999) Hydroperoxide assay with the ferric-xylenol orange complex. *Anal Biochem* 273: 149-155
- Giannopolitis CN, Ries SK (1977) Superoxide Dismutases I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiol* 59: 309-314
- Griffiths G, Jones HE, Eaton CL, Stobart AK (1997) Effect of *n*-6 polyunsaturated fatty acids on growth and lipid composition of neoplastic and non-neoplastic canine prostate epithelial cell cultures. *The Prostate* 31:29-36
- Griffiths G, Leverentz M, Silkowski H, Gill N, Sanchez-Serrano JJ (2000) Lipid hydroperoxide levels in plant tissues. *J Exp Bot* 51:1363-1370
- Ha SB, Smith AP, Howden R, Dietrich WM, Bugg S, O'Connell MJ, Goldsbrough PB, Cobbett CS (1999) Phytochelatase synthase genes from *Arabidopsis* and the yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Plant Cell* 11: 1153-1164
- Halliwell B, Gutteridge JMC (1989) *Free Radicals in Biology and Medicine*. Clarendon Press, Oxford pp 188-275

- Keppel G (1973) Design and analysis: a researcher's handbook. Englewood Cliffs, Prentice Hall NJ, pp 658-663
- Kono Y, Fridovich I (1982) Superoxide radical inhibits catalase. *J Biol Chem* 257: 5751-5754
- Lin CC, Kao CH (2000) Effect of NaCl stress on H₂O₂ metabolism in rice leaves. *Plant Growth Regul* 30: 151-155
- Lee M, Lee K, Lee J, Noh EW, Lee Y (2005) AtPDR12 contributes to lead resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 138: 827-836
- Maksymiec W (2007) Signaling responses in plants to heavy metal stress. *Acta Physiol Plant* 29: 177-187
- Maughan S, Foyer CH (2006) Engineering and genetic approaches to modulating the glutathione network in plants. *Physiol Plantarum* 126: 382-397
- Mehra RK, Kodati VR, Abdullah R (1995) Chain length-dependent Pb(II)-coordination in phytochelatins. *Biochem Biophys Res Commun* 215: 730-736
- Mishra S, Srivastava S, Tripathi RD, Kumar R, Seth CS, Gupta DK (2006) Lead detoxification by coontail (*Ceratophyllum demersum* L.) involves induction of phytochelatins and antioxidant system in response to its accumulation. *Chemosphere* 65: 1027-1039
- Nakano Y, Asada K (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol* 22: 867-880
- Noctor G (2006) Metabolic signalling in defence and stress: the central roles of soluble redox couples. *Plant Cell and Environ* 29: 409-425
- Noctor G, Foyer CH (1998) Ascorbate and glutathione. Keeping active oxygen under control. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 49: 249-279

- Nourooz-Zadeh J, Tajaddini-Sarmadi J, Birlouez-Aragon I, Wolff SP (1995) Measurement of hydroperoxides in edible oils using the ferrous oxidation in xylenol orange assay. *J Agri Food Chem* 43: 17-21
- Olmos E, Martínez-Solano JR, Piqueras A, Hellín E (2003) Early steps in the oxidative burst induced by cadmium in cultured tobacco cells (BY-2 line). *J Exp Bot* 54: 291-301
- Piechalak A, Tomaszewska B, Baralkiewicz D, Malecka A (2002) Accumulation and detoxification of lead ions in legumes. *Phytochem* 60: 153-162
- Pigeolet E, Corbisier P, Houbion A, Lambert D, Michiels C, Raes M, Zachary MD, Remacle J (1990) Glutathione peroxidase, superoxide dismutase and catalase inactivation by superoxides and oxygen derived free radicals. *Mech Ageing Dev* 51: 283-297
- Pourrut B, Perchet G, Silvestre J, Cecchi M, Guiresse M, Pinelli E (2007) Potential role of NADPH-oxidase in early steps of lead-induced oxidative burst in *Vicia faba* roots. *J Plant Physiol* doi:10.1016/j.jplph.2007.07.016
- Reddy AM, Kumar SG, Jyonthsnakumari G, Thimmanaik S, Sudhakar C (2005) Lead induced changes in antioxidant metabolism of horsegram (*Macrotyloma uniflorum* (Lam.) Verdc.) and bengalgram (*Cicer arietinum* L.). *Chemosphere* 60: 97-104
- Romanowska E, Igamberdiev AU, Parys E, Gardeström P (2002) Stimulation of respiration by Pb in detached leaves and mitochondria of C₃ and C₄ plants. *Physiol Plant* 116: 148-154
- Schützendübel A, Polle A (2002) Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *J Exp Bot* 53: 1351-1365
- Seregin IV, Ivanov VB (2001) Physiological aspects of cadmium and lead toxic effects on higher plants. *Russian J Plant Physiol* 48: 523-544

- Sgherri C, MF Quartacci and F Navari-Izzo (2007). "Early production of activated oxygen species in root apoplast of wheat following copper excess." *Journal of Plant Physiology* 164(9): 1152-1160.
- Sharma P, Dubey RS (2004) Ascorbate peroxidase from rice seedlings: properties of enzyme isoforms, effects of stresses and protective roles of osmolytes. *Plant Sci* 167: 541-550
- Sharma P, Dubey RS (2005) Lead toxicity in plants. *Braz J Plant Physiol* 17: 35-52
- Supalkova V, Huska D, Diopan V, Hanustiak P, Zitka O, Stejskal K, Baloun J, Pikula J, Havel L, Zehnalek J, Adam V, Trnkova L, Beklova M, Kizek R (2007) Electroanalysis of plant thiols. *Sensors* 7: 932-959
- Van Assche F, Clijsters HMM (1990) Effects of metals on enzymes activity in plants. *Plant Cell and Environ* 13: 195-206
- Verma S, Dubey RS (2003) Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. *Plant Sci* 164: 645-655
- Wang, C., Wang, X., Y Tian, Yu, H., Gu, X., Du, W., Zhou, H., 2007. Oxidative stress, defence response and early biomarkers for lead-contaminated soil in *Vicia faba* seedlings. *Environ Toxicol Chem*, 1.

Chapitre V :

Impact génotoxique

du plomb

Dommmages sur l'ADN induits par le plomb : implication des espèces réactives de l'oxygène

-Avant-propos-

La production d'ERO est considérée comme l'une des causes majeures de la toxicité des métaux lourds (Stohs and Bagchi, 1995). Leur réactivité, ou celle de leurs dérivés lipidiques, avec les molécules biologiques est en partie responsable de la génotoxicité des métaux (Kasprzak, 2002). Les études précédentes, réalisées au cours de ce travail de thèse, ont clairement mis en évidence l'induction d'un stress oxydatif induit par le plomb. Un travail précédemment mené au laboratoire avait révélé l'effet clastogène du plomb sur les racines de *Vicia faba* (Loudes, 2002).

Au cours de cette dernière étude, nous avons donc cherché à savoir si le stress oxydatif généré par le plomb pouvait induire une génotoxicité. Dans un premier temps, nous avons mesuré la génotoxicité du plomb sur les racines de fèves, en évaluant son pouvoir clastogène par le test des micronoyaux, et son potentiel à générer des cassures sur les brins d'ADN par le Comet assay. Dans un second temps, en pré-incubant les racines avec de la vitamine E, un puissant antioxydant, nous avons cherché à évaluer l'implication des ERO dans la génotoxicité induite par le plomb.

Nos travaux précédents ont également mis en lumière l'implication de la NOX dans la toxicité du plomb. Son rôle dans la génotoxicité de ce métal a également été évalué en pré-incubant les racines de fèves avec du DPI. Les expérimentations ne sont pas encore achevées, et les résultats préliminaires seront exposés au cours de la discussion.

-Publication-

Pourrut B., J. Silvestre and E Pinelli. En préparation. Lead induced DNA damage in <i>Vicia faba</i> roots: potential involvement of reactive oxygen species
--

Lead induced DNA damage in *Vicia faba* roots: potential involvement of reactive oxygen species

Bertrand Pourrut, Jérôme Silvestre and Eric Pinelli*

Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Toulouse, EcoLab, UMR 5245 CNRS-UPS-INPT, Avenue de l'Agrobiopole – BP 32607, Auzeville Tolosane, 31326 Castanet-Tolosan, France

* Corresponding author: Tel.: +33 5 62 19 39 45; fax: +33 5 62 19 39 01.

E-mail address: pinelli@ensat.fr.

Abstract

Lead genotoxic activity was investigated in *Vicia faba* whole plant roots grown hydroponically under controlled conditions. For this purpose, lead genotoxicity was studied in presence or absence of vitamin E. Lead-induced DNA damages in *Vicia faba* roots were evaluated by comet assay, which allowed the detection of DNA strand break and *Vicia faba* micronucleus test, which revealed chromosome aberrations. Direct interaction of lead with DNA strand was also evaluated in acellular comet assay. The results clearly indicate that lead induced DNA fragmentation in a dose-dependant manner with a maximum effect with 10 μ M. In addition, at this concentration, DNA damages time-dependently increased until 12 hours. Then, a decreased in DNA damages was recorded. This suggests the activation of different system in DNA repair and plant cells detoxification. The study of direct interaction between DNA and lead reveals that DNA breakages were not associated to the direct effect of lead on DNA. The significant induction of micronucleus also reinforced the genotoxic character of this metal. The total inhibition of the genotoxic effect of lead after pre-incubation of whole plant roots with 10 μ M vitamin E reveals the major role of ROS in lead genotoxicity. These results highlight, for the first time, *in vivo* and in whole plants, the relationship between ROS, DNA damages and chromosomic aberrations induced by lead.

Key words: Comet assay, genotoxicity, micronucleus test, Pb, reactive oxygen species, vitamin E.

Abbreviations: DS break: double strand break; MDA, malondialdehyde; MN, micronucleus test; ROS, reactive oxygen species; SS break, single strand break; *Vf*, *Vicia faba*.

1 Introduction

Lead (Pb) is one of the most useful metals, it is also one of the most toxic (Shotyk and Le Roux, 2005). The heavy use of lead has caused global contaminations of air, water and soil. Multiple researches found that lead can cause neurological, haematological, gastrointestinal, reproductive, circulatory, and immunological pathologies (Patrick, 2006). Moreover, the International Agency for Research on Cancer listed inorganic lead compounds as 2B chemicals (IARC, 1987; Pulido and Parrish, 2003). In plant, lead has been described to influence various morphological, physiological and biochemical process. Pb is known to strongly inhibit plant growth, root elongation, seed germination, seedling development, transpiration, chlorophyll production, lamellar organisation in chloroplast and cell division (Wierzbicka, 1995; Patra *et al.*, 2004). However, only limited data are available on lead influence on plant genetic material. It has been observed that Pb induced chromosomal aberrations, micronucleus induction, somatic point mutations, homologous recombination and single strands break (Rucinska *et al.*, 2004). In *Vicia faba* roots, lead shortened mitotic stage and prolonged the interphase, thus prolonging the cell cycle (Patra *et al.*, 2004). At low concentrations (below 10 μM) lead increased the mitotic index but decreased it at higher concentrations. Pb also dose dependently increased the frequency of micronucleus (Patra *et al.*, 2004).

Lead genotoxicity mechanisms are complex and are not yet well understood. *In vitro* studies demonstrated that lead interacts with protein and nucleic acids, particularly at the sulfhydryl group and the phosphate backbone (Gerber *et al.*, 1980; Tajmir-Riahi *et al.*, 1993). Lead decreases the fidelity of DNA polymerases and perturbs DNA and RNA synthases. Pb may also acts as co-carcinogen because it synergistically potentiates UV light and alkylating carcinogens genotoxicity (Hartwig, 1994). In addition, ascorbic acid can reduce sister-chromatid exchanges caused by lead, implying that free radicals may play a role in lead genotoxicity (Dhir *et al.*, 1993). Using a plasmid relaxation assay, Yang *et al.* (1999) demonstrated that high concentrations of lead promote DNA strand breakage and 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) adducts in DNA through a Fenton-like reaction.

In previous work, we demonstrated that early step in lead-induced oxidative burst in *Vicia faba* roots was strongly associated with the NADPH-oxidase activation and O_2^- production (Pourrut *et al.*, 2008). In mammal cells, it is assumed that lead induces DNA damages through excessive productions of reactive oxygen species (ROS) and aldehydes,

such as malondialdehyde (MDA) (Xu *et al.*, 2008). However, in plants, DNA damages induction mediated by lead remains unclear. The aim of this work was to investigate the role of ROS in lead-induced genotoxicity. For this purpose, DNA damages were studied in lead-treated plants, in presence or absence of vitamin E, a powerful scavenger of ROS and soluble lipid by products of oxidative stress (see for review Wang and Quinn, 2000). Pb-induced DNA alterations in *Vicia faba* root cells were evaluated using (i) comet assay, which allowed the detection of DNA strand break and (ii) *Vicia faba* micronucleus test (MN), which revealed chromosome aberrations. Direct interactions between lead and DNA were also evaluated by acellular comet assay.

2 Materials and Methods

2.1 Plant material

The *Vicia faba* cultivar "aquadulce" (Tezier, France) were used for this study. Dry seeds of *Vicia faba* were soaked for 24 h in deionised water, the seed coats were removed and the seedlings were allowed to germinate between two layers of moist cotton. After 3 days, the primary roots at about 2-3 cm in length were immersed in aerated Hoagland's solution and their tips cut off in order to let the secondary roots grow. Four days were necessary to obtain secondary roots of suitable length (1-2 cm) for the different tests.

2.2 Cellular comet assay

Comet assay were performed according to Gichner *et al.* (2004) with some modifications. *Vicia faba* roots were treated, at 20 °C, in darkness, with different Pb(NO₃)₂ concentrations (1, 5, 10, and 20 µM) for 8 h, or 10 µM for 1, 4, 8, 12, 16 and 20 h. Negative control were put in Hoagland's solution without lead for the same exposure durations while positive control were incubated with 35 µM H₂O₂ for 1 h. Maleic hydrazine cannot be used as positive control in Comet assay (Gichner, 2003). In order to evaluate the implication of ROS in lead-induced genotoxicity, some plants were incubated with α-tocopherol (10 µM) alone during 7 h or 1 h before 10 µM lead exposition (during 6 h).

After seedling treatment, excised roots were rinsed in water and placed in a 60-mm petri dish kept on ice and spread with 1.5 mL of cold PBS buffer (NaCl 130 mmol.L⁻¹, Na₂HPO₄ 7 mmol.L⁻¹, NaH₂PO₄ 3 mmol.L⁻¹, EDTA 50 mmol.L⁻¹, pH 7). Using a fresh razor blade, the

roots were gently sliced. The plate was kept tilted in the ice so that the isolated root nuclei would collect in the buffer. The suspension with released nuclei was cleaned of debris by filtering through a 20 μm nylon cloth. All operations were conducted under inactinic red light to avoid light-induced damage.

Regular microscope slides were dipped into a solution of 1 % normal melting point (NMP) agarose prepared with PBS at 50 °C, dried overnight at room temperature and kept dry in slide boxes until use. Onto each slide, a nuclear suspension (50 μL) and 1 % low melting point (LMP) agarose (50 μL) prepared with PBS were added at 37 °C. The nuclei and the LMP agarose were gently mixed and 80 μL aliquots placed on a microscope slide with a coverslip. The slide was placed on ice for a minimum of 5 min. Next, the slides were rinsed with 400 mM Tris buffer and were placed in an horizontal gel electrophoresis tank containing freshly prepared cold electrophoresis buffer (1 mM Na_2EDTA and 300 mM NaOH , pH >13). The nuclei were incubated for 15 min to allow the DNA to unwind prior to electrophoresis at $0.72 \text{ V}\cdot\text{cm}^{-1}$ (26 V, 300 mA) for 15 min at 4 °C. After electrophoresis, the slides were rinsed 3 times with 400 mM Tris, pH 7.5, stained with 70 μL ethidium bromide ($20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) for 5 min, dipped in ice cold water to remove the excess ethidium bromide and covered with a coverslip. For each slide, 50 randomly chosen nuclei were analyzed using an Olympus fluorescence microscope with an excitation filter of 510–560 nm and a barrier of 590 nm.

A computerized image analysis system (Komet version 5.1, Andor Technology) was employed. The DNA per cent in tail was used as the primary measure of DNA damage according to Hartmann *et al.* (2003). Three slides were evaluated per treatment and each treatment was repeated at least three times. From the repeated experiments, the averaged median DNA per cent value was calculated for each treatment group from the DNA per cent value of each slide (Lovell *et al.*, 1999).

2.3 Acellular comet assay

Several solutions were tested to perform acellular comet with $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$. The problem was to avoid lead precipitation while avoiding DNA degradation. SCGE slides with nuclei from untreated root cells were prepared as outlined above and the slides were immersed in solutions of 1 M NaCl -10 mM Trizma containing 10 μM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ for 1 h at 4 °C. Negative control slides were immersed in the same solution without lead while positive control were incubated in the same solution with 8 μM H_2O_2 . After the treatment period, the slides were

rinsed three times for 5 min by immersion in cold 400 mM Tris buffer, then electrophoresed and analyzed as described earlier.

2.3 Lead content Analysis

Lead content analysis was realized as previously described (Pourrut *et al.*, 2008). *Vicia faba* plants roots were exposed to 10 μ M of lead nitrate in Hoagland solution during different time (0, 4, 8, 12 and 24 h). Roots were collected and rapidly washed in distilled water. Lead bound to the rhizoderm was removed as follows: fragments were shaken with 40 mL of 0.001M HCl during 3 min, and then 360 mL of 1M HCl were added to yield a final concentration of 0.01M HCl. After shaking for another 5 min, roots were washed in distilled water, oven-dried at 80 °C for 48 h, and then dry weight. Roots were mineralized in a 1:1 mixture of 65 % HNO₃ and 30 % H₂O₂ at 80 °C over 6 h. After filtration, lead concentrations were determined with an IRIS Intrepid II XDL ICP-OES. The accuracy of the analytical procedure was verified using a reference material: Virginia tobacco leaves (CTA-VTL-2, polish certified reference material; ICHTJ).

2.4 Micronucleus test

The *Vicia test* was carried out according to Ma *et al.*, (1995). Exposure time was 30 hours for the negative control, and 6 hours for Pb(NO₃)₂-treated groups, followed by a 24 hours recovery period. The tested concentration of Pb(NO₃)₂ were 1, 5 and 10 μ M. To evaluate the potential role of oxidative burst in lead-induced MN, *Vicia faba* roots were treated with 10 μ M α -tocopherol, 1 hour before lead treatment. The direct effect of α -tocopherol was evaluated by exposure of *Vicia faba* roots to 10 μ M α -tocopherol during 7 hours, followed by a 24 hours recovery period. For each experiment, five seeds were used per treatment. Maleic hydrazide (40 μ M) was used as positive control. Aerated Hoagland's solution was used as negative control. After treatment, root tips were fixed in Carnoy's solution (glacial acetic acid/ethanol 1:3) at 4 °C for one night. They were transferred into 70 % ethanol for storage. They were then hydrolyzed in 1 N HCl at 60 °C for 5-7 min. Five slides were prepared for each of the five seeds. After staining the root tips with 1 % aceto-orcein, the interphase cells (as defined by Ma *et al.*, 1995) were scored for micronuclei frequencies under a 1000 X magnification. Five thousand cells per tip were counted. In order

to avoid underestimation of micronuclei frequency due to impaired cell proliferation rate, the MN test was performed only on root tips with a mitotic index superior to 2 %.

2.5 Statistical analysis

A statistical analysis was performed on the collected data. One ANOVA Way test was conducted to obtain F values and MS errors. Tukey's test (Keppel, 1973) was used to determine the level of significance against the negative and the positive control values in each experimental series.

3 Result and Discussion

The comet assay in alkaline conditions reliably detects single strand (SS) and double strand (DS) DNA breaks levels, even at very low damage levels. SS and DS DNA breaks result from numerous reaction types: base and nucleotide excision repair, direct scission of the DNA backbone by chemical or radical attack, scission following the binding of intercalating agent, endonuclease or topoisomerase action, alkali labile DNA adduct and alkaline labile sites (Horvathova *et al.*, 1998; Gichner *et al.*, 2008). Figure 1 illustrated the DNA-damaging effect of lead applied for 8 hours on roots of *Vicia faba*. The data of the cellular comet assay with increasing concentrations of lead (1-20 μM) clearly demonstrated a significant augmentation in the averaged of DNA per cent in tail, from 23 ± 1.2 % (negative control) to 64 ± 2.1 % after a 20 μM lead treatment ($P < 0.01$). These results indicate that the DNA amount liberated from the nuclei of *Vicia faba* roots is correlated with the external lead concentration, as previously described by Rucinska *et al.* (2004) in Lupin root tips. These data also reported that the maximum effect was observed at 10 μM of lead.

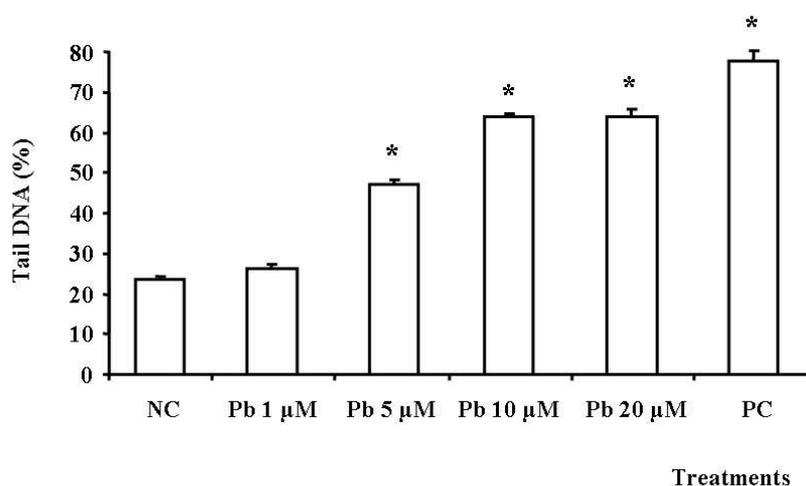


Figure 1: Lead dose effect on DNA strand breakage assessed by comet assay in whole *Vicia faba* roots.

The negative control (NC) was realized by roots incubation in Hoagland's solution without lead for the same exposure durations (8 h). The positive control (PC) was realized by roots incubation with 35 μM H_2O_2 in Hoagland's solution during 1 h. Each treatment was repeated at least three times. Each value represents mean \pm SE of three separate experiments. * Values significantly different from the control ($P < 0.01$).

The figure 2 illustrates the DNA damages induced by 10 μM of lead nitrate in function of time. The results show that, after 4 hours of exposition, DNA strand breaks increased of about 14 % in comparison with the control. At 4 hours of lead incubation, a strong and

significant increased in DNA strand breaks was recorded, with a maximum effect at 12 hours (72 % \pm 1.7 of tail DNA). After this time, DNA strand damages decreased constantly until 20 hours.

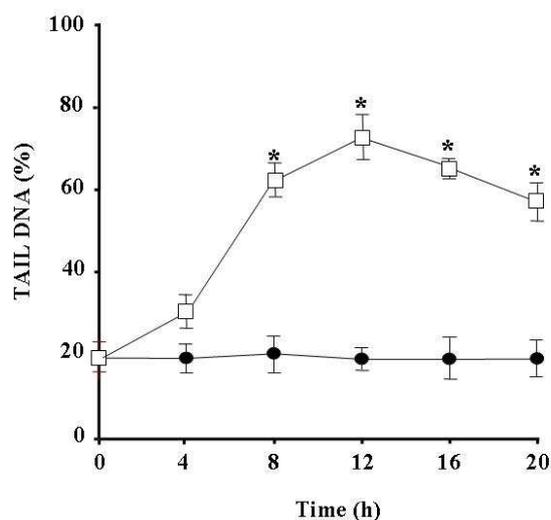


Figure 2: Time dependent DNA strand breakage induced by lead nitrate in whole plant roots.

Vicia faba roots were incubated with (□) or without (●) 10 μ M lead nitrate in Hoagland's solution. Each value represents mean \pm SE of three separate experiments. * Values significantly different from the control (P<0.01).

Lead (10 μ M) kinetic accumulation in *Vicia faba* roots is shown in figure 3. Data reveal that lead entry into the roots was very fast (11.25 μ g.g⁻¹ DW.h⁻¹) between 0 and 4 hours, and reached 46.5 \pm 6.5 μ g.g⁻¹ DW. Then, lead rate uptake decreased (2.53 μ g.g⁻¹ DW.h⁻¹) and became constant; the maximum lead content was reached at 24 hours (97.2 \pm 6.9 μ g.g⁻¹ DW). This rate uptake is in agreements with findings from Nedelkoska and Doran (2000) in several plants treated by Cd, Ni or Cu. Accumulation of lead in plant roots has been reported by many authors (see for review Patra *et al.*, 2004). These results illustrated the fast uptake and accumulation of lead into *Vicia faba* roots during the first hours of exposition. In plant system, *in vivo*, salt solubility in solution is of primary importance. The dissociation degree and the cation availability quantitatively affect the aberration number. It has been reported that lead effect are directly related to exposure dosage and duration (Steinkellner *et al.*, 1998; Rucinska *et al.*, 2004). However, while lead stilled uptake after 12 hours of culture, a decrease in DNA damages was observed. If this result seems directly correlated to DNA repair systems induction, it could also be associated to a rapid and efficient system of lead detoxification in plant symplasme (Wierzbicka, 1998). This system includes chelation by organic or amino

acids (Wierzbicka *et al.*, 2007) or by phytochelatins (Piechalak *et al.*, 2002) and sequestration in vacuole (Piechalak *et al.*, 2003), or plasmatabule (Wierzbicka, 1998). Although, Wierzbicka (1998) and Piechalak (2002, 2003) showed that Pb detoxification was quickly activated; our results indicate that these detoxification and repair systems became only efficient after 12 hours of lead exposition.

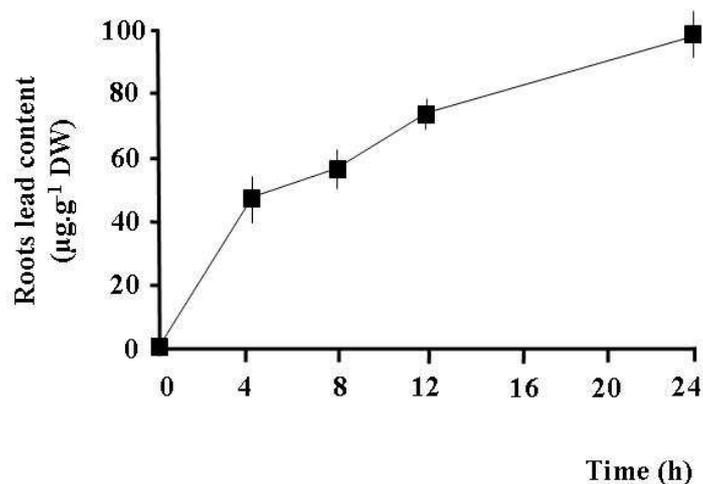


Figure 3: Lead kinetic uptake into roots exposed to 10 µM of lead nitrate in Hoagland's solution.

Lead concentrations into the roots were evaluated by ICP-OES. Each point represent means of lead concentration \pm SE of five experiments.

Isolated nuclei embedded in agarose on slides are more sensitive to stress than nuclei into a cell protected by they cell wall. Therefore treatment longer than 2 hours cannot be applied in the acellular comet assay as even control nuclei are severely damaged, resulting in a strong increase in DNA per cent in tail (Gichner *et al.*, 2004). Results obtained with acellular comet assay reveal that 10 µM of lead did not directly induced DNA damages after 1 hour of incubation (28.05 % \pm 1.72 of tail DNA for the control vs 30.28 % \pm 1.47 for lead). These results confirm those of Valverde *et al.* (2001) that did not found DNA damage due to direct DNA-lead interaction in different mouse cell types. These data also confirm Hartwig hypothesis (1998). This author proposed that direct genotoxic effect of metal are rather weak and/or restricted to high concentrations (more than 1 mM). These results suggest that lead genotoxicity was mediated by another indirect pathway. In view of the lead-induced ROS production in plant roots (Przymusiński *et al.*, 2007; Pourrut *et al.*, 2008) and according to

Rucinska *et al.* (2004), the induction of an indirect mechanism, such as oxidative stress is suggested.

It appears that many of lead genotoxic effect in mammal cells are mediated by ROS and/or the lipids soluble byproducts of oxidative stress such as MDA. To identify the potential role of ROS in DNA alterations, *Vicia faba* plant roots were incubated with 10 μM of α -tocopherol (vitamin E), 1 hour before lead exposure. Figure 4 results clearly indicate the implication of ROS in lead-induced DNA strand breaks. Vitamin E completely abolished the increased of DNA per cent in tail after lead treatment. Vitamin E is a fat-soluble vitamin that protects cells against ROS (Sattler *et al.*, 2004). Recently, Collin *et al.* (2008) demonstrated that Vitamin E is essential for *Arabidopsis thaliana* tolerance to metal-induced oxidative stress. Our data clearly illustrate a relationship between ROS and lead-induced DNA strand damages. In acellular system, it has been demonstrated that singlet oxygen is the major species participating in the induction of DNA strand breakage and 8-hydroxydeoxyguanosine adduct induced by lead (Yang *et al.*, 1999). In addition, $\cdot\text{OH}$ is considered to be the ultimate reactive oxygen species which interacts with DNA and promotes genetic damage (Halliwell and Gutteridge, 1986). The $\cdot\text{OH}$ radical attacks DNA on the sugar residue and induces DNA fragmentations, base loss and strand breaks with a terminal sugar residue fragment (Rhaese *et al.*, 1968). It also produces thymine glycol, 7,8-dihydro-8-oxoguanine or 2, 6-diamino-4-hydroxy-5-formamido-pyrimidine. If our results allow to suggest ROS implication in lead-induced genotoxicity, it is impossible to discriminate the precise nature of the radical ($^1\text{O}_2$, $\cdot\text{OH}$) which directly or indirectly interacts with DNA.

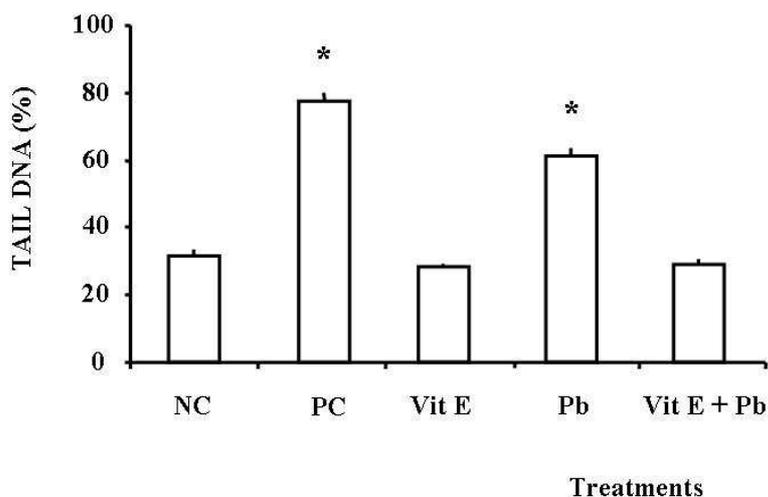


Figure 4: Effect of the ROS scavenger vitamin E on DNA strand breakages induced by lead nitrate in *Vicia faba* whole plant roots.

Vicia faba plant roots were incubated with 10 μM vitamin E in the culture medium, 1 hour before lead nitrate (10 μM) addition. NC: negative control, PC: positive control. Each value represents mean \pm SE of three separate experiments. * Values significantly different from lead treated roots ($P < 0.01$).

Chromosomal aberration analyzed by the micronucleus (MN) test (figure 5) indicated that lead dose-dependently induced MN formation in *Vicia faba* root tips. The maximum effect was observed at 10 μM ($8.2 \pm 0.3 \text{‰}$). This MN value was slightly superior to the positive control HM ($6.45 \pm 0.21 \text{‰}$). These data also illustrate lead genotoxic potential and confirm the results of Steinkellner *et al.*, (1998). In a previous study, these authors found a ranking order in metal genotoxicity: $\text{As}^{3+} > \text{Pb}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Zn}^{2+}$. The *Vicia faba* MN test is a very sensitive and useful method that can allow the detection of both clastogenic and aneugenic effects (Al Sabti and Metcalfe, 1995; El Hajouji *et al.*, 2007). Micronuclei are the results of chromosome breaks (or mitotic anomalies) that require a passage through mitosis to be recognisable. The molecular mechanism of MN induction is not yet clearly understood. In our experimental condition, the same kind of dose-dependent response observed between the two tests (comet assay and MN test) suggests a closed link between lead-induced DNA damages and MN formation.

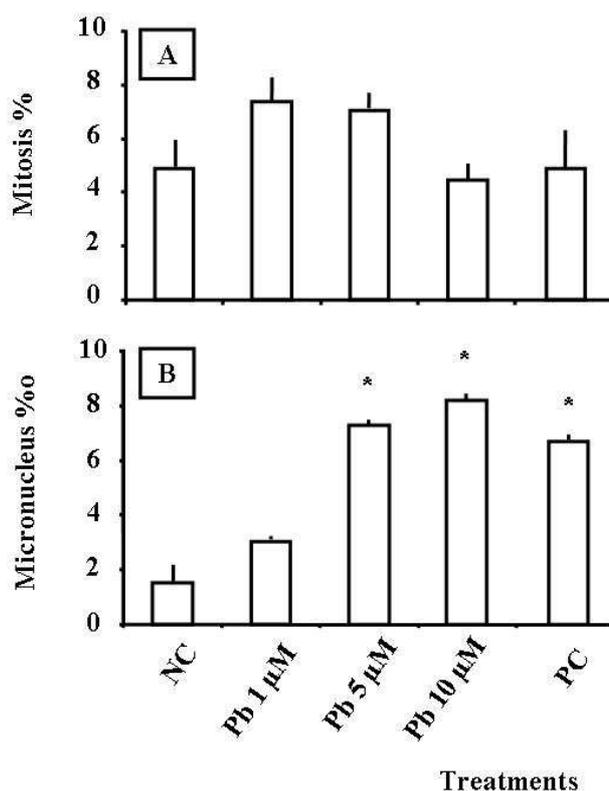


Figure 5: Mitotic index (A) and micronucleus frequency (B) values in *Vicia faba* roots exposed to different lead concentrations (1, 5 and 10 μ M).

NC: negative control, PC: positive control. Each value represents mean \pm SE of five seeds in two separate experiments. *Values significantly different from the control ($P < 0.01$).

Because lead can promote oxidative stress and DNA strand breaks, the MN test was also conducted in presence of Vitamin E. Figure 6 results show that Vitamin E alone significantly decreased MN number (0.5 ± 0.1) in comparison with the control (1.95 ± 0.2). In addition, vitamin E completely inhibited the effect of 10 μ M of lead on MN induction (0.9 ± 0.2). These data strongly support oxidative stress implication in lead-induced MN on *Vicia faba* root tips. According to figure 2 and 6, lead genotoxicity was quick. Six hours of exposure was sufficient to increase both DNA fragmentation (48 % in tail DNA) and micronucleus formation. These results underline DNA fragmentation implication in MN formation induced by lead. Overall, these data highlight, for the first time in plant roots a possible relationship between lead, oxidative stress, DNA fragmentation and micronucleus formation. However, we cannot rule out that lead genotoxicity is almost exclusively mediated by ROS. Lipids oxidation products quenched by vitamin E (Sattler et al., 2004) could be also associated to DNA adduct formation and breakages. Indeed, in our conditions, vitamin E also prevented lipid peroxidation in *Vicia faba* root cells (data not shown).

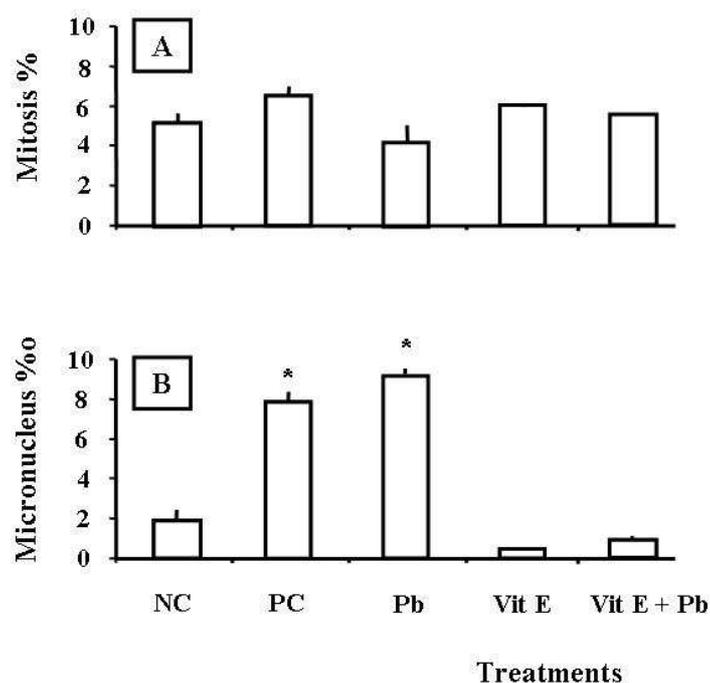


Figure 6: Mitotic index (A) and micronucleus frequency (B) values in *Vicia faba*-root exposed to lead nitrate (10 μ M) in presence or absence of vitamin E (10 μ M).

NC: negative control, PC: positive control. Each value represents mean \pm SE of five seeds in two separate experiments. * Values significantly different from the control ($P < 0.01$).

4 Conclusion

In conclusion, these data strongly suggest that, in whole plant roots, lead genotoxicity could be mediated by ROS production. The use of vitamin E helps to establish a link between ROS production, DNA fragmentation and micronucleus formation. Lead direct effect on DNA damages is not supporting by this work. Although metallic salts are effective mitotic poisons due to their affinity for thiol groups, the total inhibition of lead-induced MN formation in presence of vitamin E confirms the ROS pathway in MN induction. However, the direct ROS participation in DNA-damaging in *Vicia faba* roots requires further experimental confirmation, in particular the detection of DNA-oxidized purines and pyridines.

Bibliography

- Al Sabti, K. and Metcalfe, C.D. (1995) Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water, *Mutat. Res.* 343, 121-135.
- Collin, V. C Eymery, F., Genty, B., Rey, P. Havaux, M. (2008). Vitamin E is essential for the tolerance of *Arabidopsis thaliana* to metal-induced oxidative stress. *Plant Cell and Environ.* 31, 244-257
- Dhir, H., Roy, A. K. and Sharma, A. (1993). Relative efficiency of *Phyllanthus emblica* fruit extract and ascorbic acid in modifying lead and aluminium-induced sister chromatid exchanges in mouse bone marrow. *Environ. Mol. Mutagen.* 21, 229-236.
- El Hajjouji, H., Pinelli, E., Guiresse, M., Merlina, G., Revel, J. C. And Hafidi, M. (2007) Assessment of the genotoxicity of olive mill waste water (OMWW) with the *Vicia faba* micronucleus test. *Mutat. Res. /Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 634, 25-31.
- Gerbert, G. B., Léonard, A. and Jacquet, P. (1980) Toxicity, mutagenicity and teratogenicity of lead. *Mut. Res.* 76, 115-141.
- Gichner, T. Patkova, Z., Szakova, J. and Demnerova, K. (2004). Cadmium induces DNA damage in tobacco roots, but no DNA damage, somatic mutations or homologous recombination in tobacco leaves. *Mut. Res. /Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis.* 559 (1-2), 49-57.
- Gichner, T. Patkova, Z., Szakova, J. and Demnerova, K. (2006). Toxicity and DNA damage in tobacco and potato plants growing on soil polluted with heavy metals. *Ecotox. Environ. Safety.* 65 (3), 420-426.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C. (1986). Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Arch. Biochem. Biophys.* 246, 2859-2865.
- Hartmann, A., Agurell, E., Beevers, C., Brendler-Schwaab, S., Burlinson, B., Clay, P., A Collins, A., A Smith, A., Speit, G., Thybaud, V. and Tice, RR. (2003). Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. *Mutagenesis* 18 (1), 45-51.
- Hartwig, A., Schlegel, R. and Beyersmann, D. (1990) indirect mechanism of lead-induced genotoxicity in cultured mammalian cells. *Mut. Res.* 241, 75-82.

- Hartwig, A. (1998) Carcinogenicity of metal compounds: possible role of DNA repair inhibition. *Toxicol. Lett.* 102, 235-239.
- Horvathova, E., Slamenova, D., Hlincikova, L., Mandal, T. K., Gabelova, A. And Collins, A. R. The nature and origin of single-strand breaks determined with the comet assay. (1998). *Mut. Res.* 409, 163-171.
- IARC, 1987. Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk to Human-Genetic and Related Effects: An Updating of Selected IARC Monographs, vol. 1–42. (Suppl. 6).
- Keppel, G. (1973). Design and analysis: a researcher's hand book, Prentice Hall, Englewood Cliffs, NJ, 658 pp.
- Lovell, D., Thomas, G. and Dubow R. (1999). Issues related to the experimental design and subsequent statistical analysis of in vivo and in vitro comet studies. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis* 19(2), 109-119.
- Ma, T. H., Xu, Z., Xu, C., McConnell, H., Rabago, E.V., Arreola, G.A. and Zhang, H. (1995). The improved Allium/Vicia root tip assay for clastogenicity of environmental pollutants, *Mutat. Res.* 334 (1995) 185–195.
- Nedelkoska, T.V., Doran, P.M. (2000). Characteristics of heavy metal uptake by plant species with potential for phytoremediation and phytomining. *Minerals Engineering* 13, 549-561.
- Patra, M., Bhowmikb, N., Bandopadhyay, B. and Archana Sharma. (2004) Comparison of mercury, lead and arsenic with respect to genotoxic effects on plant systems and the development of genetic tolerance. *Env. Exp. Bot.* 52, 199-223.
- Patrick, L., (2006). Lead toxicity part II: the role of free radical damage and the use of antioxidants in the pathology and treatment of lead toxicity. *Altern. Med. Rev.* 11, 114–127.
- Piechalak, A., Tomaszewska, B., Baralkiewicz, D. (2003). Enhancing phytoremediative ability of *Pisum sativum* by EDTA application. *Phytochemistry* 64, 1239-1251.
- Piechalak, A., Tomaszewska, B., Baralkiewicz, D., Malecka, A. (2002). Accumulation and detoxification of lead ions in legumes. *Phytochemistry* 60, 153-162.
- Pourrut, B., G. Perchet, J. Silvestre, M. Cecchi, M. Guiresse and E. Pinelli (2008). "Potential role of NADPH-oxidase in early steps of lead-induced oxidative burst in *Vicia faba* roots." *Journal of Plant Physiology* 165(6): 571-579
- Przymusiński, R., R. Rucińska-Sobkowiak, B. Ilska and E. Gwóźdź (2007). "Organospecific responses of lupin seedlings to lead Localization of hydrogen peroxide and peroxidase activity." *Acta Physiologiae Plantarum* 29(5), 411-416

- Pulido, M.D. and Parrish, A. R. (2003). Metal-induced apoptosis: mechanisms. *Mutat. Res.* 533, 227–241.
- Rhaese, H. J. and Freese, E. (1968). Chemical analysis of DNA alterations: I. Base liberation and backbone breakage of DNA and oligodeoxyadenylic acid induced by hydrogen peroxide and hydroxylamine. *Biochem. Biophys. Acta.* 155, 476-490.
- Rucinska, R., Sobkowiak, R. and Gwozdz, E. A. (2004). Genotoxicity of lead in lupin root cells as evaluated by the comet assay. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 9 (3), 519-528.
- Sattler, S. E., Gilliland, L. U., Magallanes-Lundback, M., Pollar, M. And DellaPenna D. (2004). Vitamin E is essential for seed longevity and preventing lipid peroxidation during germination. *Plant Cell.* 16, 1419-1432.
- Shotyk, W., Le Roux, G., (2005). Biogeochemistry and cycling of lead. *Met. Ions Biol. Syst.* 43, 239–275.
- Steinkellner, H., Mun-Sik, K., Helma, C., Ecker, S., Ma, T., Horak, O., Kundi, M. and Knasmüller, S. (1998). Genotoxic effects of heavy metals: comparative investigation with plant bioassays. *Environ. Mol. Mutagen.* 31, 183-191.
- Tajmir-Riahi, H. A., Naoui, M. and Ahmad, R. (1993). The effects of Cu and Pb on the solution structure of calf thymus DNA: DNA condensation and denaturation studied by Fourier transform IR difference spectroscopy. *Biopolymer.* 33, 1819-1827.
- Valverde, M., Trejo, C. and Rojas, E. (2001) Is the capacity of lead acetate and cadmium chloride to induce genotoxic damage due to direct DNA-metal interaction? *Mutagenesis.* 16 (3), 265-270.
- Wang, X. and Quinn, P. J. (2000) The location and function of vitamin E in membranes (review). *Mol. Membr. Biol.* 17, 143-156.
- Wierzbicka, M. (1995). How lead loses its toxicity to plant. *Acta Soc. Bot Pol.* 64, 81-90.
- Wierzbicka, M. (1998). Lead in the apoplast of *Allium cepa* L. root tips--ultrastructural studies. *Plant Science* 133, 105-119.
- Wierzbicka, M.H., Przedpeńska, E., Ruzik, R., Ouerdane, L., Połec-Pawlak, K., Jarosz, M., Szpunar, J., Szakiel, A. (2007). Comparison of the toxicity and distribution of cadmium and lead in plant cells. *Protoplasma* 231, 99-111.
- Xu, J., Lian, L. J., Wu, C., Wang, X. F., Fu, W. Y. and Xu. L. H. (2008). Lead induces oxidative stress, DNA damage and alteration of p53, Bax and Bcl-2 expressions in mice. *Food Chem. Toxicol.* DOI:10.1016/j.fct.2007.12.016.

Yang, J. L., Wang, L. C., Chang, C. Y. and Liu, T. Y. (1999). Singlet oxygen is the major participating in the induction of DNA strand Breakage and 8-hydroxydeoxyguanosine adduct by lead acetate. *Environ. Mol. Mutagen.* 33, 194-201.

Chapitre VI :

Discussion

Perspectives

La problématique de notre travail s'inscrit dans une thématique plus générale, développée au sein du laboratoire d'Ecologie fonctionnelle (EcoLab), visant à caractériser les transferts sol-plante de plomb et à évaluer leurs impacts sur les végétaux. Cette étude s'est effectuée en parallèle et en complément des travaux de thèse de M^{elle} Cecchi, portant sur le devenir du plomb dans le système sol-plante de sols prélevés à proximité d'une usine de recyclage du plomb (Cecchi, 2008). Cette collaboration nous a permis de sélectionner pour notre étude des doses de métal ayant une réalité environnementale au regard des concentrations pouvant se rencontrer dans des sols pollués par des activités anthropiques.

Dans ce contexte, la base de notre projet était d'évaluer l'impact d'une contamination en plomb réaliste sur des végétaux. De cette base, nous avons défini un double objectif. Dans un premier temps, il s'agissait de caractériser, à l'aide de plusieurs biomarqueurs de stress, l'état physiologique de plants de *Vicia faba* soumis à différentes concentrations en plomb au cours d'une exposition de courte durée. Dans un second temps, l'objectif était de mettre en évidence certains mécanismes conduisant à la phytotoxicité du plomb, en nous intéressant, plus particulièrement, au rôle joué par les espèces réactives de l'oxygène (ERO).

1 Absorption du plomb et translocation vers les parties aériennes

La première étape de ces travaux de thèse a été de caractériser l'absorption du plomb par les racines et son transfert vers les parties aériennes. L'absorption racinaire, mesurée sur des plantes âgées de deux et trois semaines, s'est révélée extrêmement variable au cours des premières vingt-quatre heures d'exposition (chapitres III et V). Une grande partie de l'absorption (35 %) s'effectue lors de la première heure de traitement. La vitesse d'accumulation est ensuite considérablement ralentie entre une heure et quatre heures avant qu'elle n'augmente de nouveau après huit heures. Cependant, si l'on prend en compte les variations importantes des mesures obtenues à huit heures d'exposition, les résultats laissent penser que la courbe d'absorption racinaire du plomb est plutôt monophasique et linéaire entre une heure et vingt-quatre heures ($r^2 = 0,97$). Aucune donnée bibliographique n'est disponible concernant les cinétiques d'entrée et de translocation de ce métal sur de courtes périodes d'exposition. Toutefois, deux études concernant le cadmium, le nickel et le cuivre, et utilisant des pas de temps plus courts, ont établi que la plus grande partie de métal s'accumulant dans la racine pénétrait lors de la première demi-heure d'exposition (Nedelkoska and Doran, 2000; Sgherri *et al.*, 2007). Ces auteurs ont également montré des cinétiques triphasiques aux profils similaires aux nôtres. Au vu de ces résultats et de la

variabilité des mesures au point huit heures, il est difficile de conclure entre une cinétique d'absorption tri ou biphasique.

L'étude du transfert du plomb vers les parties aériennes a révélé que sa translocation était faible chez la fève. L'accumulation foliaire ne commence qu'après huit heures d'exposition. Cette durée est également un point critique dans les feuilles. Plus du tiers des plantes traitées et analysées ne présentaient aucune trace de plomb (résultats non présentés). Dans les feuilles, après vingt-quatre heures d'exposition, seuls 3,3 µg de plomb sont présents par gramme de poids sec. Ces résultats confirment la faible mobilité du plomb vers les parties aériennes (Wierzbicka, 1987; Wierzbicka *et al.*, 2007), et le fait que la fève ne soit pas une plante accumulatrice de métaux (Piechalak *et al.*, 2002; Piechalak *et al.*, 2003). La proportion de plomb présente dans les feuilles (2,9 % du plomb contenu dans les racines) est cependant supérieure à celle rencontrée habituellement dans les plantes non accumulatrices (Huang and Cunningham, 1996). Il faut toutefois pondérer ce résultat, en tenant compte du fait que les études d'accumulation s'effectuent généralement sur des plantes traitées pendant plusieurs jours, voire plusieurs dizaines de jour. Piechalak et collaborateurs (2002), ont montré que la proportion de plomb dans les parties aériennes de fèves était de 0,25 % après 96 heures de traitement au plomb, alors qu'elle représentait 2 % au bout de 24 heures.

En prenant en compte nos résultats et ceux de la bibliographie, la rapide limitation de l'entrée de plomb dans la racine pourrait être un mécanisme général de défense de la plante contre les métaux lourds. Les végétaux pourraient limiter directement l'absorption active des Eléments Traces Métalliques (ETM) en régulant l'activité de canaux et transporteurs spécifiques. Toutefois, le fait que ce phénomène soit commun à quatre métaux différents, laisse plutôt penser à une limitation de l'entrée passive, via le flux d'eau. Les ETM ont en commun leur capacité à induire une fermeture des stomates (Seregin and Ivanov, 2001; Schutzenhubel and Polle, 2002; Clemens, 2006b). Le peroxyde d'hydrogène participe activement à la régulation du mécanisme d'ouverture/fermeture des cellules de garde (Desikan *et al.*, 2004). Il pourrait jouer le rôle de molécule signal entre les racines et les feuilles pour induire la fermeture des stomates lors de stress (Yang *et al.*, 2006b). L'H₂O₂ est également très rapidement produit lors d'un stress métallique (Schutzenhubel and Polle, 2002; Clemens, 2006b; Maksymiec, 2007). Nous avons donc recherché, dans la sève brute, la présence de peroxyde d'hydrogène. Nous avons mis au point un dispositif de tirage, à froid et à l'obscurité, de la sève brute que nous avons analysée au luminomètre en présence de luminol et de peroxydase (Pinelli *et al.*, 1994). Malgré un seuil de détection de 1,5.10⁻⁸ M,

nous n'avons pas pu révéler la présence d' H_2O_2 dans la sève de fèves témoins, ou traitées au plomb (résultats non présentés). Du fait du temps de prélèvement de la sève (trente minutes) et de la possible dismutation de l' H_2O_2 , les résultats obtenus ne nous permettent pas de conclure quant à l'implication du peroxyde d'hydrogène dans la régulation de ce phénomène.

L'acide abscissique (ABA) pourrait également être un candidat au rôle de molécule signal entre les racines et les parties aériennes. Aucune étude n'a porté sur des modifications de la teneur en ABA, induites par des métaux sur des temps courts. Toutefois, lors d'exposition plus longues, sa teneur est modulée par les ETM (Seregin and Ivanov, 2001; Clemens, 2006b; Maksymiec, 2007). Lors d'un stress hydrique, les teneurs en ABA racinaire, foliaire et xylémique varient de façon très importante, et après seulement quinze minutes, induisant une fermeture très rapide des stomates (Shashidhar *et al.*, 1996; Hansen and Dorffling, 1999; Seregin and Ivanov, 2001; Zhang *et al.*, 2001). Hansen et collaborateurs (1999) ont montré, en réhydratant des plantes soumises à un stress hydrique, que ce phénomène était aussi très rapidement réversible (quinze minutes). Ainsi, l'ABA pourrait moduler, du moins en partie, l'absorption des ETM comme le plomb, via la régulation du flux hydrique.

2 Effets du plomb sur *Vicia faba* : implication des ERO

2.1 Toxicité dans le système racinaire

Une exposition courte à une concentration réaliste de plomb induit peu de modifications à l'échelle macroscopique chez *Vicia faba*. Un tel traitement entraîne un léger brunissement de la racine, caractéristique d'un stress. Les apex racinaires commencent également à se nécroser (résultats non présentés). Ces effets du plomb sont la conséquence d'une mort cellulaire dans les zones contenant les plus fortes concentrations en métal (Wierzbicka, 1987; Tung and Temple, 1996b; Seregin *et al.*, 2004). Au niveau histologique, aucune différence n'a été constatée entre les plantes témoins et celles traitées pendant vingt-quatre heures (Figure 38).

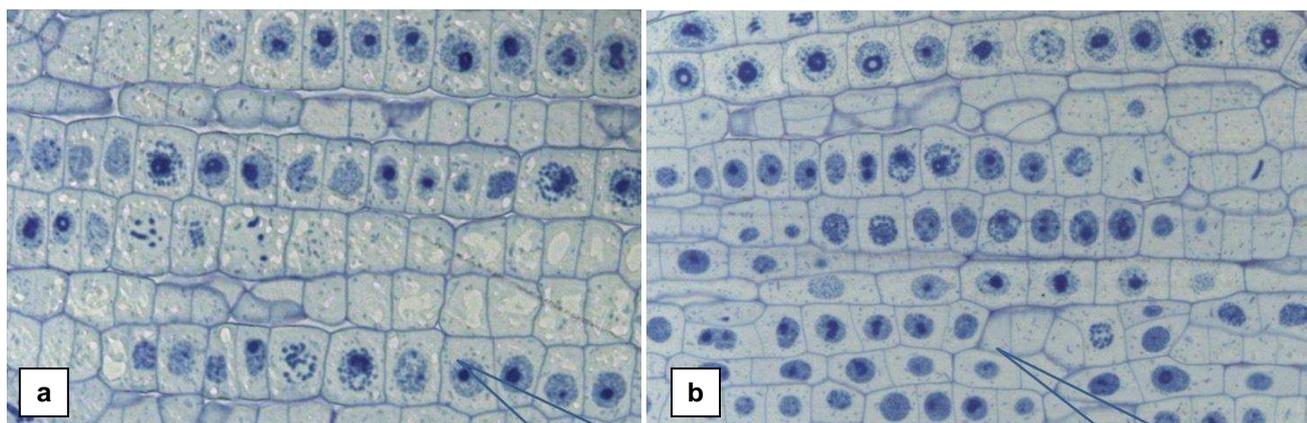


Figure 38 : Coupes transversales de racines de *Vicia faba* (a) témoins ou exposées au plomb pendant vingt-quatre heures (b). Les coupes ont été colorées au bleu de Toluidine (voir Annexe 3) et observées au grossissement x100.

Au contraire, l'utilisation de biomarqueurs de stress a révélé des différences significatives entre les deux groupes de plantes (Chapitre III). La bibliographie suggère fortement l'implication du stress oxydatif dans la toxicité des métaux lourds (Stohs and Bagchi, 1995; Ercal *et al.*, 2001; Galaris and Evangelou, 2002; Valko *et al.*, 2006). Nous avons donc choisi de mesurer spécifiquement des paramètres couramment employés dans l'évaluation du niveau de stress oxydatif d'un organisme (activités antioxydantes, peroxydation lipidique, niveau de glutathion). Les résultats obtenus ont mis clairement en évidence la génération de deux flambées oxydatives. La première, très rapide, est mesurée après seulement une heure d'exposition. Cependant, il se pourrait que cette flambée débute plus rapidement. En effet, nous avons constaté sur des racines excisées une production d'anion superoxyde après seulement quelques secondes (Chapitre IV A). Sur plantes entières exposées à du cuivre, Sgherri et collaborateurs (2007) ont constaté la production d'ERO après seulement une minute dans les racines. Dans nos conditions expérimentales, nous avons ensuite constaté une diminution du niveau de stress oxydatif. Après douze heures d'exposition, nous avons mesuré une seconde flambée oxydative. Si la production d'ERO a déjà largement été démontrée lors d'une contamination au plomb (Seregin and Ivanov, 2001; Schutzendubel and Polle, 2002; Patra *et al.*, 2004; Sharma and Dubey, 2005), à notre connaissance, c'est la première fois qu'une double flambée oxydative est rapportée. Ce phénomène est connu depuis une quinzaine d'années et a été essentiellement constaté lors d'interactions plante-microorganismes (voir pour revue Mika *et al.*, 2004). Récemment, il a également été mis en évidence dans des racines de blé traitées avec du cuivre (Sgherri *et al.*, 2007) et dans des cellules de tabac exposées au cadmium (Garnier *et al.*, 2006). Cependant,

dans le cas de ces deux métaux, les mécanismes de production d'ERO ne semblent pas être identiques. Sgherri et collaborateurs (2007) ont montré que cette double flambée était apoplastique. Garnier et collaborateurs (2006) ont, quant à eux, révélé l'induction d'une production rapide d'ERO dans l'apoplaste, suivie par une seconde vague d'ERO produite par les mitochondries. Nos résultats obtenus lors de la localisation histochimique des ERO (chapitre IV B) montrent que la double flambée oxydative induite par le plomb est localisée dans l'apoplaste. Cependant, notre méthodologie a été incapable de révéler la présence d'ERO à l'intérieur des cellules, et ce, quel que soit le traitement. De plus, l'étude des activités enzymatiques a suggéré la présence potentielle d'une source interne d'ERO, éloignée de la membrane plasmique. Nos résultats ne permettent pas de trancher quant à la possibilité d'une source interne d'ERO.

Chez les mammifères, les espèces réactives de l'oxygène sont connues comme jouant un rôle important dans la toxicité des métaux et en particulier dans leur génotoxicité (Stohs and Bagchi, 1995; Galaris and Evangelou, 2002; Shi *et al.*, 2004; Valko *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2008). Nous nous sommes donc intéressés à la génotoxicité induite par le plomb, et au rôle potentiel des ERO chez *Vicia faba* (Chapitre V). L'utilisation conjointe du test des micronoyaux (MN) et du Comet assay a révélé un effet génotoxique très rapide et dose-dépendant du plomb. Cependant, l'emploi d'un protocole modifié du Comet assay, dit acellulaire, a révélé que le plomb n'interagissait pas directement avec l'ADN. Ce résultat suggère l'existence de mécanismes cellulaires indirects conduisant à la génotoxicité de ce métal. Le pré-traitement des plantes avec de la vitamine E conduit à la totale inhibition de la formation de MN et de cassure sur l'ADN. Ce résultat met clairement en évidence l'implication des ERO dans la génotoxicité du plomb. Toutefois, lors d'une exposition au plomb, rien ne permet d'affirmer que les ERO générées agissent directement sur la molécule d'ADN. En effet, la vitamine E ne possède pas seulement la capacité de détoxifier les ERO. Du fait de sa localisation membranaire, elle est l'antioxydant le plus important dans la prévention de la peroxydation lipidiques (Fryer, 1992). Elle serait également l'antioxydant le plus important dans la tolérance des végétaux aux métaux (Collin *et al.*, 2008). Effectivement, dans nos conditions de culture, un prétraitement avec de la vitamine E, abolit totalement la peroxydation lipidique initiée par le plomb (résultats non présentés). Or, certains dérivés lipidiques, comme le MDA, possèdent un fort potentiel génotoxique. Bien que la teneur en hydroperoxydes lipidiques ait augmenté lors des deux flambées oxydatives, la concentration en MDA racinaires n'a pas montré d'évolution significative. Toutefois, il faut relativiser ces

données, car le MDA est, dans les plantes, formé essentiellement dans les parties aériennes. De ce fait, ce résultat n'exclut en aucun cas l'hypothèse d'une action génotoxique du plomb impliquant la participation d'autres dérivés lipidiques ne réagissant pas avec l'acide thiobarbiturique. Si le rôle joué par les ERO est fondamental, les diverses expérimentations menées ne permettent pas de conclure définitivement sur le mécanisme précis conduisant à la génotoxicité du plomb. L'existence de plusieurs voies simultanées n'est pas non plus à exclure.

Notre étude portant sur l'effet génotoxique du plomb a également révélé que la formation de micronoyaux et l'induction de cassures sur les brins d'ADN, présentaient la même réponse dose-dépendante au plomb. En règle générale, les résultats obtenus par le test des MN et le Comet assay ne sont pas forcément corrélés. Cette corrélation est dépendante du type de polluant considéré (Hartmann *et al.*, 2001). Nos résultats ont également prouvé que la formation de MN et de cassures sur l'ADN était totalement inhibée en présence de vitamine E. Si la relation tripartite entre le stress oxydatif, l'apparition de cassures sur l'ADN et la formation de MN a déjà été suggérée sur des cellules humaines (Kim *et al.*, 1997), à notre connaissance, c'est la première fois qu'elle est mise en évidence chez les végétaux.

2.2 Toxicité dans les parties aériennes

De la même manière que pour les racines, après vingt-quatre heures d'exposition à des concentrations réalistes en plomb, aucun effet n'est visible sur les feuilles à l'échelle macroscopique. L'analyse histologique n'a également montré aucune différence entre les cellules provenant de plantes témoins ou traitées (résultats non présentés). Par contre, au niveau physiologique, le plomb n'induit pas seulement des effets délétères au niveau des racines. Une exposition à ce métal entraîne de nombreuses perturbations dans les parties aériennes, en particulier de l'appareil photosynthétique, et génère du stress oxydatif (Seregin and Ivanov, 2001; Sharma and Dubey, 2005). L'utilisation de biomarqueurs de stress nous a permis de constater que ces types de perturbations apparaissaient très rapidement dans les feuilles de *Vicia faba*. En effet, après seulement huit heures de traitement, les résultats démontrent la génération d'un important stress oxydatif. Cette induction est concomitante avec l'apparition des premières traces de plomb dans les feuilles. Si l'on considère seulement la peroxydation lipidique, l'amplitude de ce phénomène est comparable à celle observée dans les racines. Cependant, la concentration foliaire en plomb, à huit heures, est quarante fois plus

faible que celle mesurée dans les racines à une heure, lors de la première flambée oxydative. Au vu de nos résultats, le stress oxydatif semble perdurer dans les feuilles, entre huit et douze heures. Toutefois, le fait de ne pas avoir de mesures intermédiaires ne nous permet pas de le certifier. La modulation des enzymes antioxydantes et l'induction de la peroxydation observées pourraient aussi être la conséquence de deux flambées oxydatives distinctes, la première due à la production d' O_2^- et la seconde d' H_2O_2 comme le suggère l'analyse des activités des enzymes antioxydantes (chapitre III).

L'arrivée de plomb dans les feuilles n'entraîne pas seulement un stress oxydatif, elle induit également une diminution forte et rapide de la teneur en pigments photosynthétiques. Si l'action négative du plomb sur ces pigments a été largement démontrée, ce résultat n'en reste pas moins étonnant par la célérité du phénomène. En effet, la toxicité du plomb sur les chlorophylles et caroténoïdes est associée à sa capacité à inhiber leurs voies de biosynthèse, comme par exemple en rendant inactive l'ALAD (Wozny *et al.*, 1995 ; Łukaszek and Poskuta, 1998). La rapidité de l'altération observée lors de nos expérimentations ne peut pas s'expliquer par une inhibition des voies de biosynthèse. Il semble donc que le plomb agisse sur les pigments par un autre mécanisme, direct ou indirect. Drazkiewicz (1994) a démontré que ce métal pouvait activer les chlorophyllases. Cependant, nos résultats révèlent une corrélation inverse entre le taux de peroxydation lipidique et la concentration en pigments. Cette corrélation suggère fortement l'implication des ERO dans l'altération pigmentaire observée. Très peu d'études ont évalué l'impact de contaminations métalliques sur les pigments photosynthétiques, à des temps courts et sur plantes entières. Sur une plante aquatique, Ralph et Burchett (1998) ont montré une diminution importante de la teneur en chlorophylle après cinq heures d'exposition au plomb, au cadmium, au cuivre ou au zinc. Ces auteurs ont également enregistré une forte diminution de la teneur en caroténoïdes dans les seules plantes exposées au plomb. Ces résultats suggèrent un mécanisme commun d'interactions entre les métaux et les chlorophylles, dans les premières heures d'exposition. La production d'ERO pourrait être impliquée dans ce mécanisme. Dans le cas des caroténoïdes, les résultats obtenus par Ralph et Burchett (1998) laissent penser à une action spécifique du plomb sur ces pigments.

En prenant en considération l'ensemble de ces résultats, les feuilles de *Vicia faba* apparaissent très sensibles au plomb. Cette plante n'étant pas une plante accumulatrice de métaux, ou tolérante aux métaux, elle ne semble pas posséder de système de détoxification efficace pour lutter contre le plomb, voire contre les ERO induites par ce métal. En tenant

compte de la teneur en plomb dans les différents organes, la très grande sensibilité des feuilles par rapport aux racines pourrait être une des causes de la faible tolérance de *Vicia faba* au plomb.

3 Rôle de la NADPH-oxydase dans la toxicité du plomb

3.1 Induction de la NOX

La production d'ERO est courante chez les végétaux en réponse à un stress biotique ou abiotique. Si la flambée secondaire observée peut être intracellulaire (mitochondrie), la flambée oxydative primaire est apoplastique, et d'origine enzymatique (Mika *et al.*, 2004). Ces dernières années, plusieurs études se sont consacrées au rôle joué par les sources enzymatiques d'ERO lors de stress métalliques. Elles ont identifié les NADPH-oxydases (NOX), les peroxydases extracellulaires (POX), les oxalate-oxydases (OxO) et/ou les amine-oxydases à cuivre (CuZnAO) comme étant impliquées dans la production d'ERO induite par les ETM. Aucune étude n'ayant porté sur le plomb, nous avons décidé de déterminer quelle(s) enzyme(s) étai(en)t impliquée(s) dans la génération d'ERO caractérisée dans les expérimentations précédentes. Dans un premier temps, dans des racines de fèves exposées au plomb, nous avons constaté par chimiluminescence l'induction dose-dépendante d'une forte production d' $O_2^{\cdot-}$. L'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques des différentes sources enzymatiques potentielles d'ERO a mis en évidence une inhibition dose-dépendante de cette production, uniquement dans les racines prétraitées avec des inhibiteurs des NOX : quinacrine, imidazole ou diphenylène iodonium (DPI). Ces résultats démontrent clairement l'implication des NOX dans la flambée oxydative primaire induite par le plomb, comme précédemment démontré pour le cadmium, le cuivre et le nickel (Romero-Puertas *et al.*, 1999; Quartacci *et al.*, 2001; Olmos *et al.*, 2003; Romero-Puertas *et al.*, 2004; Garnier *et al.*, 2006; Hao *et al.*, 2006; Maksymiec and Krupa, 2006). Seulement quelques mois après la publication en ligne de nos résultats, les travaux de Huang et Huang (2008) sont venus confirmer l'implication des NOX dans la génération du stress oxydatif induit par le plomb.

L'activation de la NADPH-oxydase semble être une réponse universelle lors de stress métalliques. Les mécanismes de cette activation ne sont pas encore totalement élucidés, et le rôle du calcium fait débat. De plus, aucune donnée n'existait concernant le plomb. Lors des expérimentations de chimiluminescence, nous avons donc essayé d'appréhender les mécanismes d'activation de la NOX par le plomb (chapitre IV A). Nos résultats ont montré

que le lanthane, un inhibiteur des canaux calciques voltage-dépendant et des antiports $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ (Bush, 1995), abolissait complètement la flambée oxydative. Ce résultat, également observé avec le cadmium (Olmos *et al.*, 2003; Romero-Puertas *et al.*, 2004; Garnier *et al.*, 2006) a conduit Romero-Puertas et collaborateurs (2004) à conclure qu'une entrée de calcium extracellulaire induisait l'activité de la NOX. Cependant, nos expérimentations ont montré que l'apport de calcium dans le milieu réactionnel conduisait à une inhibition dose-dépendante de la production d'ERO. L'utilisation d'A23187, un ionophore calcique membranaire, n'a entraîné aucun effet significatif (résultats non présentés). Ces deux données contredisent l'hypothèse de Romero-Puertas, et suggèrent un autre rôle pour les canaux sensibles au lanthane. Garnier et collaborateurs (2006) ont proposé que le cadmium pénètre dans les cellules via des canaux ou des transporteurs spécifiques au calcium, du fait d'un rayon ionique proche et d'un nombre identique de charges entre Ca^{2+} et Cd^{2+} . Cependant, la saturation du milieu extérieur en calcium, ainsi que l'utilisation de La^{3+} inhibent la production d' $\text{O}_2^{\cdot-}$ induite par le cadmium (Olmos *et al.*, 2003; Garnier *et al.*, 2006) mais également par le plomb (Pourrut *et al.*, 2008) et le nickel (Hao *et al.*, 2006). L'ensemble des résultats suggère que la pénétration de ces métaux s'effectue de façon non spécifique, via des canaux sensibles au lanthane (Figure 39. 1 et 2).

Les motifs « EF hand » de la protéine Rboh permettent une activation directe de cette protéine par le calcium (Sagi and Fluhr, 2001). Le plomb possède une affinité importante pour ces motifs, et peut rentrer en compétition avec le calcium pour se lier à eux (Habermann *et al.*, 1983; Vyas *et al.*, 1989). Une fois pénétré dans le symplaste, le plomb pourrait potentiellement interagir avec les motifs « EF hand » de Rboh (Figure 39.3), et ainsi activer directement la NOX. Cependant, nos travaux ont mis en avant l'implication de protéines kinases (PK) et le passage par une étape dépendante de la calmoduline dans l'activation de la NOX (Figure 39.4). Ces résultats semblent indiquer la participation d'une protéine kinase dépendante de la calmoduline (CamK). Contrairement aux cellules animales, les cellules végétales possèdent peu de CamK, et celles-ci ont été très peu étudiées (Harmon *et al.*, 2000). Le manque de données concernant ces enzymes ne nous permet pas de discuter de cette étape dépendante de la calmoduline. Toutefois, l'inhibition totale de la production d'anions superoxydes par la staurosporine, un inhibiteur à large spectre des PK, ne peut pas être uniquement imputée à l'inhibition d'une hypothétique CamK. Deux types de protéines kinases ont un rôle important dans l'activation des NOX. La première catégorie concerne les protéines kinases C (PKC) qui phosphorylent les composants cytosoliques, entraînant la

formation du complexe enzymatique de la NOX (Figure 39.5). Il n'existe pas de PKC chez les végétaux, bien que la présence d'une activité PKC ait été démontrée (Subramaniam *et al.*, 1997), suggérant la présence d'une protéine homologue (PKC-like). Nous avons testé, dans des plantes non-traitées au plomb, l'effet du 12-O-tétradécanoylphorbol-13-acétate (TPA), un activateur connu de la PKC chez les cellules animales (Pinelli, 1993; Pinelli *et al.*, 1994), sur la génération d'ERO. Dans les racines de *Vicia faba*, le TPA seul induit une flambée oxydative, indiquant la présence d'une protéine homologue de la PKC et son implication dans la régulation du complexe de la NOX (résultats non présentés).

L'autre catégorie de PK correspondrait aux PK impliquées dans la phosphorylation et l'activation de la phospholipase C (PLC ; Figure 39.6). Garnier et collaborateurs (2006) ont montré que cette enzyme jouait un rôle central dans l'activation de la NOX par le cadmium. Son activité génère la formation d'inositol triphosphate (IP₃) et de diacylglycérol (DAG). L'IP₃ est responsable de la libération du Ca²⁺ contenu dans les réservoirs cellulaires (Figure 39.7). Cette brusque augmentation de la concentration intracellulaire en calcium a de nombreuses répercussions. En particulier, cet afflux de calcium peut activer directement la NOX par liaison avec les motifs « EF hand » (Figure 39.8) ou indirectement en activant une PKC (Figure 39.9). Le DAG formé peut également activer une PKC (Figure 39.10). Les résultats de Garnier et collaborateurs et nos résultats obtenus avec le TPA suggèrent fortement l'implication d'une PKC-like dans l'activation de la NOX.

Une autre source d'activation de la NOX pourrait être la formation d'acide phosphatidique (AP). Son mode d'action n'a pas encore été clairement défini, mais il semblerait qu'il participe à la phosphorylation de la protéine p47^{phox} entraînant sa migration vers la membrane et son assemblage avec les protéines membranaires du complexe enzymatique de la NOX (Waite *et al.*, 1997 ; Figure 39.11). Récemment, Park et collaborateurs (2004) ont montré que l'AP activait la protéine GTPase ROP, régulant ainsi l'activité de la NOX (Park *et al.*, 2004 ; Figure 39.11). L'AP peut être formé par la transformation du DAG ou par l'activation d'une autre phospholipase, la PLD. Cette enzyme serait impliqué dans l'activation de la NOX dans des cellules de tabac exposées au cuivre (Yu *et al.*, 2008).

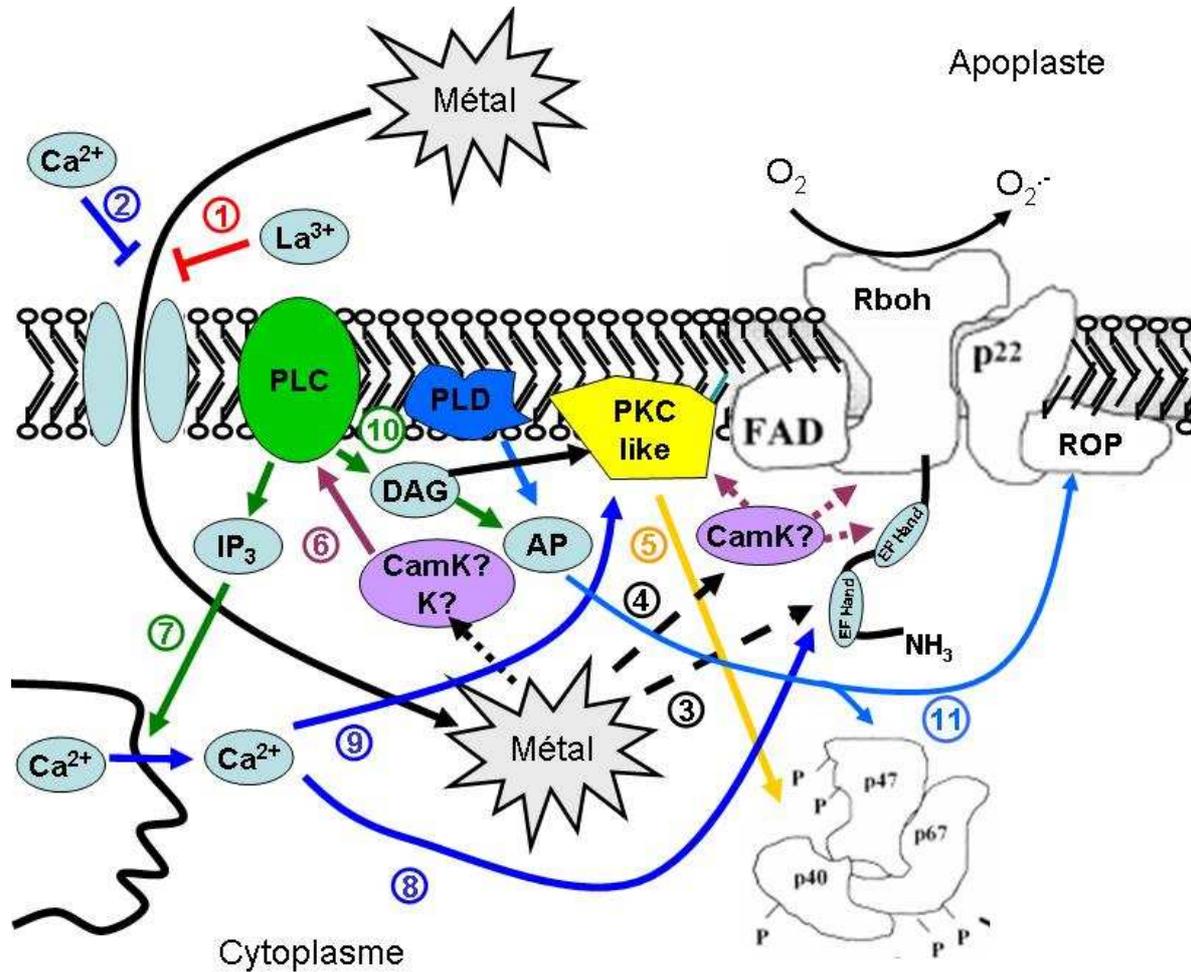


Figure 39 : Représentation schématique des différentes voies potentielles de régulation des NOX végétales suite à une exposition à un métal.

3.2 Implication de la NOX dans la toxicité du plomb

Comme précédemment évoqué, plusieurs études ont mis en évidence l'implication de la NOX dans la flambée oxydative, suite à une exposition à un ETM. Cependant, ces travaux se sont souvent bornés à seulement caractériser la source initiale de cette flambée. Cette focalisation sur la production d'ERO ne permet pas réellement d'appréhender le rôle des NOX dans la toxicité des ETM. En effet, si les NOX initient la flambée oxydative, les ERO issues de leur activité ne sont pas forcément responsables de la toxicité observée. D'autres sources, enzymatiques ou non, intracellulaires (mitochondrie), membranaires ou extracellulaires peuvent prendre le relais (Mika *et al.*, 2004; Garnier *et al.*, 2006). Il était donc important d'essayer d'évaluer la part relative de l'activité de la NOX dans le stress oxydatif induit par le plomb.

Le pré-traitement avec du DPI des plantes exposées au plomb a clairement montré que la NOX jouait un rôle central dans la toxicité du plomb chez *Vicia faba* (chapitre IV B). Au niveau macroscopique, le DPI supprime le phénomène de brunissement observé sur les racines et réduit la nécrose apicale (résultats non présentés). L'utilisation de cet inhibiteur pharmacologique a également totalement aboli la première flambée oxydative et la peroxydation lipidique qui en résulte dans les racines. L'autre point important est que l'inactivation des NOX supprime complètement la formation de micronoyaux induite par le plomb (Figure 40). Des résultats préliminaires obtenus avec le Comet assay confirment également l'inhibition de la génotoxicité du plomb par un pré-traitement au DPI (résultats non présentés). Plusieurs études réalisées sur des cellules humaines, ont également mis en évidence le rôle joué par ces enzymes dans la génotoxicité induite par des rayonnements ou certains polluants (Lynn *et al.*, 2000; Azzam *et al.*, 2002; Romanowska *et al.*, 2007).

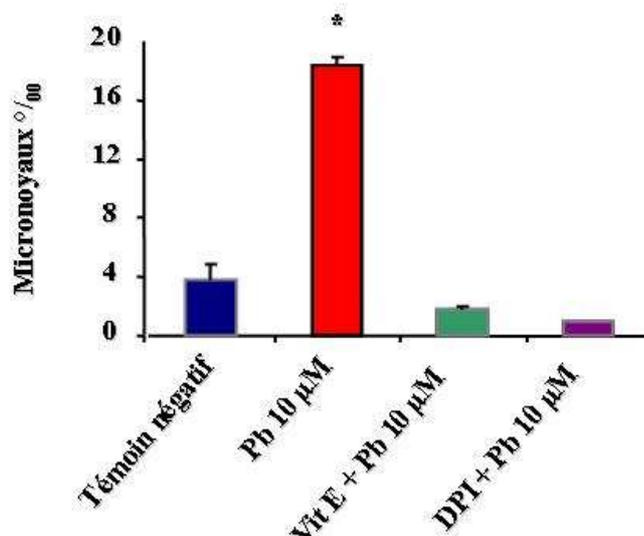


Figure 40 : Formation de micronoyaux dans des cellules racinaires de *Vicia faba* exposées à divers traitements.

Le rôle des NOX dans la toxicité du plomb au niveau foliaire a été plus difficile à évaluer, du fait de la production tardive de la flambée oxydative. En effet, nous sommes arrivés aux limites de l'approche pharmacologique. Les traitements au DPI peuvent induire des perturbations physiologiques après plusieurs heures. Après vingt-quatre heures de co-traitement, nous avons obtenu des résultats totalement inexploitable (écart-types très importants). Nous n'avons donc pu mesurer les effets du DPI qu'à huit et douze heures d'exposition. A ces deux durées de traitement, les résultats obtenus ont été identiques. Le DPI abolit complètement la production d'ERO et la peroxydation lipidique (résultats non

présentés). La réponse des pigments à ce pré-traitement est différente en fonction de la nature du pigment considéré (Figure 41). La teneur en chlorophylle b revient au niveau basal, alors que celle en caroténoïdes n'est absolument pas affectée par le DPI. La réponse de la chlorophylle a est intermédiaire puisque le DPI ne limite qu'une partie de l'action négative du plomb.

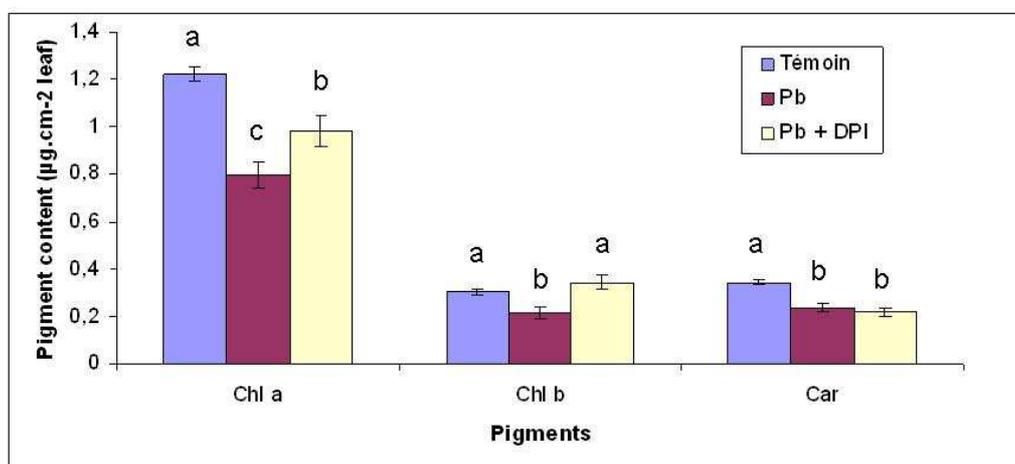


Figure 41 : Teneur foliaire en pigments photosynthétiques dans des plantes témoins, traitées uniquement au plomb pendant huit heures ou co-traitées au DPI pendant la même durée.

L'ensemble de ces résultats amène à reconsidérer légèrement l'action du plomb sur les pigments photosynthétiques. Les hypothèses d'une action indirecte du plomb via les ERO sur la chlorophylle b et d'une action directe du plomb, ou indirecte via un mécanisme non dépendant des ERO sur les caroténoïdes, sont renforcées par les résultats obtenus avec le DPI. Dans le cas de la chlorophylle a, il semble que seule une partie de ces molécules soit dégradée sous l'action des ERO.

4 Rôle du glutathion dans la défense de la plante

Le dernier point important soulevé par nos expérimentations est le rôle fondamental joué par le GSH et les PC. Nous avons pu constater une induction très rapide de la synthèse des PC dans les racines. Cette production s'est révélée être fortement corrélée ($r^2 = 0,89$) à la concentration racinaire en plomb. Ces résultats sont en accord avec le fait que l'induction de la phytochélatine synthétase (PCS) nécessite la présence de métaux. En revanche, nous avons constaté avec surprise une augmentation très importante de teneur en PC foliaire dès une heure d'exposition au plomb. La concentration en PC foliaire est alors trois fois supérieure à

la concentration racinaire. Une fois encore, peu d'études sont disponibles concernant l'activation des PC sur des temps courts. Maksymiec et collaborateurs (2007) n'ont constaté aucune variation significative dans la concentration en PC de feuilles d'*A. thaliana* traitées avec du cadmium et du cuivre pendant quinze heures. Une apparition aussi rapide de PC dans les feuilles n'a été rapportée que dans le cas de tournesols traités à l'arsenic (Raab *et al.*, 2005). Cependant, le tournesol est une plante accumulatrice de métaux, et dans ce cas, cette apparition était corrélée avec une accumulation de métal dans les feuilles. Or, dans nos conditions, aucune trace de plomb n'a pu être détectée avant huit heures d'exposition. De plus, l'analyse des résultats a révélé une corrélation très forte entre la teneur foliaire en PC et la concentration racinaire en plomb ($r^2 = 0,89$). Nous avons donc suggéré l'idée d'une relation forte entre les parties aériennes et racinaires. Cette accumulation rapide pourrait être la conséquence d'une synthèse foliaire, dont une partie serait transférée vers les racines où l'afflux de plomb est très important. Ce mécanisme a été précédemment démontré dans le cas du cadmium (Chen *et al.*, 2006). Du fait qu'aucune trace de plomb n'ait été détectée dans les feuilles avant huit heures de traitement, l'accumulation foliaire de PC pourrait également être due à une translocation de la production racinaire vers les feuilles. Cette translocation a déjà été mise en évidence chez des plants d'*A. thaliana* traités au cadmium (Gong *et al.*, 2003). Cependant, nos expérimentations ne nous ont pas permis de déterminer si cette accumulation rapide était la résultante d'une synthèse foliaire ou d'une translocation d'une partie du pool racinaire. Quelle que soit l'origine de cette accumulation foliaire, nous pensons que ce phénomène pourrait être un mécanisme de défense mis en place par la plante pour protéger les parties aériennes contre le plomb. Comme nous l'avons vu au cours de l'étude sur la toxicité de ce métal, les feuilles sont très sensibles à de faibles concentrations en plomb. Une accumulation « préventive » de PC dans les feuilles, en l'absence de métal, permettrait ainsi de protéger, du moins en partie, les cellules foliaires et l'appareil photosynthétique.

Dans les racines, la synthèse importante de phytochélatines n'a pas été corrélée avec une diminution du pool de GSH comme cela est régulièrement rapporté (Clemens, 2006a; Clemens, 2006b). Le maintien de la stabilité de ce pool est très certainement dû à l'activation très importante de la glutathion réductase (GR), catalysant la régénération du GSH. Ce tripeptide joue un rôle essentiel dans la détoxification des métaux en les chélatant directement, ou en étant utilisé par la PCS pour synthétiser des PC. Il joue également un rôle fondamental dans la régulation du statut redox des cellules et dans la détoxification directe ou indirecte des ERO, via le cycle Asada-Halliwell-Foyer. Nos résultats ont révélé que de l'activation de la

GR était toujours corrélée à l'apparition de flambées oxydatives, aussi bien dans les feuilles que dans les racines. De plus, l'utilisation de DPI a montré un décalage net de son activation dans le temps, alors que la cinétique de synthèse de PC n'a présenté aucune modification. L'ensemble de ces résultats suggère que le GSH, au-delà de son utilisation dans la chélation des métaux, jouerait un rôle direct dans la détoxification des ERO. Il pourrait constituer la première ligne de défense de la plante contre la flambée oxydative générée par le plomb.

5 Conclusion et perspectives

Ces travaux de thèse sont les premiers travaux réalisés au laboratoire sur la thématique de la toxicité de concentrations réalistes en plomb et de ses mécanismes. Ils ont ainsi permis de commencer à « défricher » ce vaste sujet. Pour résumer, les différents travaux entrepris chez *Vicia faba* ont permis de montrer que des doses réalistes de plomb induisaient très rapidement des effets délétères, aussi bien dans les feuilles que dans les racines. Nous avons révélé que le plomb pénétrait rapidement dans le système racinaire et générait, après seulement quelques heures, un important stress oxydatif à l'origine d'une peroxydation lipidique et de l'induction d'effets génotoxiques dans les cellules racinaires : cassures au niveau de l'ADN et induction d'aberrations chromosomiques. Nous avons pu mettre en évidence que la source de ce stress oxydatif était directement liée à l'activation de NADPH-oxydases. L'utilisation d'inhibiteurs de cette enzyme et d'antioxydants a permis de montrer que la production d'espèces réactives de l'oxygène, initiée par la NADPH-oxydase, était impliquée dans la toxicité du plomb, et plus particulièrement dans sa génotoxicité.

Si cette étude a donné des résultats intéressants, elle a ouvert plusieurs pistes de recherche et a laissé de nombreuses questions en suspens. Nos travaux laissent entrevoir de nombreuses perspectives d'expérimentations permettant de répondre à ces questions.

De façon générale, il serait intéressant de mener des approches comparatives entre la fève et des plantes tolérantes ou accumulatrices de métaux, pour comprendre les mécanismes de toxicité du plomb mais également ceux de tolérance à ce métal. Des études préliminaires menées au laboratoire ont permis de mettre en évidence des différences de réponses physiologiques fondamentales entre la fève et des espèces de *Pelargonium*, plantes accumulatrices de plomb (Silvestre, 2008). Les premiers résultats ont indiqué que le plomb n'induisait chez le *Pelargonium* aucun stress oxydatif ni aucune génotoxicité. L'analyse histologique des racines de ces deux plantes a montré une déformation des parois cellulaires

dans le cortex racinaire de *Pelargonium*, donnant aux cellules une forme "festonnée" (Figure 42 A et B). Cette déformation n'est pas visible chez la fève. On note également chez le *Pelargonium* des dépôts de plomb cytoplasmique (Figure 42 B) absents chez *Vicia faba* (Cecchi, 2008; Silvestre, 2008 ; Figure 42 C).

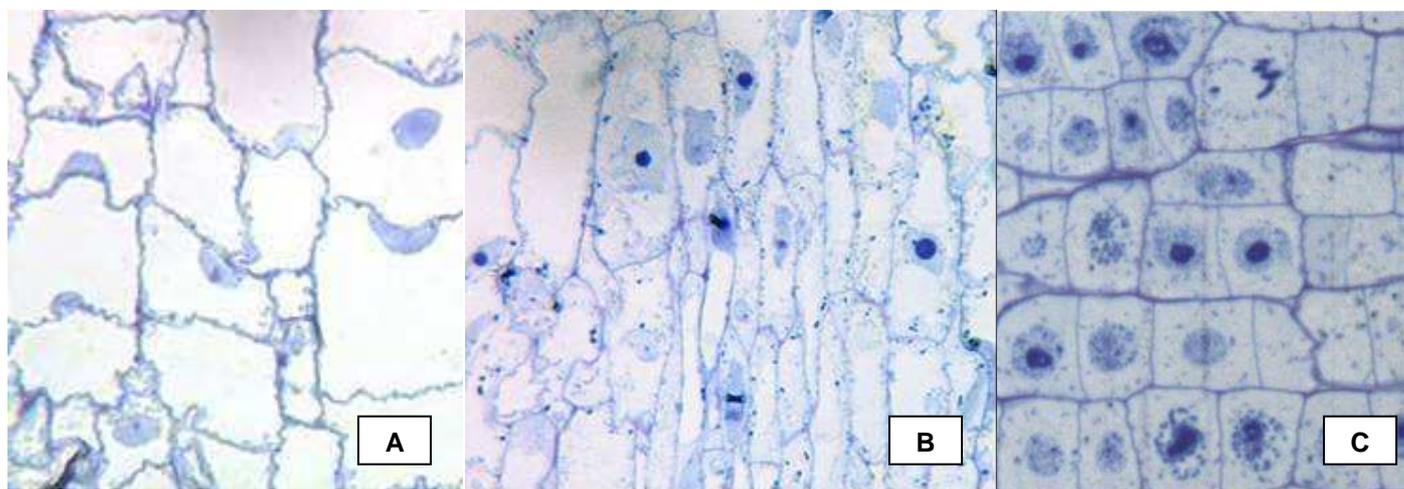


Figure 42 : Coupes de racines de *Pelargonium* (A et B) et de *Vicia faba* (C) exposées à 10 μ M de plomb.

A et B : grossissement x600 ; C : grossissement x400.

Ces résultats suggèrent que le *Pelargonium* tolère le plomb en le précipitant dans l'apoplaste ou en l'accumulant dans les parois. L'incapacité apparente de la fève à faire de même, pourrait expliquer la différence de tolérance au plomb entre ces deux plantes.

Outre cette perspective générale, plusieurs expérimentations peuvent être menées pour répondre à certaines questions spécifiques soulevées au cours de ces travaux :

- *rôle de l'ABA dans la régulation de l'entrée du plomb* : l'analyse de la concentration en ABA dans les racines, les feuilles et la sève pourrait permettre d'expliquer le phénomène de ralentissement observé dans l'entrée racinaire du plomb. L'étude complémentaire de l'état d'ouverture/fermeture des stomates, par mesure de la conductance foliaire ou par observation microscopique directe, serait également à mener. L'utilisation de plantes mutantes de *Vicia faba*, dont les stomates sont insensibles à l'ABA est également à envisager ;

- *Production intracellulaire d'ERO* : nos marquages, réalisés avec des solutions de NBT et de KI-amidon, ne se sont pas révélés efficaces pour mesurer la production d'ERO

intracellulaire. L'utilisation de techniques plus adaptées et plus sensibles (sondes fluorescentes) permettrait de déterminer si le plomb, comme le cadmium, induit la formation intracellulaire d'ERO ;

- *Mécanisme d'activation de la NOX* : une analyse plus fine et plus complète des mécanismes d'activation de la NOX est à envisager. En particulier, il serait intéressant de mesurer les flux de calcium et d'évaluer, grâce à des inhibiteurs spécifiques, l'implication relative des différentes phospholipases (PLC, PLD voire PLA₂) dans l'activation de la NOX induite par le plomb. Le rôle des protéines kinases reste également à élucider ;

- *Mécanismes conduisant à la génotoxicité du plomb* : l'utilisation du Comet assay à des fins de compréhension des mécanismes de génotoxicité est certainement la voie de recherche la plus prometteuse. L'utilisation d'inhibiteurs des phospholipases, des lipoxygénases et de plusieurs antioxydants pourrait permettre de déterminer la responsabilité relative des ERO et des dérivés lipidiques dans la génotoxicité du plomb. De plus, l'emploi de nucléases spécifiques (Fpg, Endo III) pourrait permettre de mesurer, en plus des cassures sur l'ADN, le taux d'oxydation des bases. Ces expérimentations sont déjà en cours au laboratoire.

L'augmentation du taux de cassures sur l'ADN, observable par le Comet assay, peut ne pas être seulement liée à l'induction de cassures, mais peut également être imputée à une diminution de l'efficacité des mécanismes de réparation de l'ADN. L'évaluation de l'efficacité des systèmes de réparations NER (réparation de l'ADN par excision de nucléotides) et BER (réparation de l'ADN par excision de bases) par Comet assay est également à envisager.

Enfin, la mise au point du protocole de Comet assay dans les feuilles pourrait permettre de mesurer la génotoxicité du plomb dans ces organes ;

- *Rôle du GSH et des PC* : pour mieux appréhender l'implication du GSH dans les premières heures d'exposition au plomb, l'utilisation d'inhibiteurs de sa synthèse, comme le buthionine sulfoximine (BSO) serait intéressante. Elle pourrait permettre de déceler des différences significatives dans la sensibilité au plomb entre les plantes traitées au plomb et celles co-traitées avec le BSO.

L'analyse de la concentration des PC dans les sèves brutes et élaborées pourrait permettre de comprendre le mécanisme d'accumulation rapide des PC observé dans les feuilles.

De façon plus générale, au cours de ces travaux de thèse, se sont présentées à plusieurs reprises des limites quant à l'utilisation du modèle *Vicia faba*. La principale est l'absence presque totale d'outil moléculaire disponible et de mutant. Si l'approche « tout mutant » est aussi discutable que l'approche « tout pharmacologique », la combinaison des deux offre des perspectives intéressantes. Faut-il alors passer à l'étude d'autres plantes ? Dans l'optique de continuer à évaluer les effets du plomb sur plantes entières, le passage à des modèles, tels que *Arabidopsis thaliana* ou *Medicago truncatula*, ne semble pas forcément intéressant. Ces plantes développent peu de biomasse, ce qui représente une contrainte importante dans l'étude de certains marqueurs de stress. De plus, la taille réduite de leurs feuilles et la finesse de leurs racines rendent très difficile l'utilisation de techniques comme le test des MN ou le Comet assay.

L'utilisation de tabac pourrait être intéressante, mais cette plante semble tolérante aux métaux lourds. L'emploi de la tomate pourrait être la perspective la plus prometteuse, car de nombreux mutants sont disponibles, et le laboratoire possède une certaine expertise dans cette plante et à sa réponse à des stress tels que l'anoxie ou la déficience en calcium (Allegre *et al.*, 2004; Morard *et al.*, 2004; Baboulene *et al.*, 2007).

En conclusion, bien que le modèle *Vicia faba* possède de nombreux avantages (croissance rapide, biomasse importante, taille cellulaire importante, sensibilité aux métaux), son avenir au laboratoire est en partie conditionné au développement d'outils moléculaires chez cette plante.

Références bibliographiques

A

- ADEME (2006). "Bilan du recyclage 1996-2005 Partie 1 Synthèse générale et analyse par filière Rapport final."
- Aebi H (1984). "Catalase in vitro." *Methods in Enzymology* 105: 121-126.
- AFNOR (2004). T90-327 AN "Evaluation des effets génotoxiques sur végétaux supérieurs: évaluation de la fréquence d'apparition de micronoyaux dans les racines secondaires de *Vicia faba*." AFNOR, Paris: p. 13
- Aina R, M Labra, P Fumagalli, C Vannini, M Marsoni, U Cucchi, M Bracale, S Sgorbati and S Citterio (2007). "Thiol-peptide level and proteomic changes in response to cadmium toxicity in *Oryza sativa* L. roots." *Environmental and Experimental Botany* 59(3): 381-392.
- Allegre A, J Silvestre, P Morard, J Kallerhoff and E Pinelli (2004). "Nitrate reductase regulation in tomato roots by exogenous nitrate: a possible role in tolerance to long-term root anoxia." *Journal of Experimental Botany* 55(408): 2625-2634.
- Alloway BJ (1995). "Heavy metals in soils." Blackie Academic & Professional, London, 2nd Edition, 368 pp
- Almeras E, S Stolz, S Vollenweider, P Reymond, L Mene-Safrane and EE Farmer (2003). "Reactive electrophile species activate defense gene expression in *Arabidopsis*." *The Plant Journal* 34(2): 205-216.
- Alscher RG, N Erturk and LS Heath (2002). "Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants." *Journal of Experimental Botany* 53(372): 1331-1341.
- Amicucci E, K Gaschler and JM Ward (1999). "NADPH Oxidase Genes from Tomato (*Lycopersicon esculentum*) and Curly-Leaf Pondweed (*Potamogeton crispus*)." *Plant Biology* 1(5): 524-528.
- An Y-J (2006). "Assessment of comparative toxicities of lead and copper using plant assay." *Chemosphere* 62(8): 1359-1365.
- Angelini R, F Manes and R Federico (1990). "Spatial and functional correlation between diamine-oxidase and peroxidase activities and their dependence upon de-etiolation and wounding in chick-pea stems." *Planta* 182(1): 89-96.
- Antosiewicz DM (2005). "Study of calcium-dependent lead-tolerance on plants differing in their level of Ca-deficiency tolerance." *Environmental Pollution* 134(1): 23-34.
- Apel K and H Hirt (2004). "Reactive oxygen species: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction." *Annual Review of Plant Biology* 55(1): 373-399.
- Arasimowicz M and J Floryszak-Wieczorek (2007). "Nitric oxide as a bioactive signalling molecule in plant stress responses." *Plant Science* 172(5): 876-887.

Références bibliographiques

- Arazi T, R Sunkar, B Kaplan and H Fromm (1999). "A tobacco plasma membrane calmodulin-binding transporter confers Ni²⁺ tolerance and Pb²⁺ hypersensitivity in transgenic plants." *The Plant Journal* 20: 171-182.
- Ariès S (2001). "Mise en évidence de contaminations métalliques historiques à partir de l'étude d'enregistrements sédimentaires de lacs de haute montagne. " Thèse de doctorat, Université de Toulouse III. 276 pp.
- Arnaud F (2003). "Signatures climatique et anthropique dans les sédiments holocènes des lacs du Bourget et d'Anserre (Nord-Ouest des Alpes) - Paléohydrologie et contamination au plomb " Thèse doctorat de l'université des Sciences et Techniques de Lille 1 – 195 pp
- Arora A, R Sairam and G Srivastava (2002). "Oxidative stress and antioxidative system in plants." *Current Science* 82(10): 1227-1238.
- Arshad M, J Silvestre, E Pinelli, J Kallerhoff, M Kaemmerer, A Tarigo, M Shahid, M Guiresse, P Pradere and C Dumat (2008). "A field study of lead phytoextraction by various scented *Pelargonium* cultivars." *Chemosphere* 71(11): 2187-2192.
- Asada K (1994). Production and action of active oxygen species in photosynthetic tissues. Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defence Systems in Plants. C. H. Foyer and P. M. Mullineaux. Boca Raton, CRC Press: 77-104.
- Asada K (1999). "The water-water cycle in chloroplasts: Scavenging of Active Oxygens and Dissipation of Excess Photons." *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50(1): 601-639.
- Asada K (2000). "The water–water cycle as alternative photon and electron sinks." *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 355(1402): 1419-1431.
- Asada K (2006). "Production and Scavenging of Reactive Oxygen Species in Chloroplasts and Their Functions." *Plant Physiology* 141(2): 391-396.
- Asada K, K Kiso and K Yoshikawa (1974). "Univalent Reduction of Molecular Oxygen by Spinach Chloroplasts on Illumination." *Journal of Biological Chemistry* 249(7): 2175-2181.
- Atici, Ouml, G Aar and P Battal (2005). "Changes in phytohormone contents in chickpea seeds germinating under lead or zinc stress." *Biologia Plantarum* 49: 215-222.
- Aub JC, LT Fairhall, AS Minot and P Reznikoff (1926). Lead poisoning. *Medicine Monographs*. Baltimore, MD, The Williams and Wilkins Co. 7.
- Aziz A, J Martin-Tanguy and F Larher (1997). "Plasticity of polyamine metabolism associated with high osmotic stress in rape leaf discs and with ethylene treatment." *Plant Growth Regulation* 21(2): 153-163.
- Aziz A, J Martin-Tanguy and F Larher (1998). "Stress-induced changes in polyamine and tyramine levels can regulate proline accumulation in tomato leaf discs treated with sodium chloride." *Physiologia Plantarum* 104(2): 195-202.

Azzam EI, SM de Toledo, DR Spitz and JB Little (2002). "Oxidative Metabolism Modulates Signal Transduction and Micronucleus Formation in Bystander Cells from {alpha}-Particle-irradiated Normal Human Fibroblast Cultures." *Cancer Research* 62(19): 5436-5442.

B

Baboulene L, J Silvestre, E Pinelli and P Morard (2007). "Effect of Ca deficiency on growth and leaf acid soluble proteins of tomato." *Journal of Plant Nutrition* 30(4-6): 497-515.

Baier M and K-J Dietz (1997). "The plant 2-Cys peroxiredoxin BAS1 is a nuclear-encoded chloroplast protein: its expressional regulation, phylogenetic origin, and implications for its specific physiological function in plants." *The Plant Journal* 12(1): 179-190.

Baize D (1997). "Teneurs totales en éléments traces métalliques dans les sols (France)." INRA Editions, Paris, 408 pp.

Baker A, IA Graham, M Holdsworth, SM Smith and FL Theodoulou (2006). "Chewing the fat: β -oxidation in signalling and development." *Trends in Plant Science* 11(3): 124-132.

Barcelo AR (1998). "Hydrogen Peroxide Production is a General Property of the Lignifying Xylem from Vascular Plants." *Annals of Botany* 82(1): 97-103.

Barcelo J and C Poschenrieder (1990). "Plant water relations as affected by heavy metal stress: A review." *Journal of Plant Nutrition* ; Vol/Issue: 13:1: Pages: 1-37.

Bartosz G (1997). "Oxidative stress in plants." *Acta Physiologiae Plantarum* 19(1): 47-64.

Bazzaz FA, RW Carlson and GL Rolfe (1975). "Inhibition of Corn and Sunflower Photosynthesis by Lead." *Physiologia Plantarum* 34(4): 326-329.

Becana M, FJ Paris, LM Sandalio and LA Del Rio (1989). "Isoenzymes of Superoxide Dismutase in Nodules of *Phaseolus vulgaris* L., *Pisum sativum* L., and *Vigna unguiculata* (L.) Walp." *Plant Physiology* 90(4): 1286-1292.

Beckman JS and WH Koppenol (1996). "Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly." *Am J Physiol Cell Physiol* 271(5): C1424-1437.

Beckman KB and BN Ames (1997). "Oxidative Decay of DNA." *J. Biol. Chem.* 272(32): 19633-19636.

Beltagi MS (2005). "Phytotoxicity of lead (Pb) to SDS-PAGE protein profile in root nodules of faba bean (*Vicia faba* L.) plants." *Pakistan Journal of Biological Sciences* 8(5): 687-690.

Beraud E, S Cotelle, P Leroy and J-F Ferard (2007). "Genotoxic effects and induction of phytochelatins in the presence of cadmium in *Vicia faba* roots." *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 633(2): 112-116.

- Berna A and F Bernier (1999). "Regulation by biotic and abiotic stress of a wheat germin gene encoding oxalate oxidase, a H₂O₂-producing enzyme." *Plant Molecular Biology* 39(3): 539-549.
- Bernards MA, WD Fleming, DB Llewellyn, R Priefer, X Yang, A Sabatino and GL Plourde (1999). "Biochemical Characterization of the Suberization-Associated Anionic Peroxidase of Potato." *Plant Physiology* 121(1): 135-146.
- Bernier F and A Berna (2001). "Germins and germin-like proteins: Plant do-all proteins. But what do they do exactly?" *Plant Physiology and Biochemistry* 39(7-8): 545-554.
- Bispo A, I Feix, C Schwarz, G Seré, JL Morel, AM Charissou, MJ Jourdain, L Gauthier, D Cluzeau and F Ablain (sous presse). Ecotoxicological assessment of wastes and biowastes with regards to agricultural uses : towards an integrated procedure for predictive risk assessment for ecosystems.
- Bittell JE, DE Koeppe and RJ Miller (1974). "Sorption of Heavy Metal Cations by Corn Mitochondria and the Effects on Electron and Energy Transfer Reactions." *Physiologia Plantarum* 30(3): 226-230.
- Blechert S, W Brodschelm, S Holder, L Kammerer, TM Kutchan, MJ Mueller, Z Xia and MH Zenk (1995). "The Octadecanoic Pathway: Signal Molecules for the Regulation of Secondary Pathways." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92(10): 4099-4105.
- Blee E (2002). "Impact of phyto-oxylipins in plant defense." *Trends in Plant Science* 7(7): 315-322.
- Blokhina O, E Virolainen and KV Fagerstedt (2003). "Antioxidants, Oxidative Damage and Oxygen Deprivation Stress: a Review." *Annals of Botany* 91(2): 179-194.
- Bokoch GM (1994). "Regulation of the human neutrophil NADPH oxidase by the Rac GTP-binding proteins." *Current Opinion in Cell Biology* 6(2): 212-218.
- Bolwell GP, LV Bindschedler, KA Blee, VS Butt, DR Davies, SL Gardner, C Gerrish and F Minibayeva (2002). "The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a three-component system." *Journal of Experimental Botany* 53(372): 1367-1376.
- Bolwell GP and P Wojtaszek (1997). "Mechanisms for the generation of reactive oxygen species in plant defence - a broad perspective." *Physiological and Molecular Plant Pathology* 51(6): 347-366.
- Bourelrier P and J Berthelin (1998). "Contamination des sols par les éléments traces : les risques et leur gestion." *Rapport de l'Académie des sciences Ed. Lavoisier, Paris.* 42 pp
- Boveris A and B Chance (1973). "The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen." *Biochemical Journal* 134(3): 707-716.
- Bowler C, W Van Camp, M Van Montagu and D Inze (1994). "Superoxide Dismutase in Plants." *Critical Reviews in Plant Sciences* 13(3): 199 - 199.

- Bradford MM (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Analytical Biochemistry* 72(1-2): 248-254.
- Bramley P, I Elmadfa, A Kafatos, F Kelly, Y Manios, H Roxborough, W Schuch, P Sheehy and K Wagner (2000). "Vitamin E." *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80(7): 913-938.
- Brash AR (1999). "Lipoxygenases: Occurrence, Functions, Catalysis, and Acquisition of Substrate." *J. Biol. Chem.* 274(34): 23679-23682.
- Breckle SW and H Kahle (1992). "Effects of toxic heavy metals (Cd, Pb) on growth and mineral nutrition of beech (*Fagus sylvatica* L.)." *Plant Ecology* 101(1): 43-53.
- BRGM (2004). "Guide méthodologique du plomb appliqué à la gestion des sites et des sols pollués. Rapport final, BRGM/RP-52881-FR."
- Briat J-F and M Lebrun (1999). "Plant responses to metal toxicity." *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series III - Sciences de la Vie* 322(1): 43-54.
- Burzynski M (1987). "The Influence of Lead and Cadmium on the Absorption and Distribution of Potassium, Calcium, Magnesium and Iron in Cucumber Seedlings." *Acta Physiologiae Plantarum* 9: 229-238.
- Burzynski M and A Grabowski (1984). "Influence of lead on nitrate uptake and reduction in cucumber seedlings." *Acta societatis botanicorum Poloniae* 53: 77-86.
- Bush DS (1995). "Calcium Regulation in Plant Cells and its Role in Signaling." *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 46(1): 95-122.

C

- Caliskan M and AC Cuming (1998). "Spatial specificity of H₂O₂-generating oxalate oxidase gene expression during wheat embryo germination." *The Plant Journal* 15(2): 165-171.
- Cecchi M (2008). "Devenir du plomb dans le système Sol-Plante: Cas d'un sol contaminé par une usine de recyclage du plomb et de deux plantes potagères (Fève et Tomate)." Thèse de doctorat, Institut National Polytechnique de Toulouse.
- Cervelli M, OD Caro, AD Penta, R Angelini, R Federico, A Vitale and P Mariottini (2004). "A novel C-terminal sequence from barley polyamine oxidase is a vacuolar sorting signal." *The Plant Journal* 40(3): 410-418.
- Chehab EW, JV Perea, B Gopalan, S Theg and K Dehesh (2007). "Oxylipin Pathway in Rice and *Arabidopsis*." *Journal of Integrative Plant Biology* 49: 43-51.

Références bibliographiques

- Chen A, EA Komives and JI Schroeder (2006). "An Improved Grafting Technique for Mature *Arabidopsis* Plants Demonstrates Long-Distance Shoot-to-Root Transport of Phytochelatins in *Arabidopsis*." *Plant Physiology* 141(1): 108-120.
- Chen J, C Zhu, L-p Li, Z-y Sun and X-b Pan (2007). "Effects of exogenous salicylic acid on growth and H₂O₂-metabolizing enzymes in rice seedlings under lead stress." *Journal of Environmental Sciences* 19(1): 44-49.
- Chen Z and DR Gallie (2004). "The Ascorbic Acid Redox State Controls Guard Cell Signaling and Stomatal Movement." *Plant Cell* 16(5): 1143-1162.
- Choudhury S and SK Panda (2004). "Induction of oxidative stress and ultrastructural changes in moss *Taxithelium nepalense* (Schwaegr.) Broth. under lead and arsenic phytotoxicity. ." *Current Science* 87(3): 342-348.
- Chung H, B Baek, S Song, M Kim, J Huh, K Shim, K Kim and K Lee (1997). "Xanthine dehydrogenase/xanthine oxidase and oxidative stress." *AGE* 20(3): 127-140.
- Cillard J and P Cillard (2006). "Mécanismes de la peroxydation lipidique et des anti-oxydations." *Oléagineux, Corps Gras, Lipides*. 13(1): 24-29.
- CITEPA (2007). "Inventaire des émissions de polluants en France au titre de la convention sur la pollution atmosphérique transfrontalière à longue distance et de la directive européenne relative aux plafonds d'émissions nationaux (NEC)."
- Cleland RE and SC Grace (1999). "Voltammetric detection of superoxide production by photosystem II." *FEBS Letters* 457(3): 348-352.
- Clemens S (2006a). "Evolution and function of phytochelatin synthases." *Journal of Plant Physiology* 163(3): 319-332.
- Clemens S (2006b). "Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants." *Biochimie* 88(11): 1707-1719.
- Clemens S, MG Palmgren and U Kramer (2002). "A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation." *Trends in Plant Science* 7(7): 309-315.
- Cobb G, K Sands, M Waters, B Wixson and E Dorward-King (2000). "Accumulation of heavy metals by vegetables grown in mine wastes." *Environmental Toxicology and Chemistry* 19(3): 600-607.
- Cobbett C and P Goldsbrough (2002). "Phytochelatins and metallothioneins: Roles in Heavy Metal Detoxification and Homeostasis." *Annual Review of Plant Biology* 53(1): 159-182.
- Cobbett CS (2000). "Phytochelatin biosynthesis and function in heavy-metal detoxification." *Current Opinion in Plant Biology* 3(3): 211-216.
- Colangelo EP and ML Guerinot (2006). "Put the metal to the petal: metal uptake and transport throughout plants." *Current Opinion in Plant Biology* 9(3): 322-330.

Références bibliographiques

- Collin VC, F Eymery, B Genty, P Rey and M Havaux (2008). "Vitamin E is essential for the tolerance of *Arabidopsis thaliana* to metal-induced oxidative stress." *Plant, Cell and Environment* 31(2): 244-257.
- Cona A, S Moreno, F Cenci, R Federico and R Angelini (2005). "Cellular re-distribution of flavin-containing polyamine oxidase in differentiating root and mesocotyl of *Zea mays* L. seedlings." *Planta* 221(2): 265-276.
- Cona A, G Rea, R Angelini, R Federico and P Tavladoraki (2006). "Functions of amine oxidases in plant development and defence." *Trends in Plant Science* 11(2): 80-88.
- Corpas FJ, JB Barroso and LA del Río (2001). "Peroxisomes as a source of reactive oxygen species and nitric oxide signal molecules in plant cells." *Trends in Plant Science* 6(4): 145-150.
- Corpas FJ, C De la Colina, F Sanchez-Rasero and LA Del Rio (1997). "A role for leaf peroxisomes in the catabolism of purines." *Journal of Plant Physiology* 151(2): 246-250.
- Corpas FJ, M Gomez, JA Hernandez and LA Del Rio (1991). "Metabolism of activated oxygen in peroxisomes from two *Pisum sativum* L. cultivars with different sensitivity to sodium chloride." *Journal of Plant Physiology* 141(2,): 160-165.
- Corpas FJ, LM Sandalio, LA Del Rio and RN Trelease (1998). "Copper-zinc superoxide dismutase is a constituent enzyme of the matrix of peroxisomes in the cotyledons of oilseed plants." *New Phytologist* 138(2): 307-314.
- Courbot M, L Diez, R Ruotolo, M Chalot and P Leroy (2004). "Cadmium-Responsive Thiols in the Ectomycorrhizal Fungus *Paxillus involutus*." *Applied Environmental Microbiology* 70(12): 7413-7417.
- Crawford NM and F-Q Guo (2005). "New insights into nitric oxide metabolism and regulatory functions." *Trends in Plant Science* 10(4): 195-200.
- Creelman RA and R Mulpuri (2002). "The Oxylipin Pathway in *Arabidopsis*." *The Arabidopsis Book*.
- Croteau DL and VA Bohr (1997). "Repair of Oxidative Damage to Nuclear and Mitochondrial DNA in Mammalian Cells." *Journal of Biological Chemistry* 272(41): 25409-25412.
- Cseh E, F Fodor, A Varga and G Zaray (2000). "Effect of lead treatment on the distribution of essential elements in cucumber." *Journal of Plant Nutrition* 23(8): 1095-1105.
- Dalenberg JW and W Van Driel (1990). "Contribution of atmospheric deposition to heavy-metal concentrations in field crops." *Netherlands journal of agricultural science* 38: 369-379.

D

- Dat J, S Vandenabeele, E Vranová, M Van Montagu, D Inzé and F Van Breusegem (2000). "Dual action of the active oxygen species during plant stress responses." *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)* 57(5): 779-795.
- del Río LA, GM Pastori, JM Palma, LM Sandalio, F Sevilla, FJ Corpas, A Jimenez, E Lopez-Huertas and JA Hernandez (1998). "The Activated Oxygen Role of Peroxisomes in Senescence." *Plant Physiology* 116(4): 1195-1200.
- del Río LA, LM Sandalio, DA Altomare and BA Zilinskas (2003). "Mitochondrial and peroxisomal manganese superoxide dismutase: differential expression during leaf senescence." *Journal of Experimental Botany* 54(384): 923-933.
- del Río LA, LM Sandalio, J Palma, P Bueno and FJ Corpas (1992). "Metabolism of oxygen radicals in peroxisomes and cellular implications." *Free Radical Biology and Medicine* 13(5): 557-580.
- Delledonne M (2005). "NO news is good news for plants." *Current Opinion in Plant Biology* 8(4): 390-396.
- Demidchik V, SN Shabala, KB Coutts, MA Tester and JM Davies (2003). "Free oxygen radicals regulate plasma membrane Ca^{2+} - and K^{+} -permeable channels in plant root cells." *Journal of Cell Sciences* 116(1): 81-88.
- Demiral T and I Turkan (2005). "Comparative lipid peroxidation, antioxidant defense systems and proline content in roots of two rice cultivars differing in salt tolerance." *Environmental and Experimental Botany* 53(3): 247-257.
- Demmig-Adams B and WW Adams (1996). "The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis." *Trends in Plant Science* 1(1): 21-26.
- Desikan R, M-K Cheung, J Bright, D Henson, JT Hancock and SJ Neill (2004). "ABA, hydrogen peroxide and nitric oxide signalling in stomatal guard cells." *Journal of Experimental Botany* 55(395): 205-212.
- Desikan R, JT Hancock, MJ Coffey and SJ Neill (1996). "Generation of active oxygen in elicited cells of *Arabidopsis thaliana* is mediated by a NADPH oxidase-like enzyme." *FEBS Letters* 382(1-2): 213-217.
- Deutsch JC (1997). "Ascorbic Acid and Dehydroascorbic Acid Interconversion without Net Oxidation or Reduction." *Analytical Biochemistry* 247(1): 58-62.
- Deutsch JC (2000). "Dehydroascorbic acid." *Journal of Chromatography A* 881(1-2): 299-307.
- Dey SK, J Dey, S Patra and D Pothal (2007). "Changes in the antioxidative enzyme activities and lipid peroxidation in wheat seedlings exposed to cadmium and lead stress." *Brazilian Journal of Plant Physiology* 19: 53-60.

- Diaz-Vivancos P, M Rubio, V Mesonero, PM Periago, A Ros Barcelo, P Martinez-Gomez and JA Hernandez (2006). "The apoplastic antioxidant system in *Prunus*: response to long-term plum pox virus infection." *Journal of Experimental Botany* 57(14): 3813-3824.
- Dietz K-J (2007). The Dual Function of Plant Peroxiredoxins in Antioxidant Defence and Redox Signaling. *Peroxiredoxin Systems*: 267-294.
- Dietz K-J, S Jacob, M-L Oelze, M Laxa, V Tognetti, SMN de Miranda, M Baier and I Finkemeier (2006). "The function of peroxiredoxins in plant organelle redox metabolism." *Journal of Experimental Botany* 57(8): 1697-1709.
- Drazkiewicz M (1994). "Chlorophyll-occurrence, functions, mechanism of action, effects of internal and external factors." *Photosynthetica* 30: 321-331.
- Dringen R and J Gutterer (2002). "Glutathione reductase from bovine brain." *Methods in Enzymology*. 348: 281-2888.
- Droillard M-J and A Paulin (1990). "Isozymes of Superoxide Dismutase in Mitochondria and Peroxisomes Isolated from Petals of Carnation (*Dianthus caryophyllus*) during Senescence." *Plant Physiology* 94(3): 1187-1192.
- Dubbin WE and E Louise Ander (2003). "Influence of microbial hydroxamate siderophores on Pb(II) desorption from α -FeOOH." *Applied Geochemistry* 18(11): 1751-1756.
- Duke MV and ML Salin (1983). "Isoenzymes of cuprozinc superoxide dismutase from *Pisum sativum*." *Phytochemistry* 22(11): 2369-2373.
- Dumas B, G Freyssinet and KE Pallett (1995). "Tissue-Specific Expression of Germin-Like Oxalate Oxidase during Development and Fungal Infection of Barley Seedlings." *Plant Physiology* 107(4): 1091-1096.
- Duroux L and K Welinder (2003). "The Peroxidase Gene Family in Plants: A Phylogenetic Overview." *Journal of Molecular Evolution* 57(4): 397-407.

E

- Edreva A (2005). "Generation and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts: a submolecular approach." *Agriculture, Ecosystems and Environment* 106(2-3): 119-133.
- Eilers T, G Schwarz, H Brinkmann, C Witt, T Richter, J Nieder, B Koch, R Hille, R Hansch and RR Mendel (2001). "Identification and Biochemical Characterization of *Arabidopsis thaliana* Sulfite Oxidase. A new player in plant sulfur metabolism." *Journal of Biological Chemistry* 276(50): 46989-46994.

- El Hajjouji H, E Pinelli, M Guiresse, G Merlina, JC Revel and M Hafidi (2007). "Assessment of the genotoxicity of olive mill waste water (OMWW) with the *Vicia faba* micronucleus test." *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 634(1-2): 25-31.
- Ercal N, H Gurer-Orhan and N Aykin-Burns (2001). "Toxic Metals and Oxidative Stress Part I: Mechanisms Involved in Metal-induced Oxidative Damage." *Current Topics in Medicinal Chemistry* 1: 529-539.
- Ernst WHO (1998). *Effects of heavy metals in plants at the cellular and organismic level. Ecotoxicology*. G. Schuurman and B. Markert, J Wiley and Sons Inc and Spektrum Akademischer Verlag: 587-620.
- Eun SO, H Shik Youn and Y Lee (2000). "Lead disturbs microtubule organization in the root meristem of *Zea mays*." *Physiologia Plantarum* 110: 357-365.

F

- Fang TK, RP Donaldson and EL Vigil (1987). "Electron transport in purified glyoxysomal membranes from castor-bean endosperm." *Planta* 172(1): 1-13.
- Farmer EE, E Almeras and V Krishnamurthy (2003). "Jasmonates and related oxylipins in plant responses to pathogenesis and herbivory." *Current Opinion in Plant Biology* 6(4): 372-378.
- Favier A (2003). "Le stress oxydant." *L'Actualité chimique* Nov-déc: 108-115.
- Federico R and R Angelini (1991). Polyamine catabolism in plants. *Biochemistry and Physiology of Polyamines in Plants*. R. D. Slocum and H. E. Flores, CRC Press: 41-56.
- Fedoroff N (2006). "Redox Regulatory Mechanisms in Cellular Stress Responses." *Annals of Botany* 98(2): 289-300.
- Foerster E, T Fahrenkemper, U Rabe, P Graf and H Sies (1981). "Peroxisomal fatty acid oxidation as detected by H₂O₂ production in intact perfused rat liver." *Biochemistry Journal* 196(3): 705-712.
- Foote C, J Valentine, A Greenberg and J Liebman (1985). *Active Oxygen in Chemistry*. New York, Chapman and Hall.
- Foy CD, RL Chaney and MC White (1978). "The Physiology of Metal Toxicity in Plants." *Annual Review of Plant Physiology* 29(1): 511-566.
- Foyer C (2007). "Redox metabolism in plants and its role in programmed cell death and senescence." *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology* 146(4, Supplement 1): S53.
- Foyer CH, M Lelandais and KJ Kunert (1994). "Photooxidative stress in plants." *Physiologia Plantarum* 92(4): 696-717.

- Foyer CH and G Noctor (2000). "Tansley Review No. 112. Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signalling." *New Phytologist* 146(3): 359-388.
- Foyer CH and G Noctor (2003). "Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria." *Physiologia Plantarum* 119: 355-364.
- Foyer CH and G Noctor (2005a). "Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context." *Plant, Cell and Environment* 28: 1056-1071.
- Foyer CH and G Noctor (2005b). "Redox Homeostasis and Antioxidant Signaling: A Metabolic Interface between Stress Perception and Physiological Responses." *Plant Cell* 17(7): 1866-1875.
- Foyer CH, FL Theodoulou and S Delrot (2001). "The functions of inter- and intracellular glutathione transport systems in plants." *Trends in Plant Science* 6(10): 486-492.
- Fracasso ME, L Perbellini, S Solda, G Talamini and P Franceschetti (2002). "Lead induced DNA strand breaks in lymphocytes of exposed workers: role of reactive oxygen species and protein kinase C." *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 515(1-2): 159-169.
- Frahry G and P Schopfer (2001). "NADH-stimulated, cyanide-resistant superoxide production in maize coleoptiles analyzed with a tetrazolium-based assay." *Planta* 212(2): 175-183.
- Fraisse L (1993). "Etude du rôle des mitochondries dans la production d'espèces oxygénées réactives en situation de stress oxydatif. Mise au point et propriétés de nouveaux composés protecteurs des membranes biologiques contre la peroxydation lipidique." INSA Toulouse, INSAT: 155 pp
- Fryer MJ (1992). "The antioxidant effects of thylakoid Vitamin E (alpha-tocopherol)." *Plant, Cell and Environment* 15(4): 381-392.

G

- Galaris D and A Evangelou (2002). "The role of oxidative stress in mechanisms of metal-induced carcinogenesis." *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 42(1): 93-103.
- Garcia JS, PL Gratao, RA Azevedo and MAZ Arruda (2006). "Metal Contamination Effects on Sunflower (*Helianthus annuus* L.) Growth and Protein Expression in Leaves During Development." *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 54(22): 8623-8630.
- Garland C and D Wilkins (1981). "Effect of Calcium on the Uptake and Toxicity of Lead in *Hordeum vulgare* L. and *Festuca ovina* L." *New Phytologist* 87(3): 581-593.

- Garnier L, F Simon-Plas, Oise, P Thuleau, J-P Agnel, J-P Blein, R Ranjeva and J-L Montillet (2006). "Cadmium affects tobacco cells by a series of three waves of reactive oxygen species that contribute to cytotoxicity." *Plant, Cell and Environment* 29: 1956-1969.
- Gastaldo J, M Viau, Z Bencokova, A Joubert, A-M Charvet, J Balosso and N Foray (2007). "Lead contamination results in late and slowly repairable DNA double-strand breaks and impacts upon the ATM-dependent signaling pathways." *Toxicology Letters* 173(3): 201-214.
- Gay C, J Collins and JM Gebicki (1999). "Hydroperoxide Assay with the Ferric-Xylenol Orange Complex." *Analytical Biochemistry* 273: 149-155.
- Geebelen W, J Vangronsveld, DC Adriano, LC Van Poucke and H Clijsters (2002). "Effects of Pb-EDTA and EDTA on oxidative stress reactions and mineral uptake in *Phaseolus vulgaris*." *Physiologia Plantarum* 115: 377-384.
- Gerritse RG and W van Driel (1984). "The Relationship Between Adsorption of Trace Metals, Organic Matter, and pH in Temperate Soils." *Journal of Environmental Quality* 13(2): 197-204.
- Giannopolitis CN and SK Ries (1977). "Superoxide Dismutases: I. Occurrence in Higher Plants." *Plant Physiology* 59(2): 309-314.
- Gichner T (2003). "Differential genotoxicity of ethyl methanesulphonate, N-ethyl-N-nitrosourea and maleic hydrazide in tobacco seedlings based on data of the Comet assay and two recombination assays." *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 538(1-2): 171-179.
- Gichner T (Données non publiées). "Comet assay in higher plants."
- Gichner T, Z Patkova, J Szakova and K Demnerova (2004). "Cadmium induces DNA damage in tobacco roots, but no DNA damage, somatic mutations or homologous recombination in tobacco leaves." *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 559(1-2): 49-57.
- Glater RAB and L Hernandez, Jr. (1972). "Lead detection in living plant tissue using a new histochemical method." *J. Air Pollut. Control Assoc. ; Vol/Issue: 22:6: Pages: 463-467.*
- Glinski J and J Lipiec (1990). *Soil physical conditions and plant roots*. Boca Raton (FL), CRC Press.
- Gobat JM, M Aragno and W Matthey (1998). *Le sol vivant. Bases de pédologie, biologie des sols*, Presses polytechniques et universitaires romandes.
- Godzik B (1993). "Heavy metal contents in plants from zinc dumps and reference area." *Polish Botanical Studies* 5: 113-132.
- Gong J-M, DA Lee and JI Schroeder (2003). "Long-distance root-to-shoot transport of phytochelatin and cadmium in *Arabidopsis*." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100(17): 10118-10123.
- Gopal R and AH Rizvi (2008). "Excess lead alters growth, metabolism and translocation of certain nutrients in radish." *Chemosphere* 70(9): 1539-1544.

Références bibliographiques

- Goyer A, TL Johnson, LJ Olsen, E Collakova, Y Shachar-Hill, D Rhodes and AD Hanson (2004). "Characterization and Metabolic Function of a Peroxisomal Sarcosine and Pipecolate Oxidase from *Arabidopsis*." *Journal of Biological Chemistry* 279(17): 16947-16953.
- Griffiths G, M Leverentz, H Silkowski, N Gill and JJ Sanchez-Serrano (2000). "Lipid hydroperoxide levels in plant tissues." *Journal of Experimental Botany* 51(349): 1363-1370.
- Grill E, S Loffler, E-L Winnacker and MH Zenk (1989). "Phytochelatin, the Heavy-Metal-Binding Peptides of Plants, are Synthesized from Glutathione by a Specific gamma -glutamylcysteine Dipeptidyl Transpeptidase (Phytochelatin Synthase)." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 86(18): 6838-6842.
- Grollman AP and M Moriya (1993). "Mutagenesis by 8-oxoguanine: an enemy within." *Trends in Genetics* 9(7): 246-249.
- Groppa MD, MP Ianuzzo, ML Tomaro and MP Benavides (2007). "Polyamine metabolism in sunflower plants under long-term cadmium or copper stress." *Amino Acids* 32: 265-275.
- Gupta M, UN Rai, RD Tripathi and P Chandra (1995). "Lead induced changes in glutathione and phytochelatin in *Hydrilla verticillata* (l. f.) Royle." *Chemosphere* 30(10): 2011-2020.
- Gyuris J, E Golemis, H Chertkov and R Brent (1993). "Cdi1, a human G1 and S phase protein phosphatase that associates with Cdk2." *Cell* 75(4): 791-803.

H

- Habermann E, K Crowell and P Janicki (1983). "Lead and other metals can substitute for Ca^{2+} in calmodulin." *Archives of Toxicology* 54(1): 61-70.
- Hall JL (2002). "Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance." *Journal of Experimental Botany* 53(366): 1-11.
- Hall JL and LE Williams (2003). "Transition metal transporters in plants." *Journal of Experimental Botany* 54(393): 2601-2613.
- Halliwell B (1992). "Reactive oxygen species and the central nervous system." *Journal of Neurochemistry* 59(5): 1609-23.
- Halliwell B (2006). "Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life." *Plant Physiology* 141(2): 312-322.
- Halliwell B and J Gutteridge (1989). *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford, Clarendon Press: 188-275.
- Halliwell B and J Gutteridge (1999). *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford, Clarendon Press: 188-275.

- Halliwell B and M Whiteman (2004). "Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?" *Brazilian Journal of Pharmacology* 142(2): 231-255.
- Hammett FS (1928). "Studies in the biology of metals." *Protoplasma* 5(1): 535-542.
- Hansch R, C Lang, E Riebeseel, R Lindigkeit, A Gessler, H Rennenberg and RR Mendel (2006). "Plant Sulfite Oxidase as Novel Producer of H₂O₂: Combination of enzyme catalysis with a subsequent non-enzymatic reaction step " *Journal of Biological Chemistry* 281(10): 6884-6888.
- Hansen H and K Dorffling (1999). "Changes of free and conjugated abscisic acid and phaseic acid in xylem sap of drought-stressed sunflower plants." *Journal of Experimental Botany* 50(339): 1599-1605.
- Hao F, X Wang and J Chen (2006). "Involvement of plasma-membrane NADPH oxidase in nickel-induced oxidative stress in roots of wheat seedlings." *Plant Science* 170(1): 151-158.
- Hao F, J Zhang, Z Yu and J Chen (2008). "Involvement of NADPH oxidase NtrbohD in the rapid production of H₂O₂ induced by ABA in cultured tobacco cell line BY-2." *Progress in Natural Science* 18(3): 267-271.
- Harmon AC, M Gribskov and JF Harper (2000). "CDPKs - a kinase for every Ca²⁺ signal?" *Trends in Plant Science* 5(4): 154-159.
- Hartmann A, E Agurell, C Beevers, S Brendler-Schwaab, B Burlinson, P Clay, A Collins, A Smith, G Speit, V Thybaud and RR Tice (2003). "Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay." *Mutagenesis* 18(1): 45-51.
- Hartmann A, A Elhajouji, E Kiskinis, F Poetter, HJ Martus, A Fjällman, W Frieauff and W Suter (2001). "Use of the alkaline comet assay for industrial genotoxicity screening: comparative investigation with the micronucleus test." *Food and Chemical Toxicology* 39(8): 843-858.
- Havaux M, F Eymery, S Porfirova, P Rey and P Dormann (2005). "Vitamin E Protects against Photoinhibition and Photooxidative Stress in *Arabidopsis thaliana*." *Plant Cell* 17(12): 3451-3469.
- Heber U, C Miyake, J Mano, C Ohno and K Asada (1996). "Monodehydroascorbate Radical Detected by Electron Paramagnetic Resonance Spectrometry Is a Sensitive Probe of Oxidative Stress in Intact Leaves." *Plant Cell and Physiology* 37(8): 1066-1072.
- Hemeda HM and BP Klein (1990). "Effects of Naturally Occurring Antioxidants on Peroxidase Activity of Vegetable Extracts." *Journal of Food Science* 55(1): 184-185.
- Hernandez JA, A Campillo, A Jimenez, JJ Alarcon and F Sevilla (1999). "Response of antioxidant systems and leaf water relations to NaCl stress in pea plants." *New Phytologist* 141(2): 241-251.

- Herschbach C and H Rennenberg (1991). "Influence of Glutathione (GSH) on Sulphate Influx, Xylem Loading and Exudation in Excised Tobacco Roots." *Journal of Experimental Botany* 42(8): 1021-1029.
- Hinsinger P (2001). Bioavailability of trace elements as related to root-induced chemical changes in the rhizosphere. *Trace Elements in the Rhizosphere*. G. G.R., W. W.W. and Lombi. Boca Raton, Florida, USA CRC Press LCC: 25-41.
- Hinsinger P, A Schneider and JE Dufey (2005). "Le sol : ressource en nutriments et biodisponibilité." In « Sols et Environnement », Dunod (ed), Paris,: 285-305.
- Hippeli S, I Heiser and EF Elstner (1999). "Activated oxygen and free oxygen radicals in pathology: New insights and analogies between animals and plants." *Plant Physiology and Biochemistry* 37(3): 167-178.
- Hiraga S, K Sasaki, H Ito, Y Ohashi and H Matsui (2001). "A Large Family of Class III Plant Peroxidases." *Plant Cell and Physiology* 42(5): 462-468.
- Hiraga S, K Yamamoto, H Ito, K Sasaki, H Matsui, M Honma, Y Nagamura, T Sasaki and Y Ohashi (2000). "Diverse expression profiles of 21 rice peroxidase genes." *FEBS Letters* 471(2-3): 245-250.
- Hirsch RE, BD Lewis, EP Spalding and MR Sussman (1998). "A Role for the AKT1 Potassium Channel in Plant Nutrition." *Science* 280(5365): 918-921.
- Hodges DM, JM DeLong, CF Forney and RK Prange (1999). "Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds." *Planta* 207(4): 604-611.
- Horemans N, C H. Foyer, G Potters and H Asard (2000). "Ascorbate function and associated transport systems in plants." *Plant Physiology and Biochemistry* 38(7-8): 531-540.
- Howe GA and AL Schillmiller (2002). "Oxylipin metabolism in response to stress." *Current Opinion in Plant Biology* 5(3): 230-236.
- Hu J, G Shi, Q Xu, X Wang, Q Yuan and K Du (2007). "Effects of Pb²⁺ on the active oxygen-scavenging enzyme activities and ultrastructure in *Potamogeton crispus* leaves." *Russian Journal of Plant Physiology* 54(3): 414-419.
- Huang C-Y, FA Bazzaz and LN Vanderhoef (1974). "The Inhibition of Soybean Metabolism by Cadmium and Lead." *Plant Physiology* 54(1): 122-124.
- Huang H, T Li, S Tian, DK Gupta, X Zhang and X-e Yang (2008). "Role of EDTA in alleviating lead toxicity in accumulator species of *Sedum alfredii* H." *Bioresource Technology* In Press, Corrected Proof.
- Huang JW, J Chen, WR Berti and SD Cunningham (1997). "Phytoremediation of Lead-Contaminated Soils: Role of Synthetic Chelates in Lead Phytoextraction." *Environmental Science and Technology* 31(3): 800-805.

Huang JW and SD Cunningham (1996). "Lead phytoextraction: species variation in lead uptake and translocation." *New Phytologist* 134(1): 75-84.

Huang T-L and H-J Huang (2008). "ROS and CDPK-like kinase-mediated activation of MAP kinase in rice roots exposed to lead." *Chemosphere* 71(7): 1377-1385.

Hurkman WJ and CK Tanaka (1996). "Germin Gene Expression Is Induced in Wheat Leaves by Powdery Mildew Infection." *Plant Physiology* 111(3): 735-739.

I

Inze D and MV Montagu (2001). *Oxidative Stress in Plants*, CRC

Iqbal J and S Mushtaq (1987). "Effect of lead on germination, early seedling growth, soluble protein and acid phosphatase content in *Zea mays*." *Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research* 30(11): 853-856.

Irfan Qureshi M, M Israr, MZ Abdin and M Iqbal (2005). "Responses of *Artemisia annua* L. to lead and salt-induced oxidative stress." *Environmental and Experimental Botany* 53(2): 185-193.

Islam E, D Liu, T Li, X Yang, X Jin, Q Mahmood, S Tian and J Li "Effect of Pb toxicity on leaf growth, physiology and ultrastructure in the two ecotypes of *Elsholtzia argyi*." *Journal of Hazardous Materials* In Press, Corrected Proof.

Islam E, X Yang, T Li, D Liu, X Jin and F Meng (2007). "Effect of Pb toxicity on root morphology, physiology and ultrastructure in the two ecotypes of *Elsholtzia argyi*." *Journal of Hazardous Materials* 147(3): 806-816.

J

Jana S and M Choudhuri (1982). "Senescence in submerged aquatic angiosperms: effects of heavy metals." *New Phytologist* 90(3): 477-484.

Jarvis MD and DWM Leung (2001). "Chelated lead transport in *Chamaecytisus proliferus* (L.f.) link ssp. *proliferus* var. *palmensis* (H. Christ): an ultrastructural study." *Plant Science* 161(3): 433-441.

Jarvis MD and DWM Leung (2002). "Chelated lead transport in *Pinus radiata*: an ultrastructural study." *Environmental and Experimental Botany* 48(1): 21-32.

Jentschke G and DL Godbold (2000). "Metal toxicity and ectomycorrhizas." *Physiologia Plantarum* 109(2): 107-116.

- Jones MA, MJ Raymond, Z Yang and N Smirnoff (2007). "NADPH oxidase-dependent reactive oxygen species formation required for root hair growth depends on ROP GTPase." *Journal of Experimental Botany* 58(6): 1261-1270.
- Joo JH, YS Bae and JS Lee (2001). "Role of Auxin-Induced Reactive Oxygen Species in Root Gravitropism." *Plant Physiology* 126(3): 1055-1060.
- Jopony M and SD Young (1994). "The solid solution equilibria of lead and cadmium in polluted soils." *European Journal of Soil Science* 45(1): 59-70.

K

- Kabata-Pendias A and H Pendias (1992). "Trace elements in soils and plants." CRC Press, Boca Raton, Florida, 2nd Edition, 209 p.
- Kacabova P and L Natr (1986). "Effect of lead on growth characteristics and chlorophyll content in barley seedlings." *Photosynthetica* 20(4): 411-417.
- Kasprzak KS (2002). "Oxidative DNA and protein damage in metal-induced toxicity and carcinogenesis." *Free Radical Biology and Medicine* 32(10): 958-967.
- Kawano T (2003). "Roles of the reactive oxygen species-generating peroxidase reactions in plant defense and growth induction." *Plant Cell Reports* 21(9): 829-837.
- Kawano T and S Muto (2000). "Mechanism of peroxidase actions for salicylic acid-induced generation of active oxygen species and an increase in cytosolic calcium in tobacco cell suspension culture." *Journal of Experimental Botany* 51(345): 685-693.
- Kennedy C and F Gonsalves (1989). "The action of divalent Zn, Cd, Hg, Cu and Pb ions on the ATPase activity of a plasma membrane fraction isolated from roots of *Zea mays*." *Plant and Soil* 117(2): 167-175.
- Keren-Keiserman A, Z Tanami, O Shoseyov and I Ginzberg (2004). "Peroxidase activity associated with suberization processes of the muskmelon (*Cucumis melo*) rind." *Physiologia Plantarum* 121(1): 141-148.
- Kevresan S, N Petrovic, M Popovic and J Kandrak (2001). "Nitrogen and protein metabolism in young pea plants as affected by different concentrations of nickel, cadmium, lead and molybdenum " *Journal of Plant Nutrition* 24(10): 1633 - 1644.
- Khan D and B Frankland (1983). "Effects of cadmium and lead on radish plants with particular reference to movement of metals through soil profile and plant." *Plant and Soil* 70(3): 335-345.

- Khan S and N Khan (1983). "Influence of lead and cadmium on the growth and nutrient concentration of tomato (*Lycopersicum esculentum*) and egg-plant (*Solanum melongena*)." *Plant and Soil* 74(3): 387-394.
- Kim D-Y, L Bovet, S Kushnir, EW Noh, E Martinoia and Y Lee (2006). "AtATM3 Is Involved in Heavy Metal Resistance in Arabidopsis." *Plant Physiology* 140(3): 922-932.
- Kim PM, LM Winn, T Parman and PG Wells (1997). "UDP-Glucuronosyltransferase-mediated Protection Against In Vitro DNA Oxidation and Micronucleus Formation Initiated by Phenytoin and Its Embryotoxic Metabolite 5-(p-Hydroxyphenyl)-5-phenylhydantoin." *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 280(1): 200-209.
- Kim YY, YY Yang and Y Lee (2002). "Pb and Cd uptake in rice roots." *Physiologia Plantarum* 116: 368-372.
- Klessig DF, J Durner, R Noad, DA Navarre, D Wendehenne, D Kumar, JM Zhou, J Shah, S Zhang, P Kachroo, Y Trifa, D Pontier, E Lam and H Silva (2000). "Nitric oxide and salicylic acid signaling in plant defense." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97(16): 8849-8855.
- Kohler C, T Merkle and G Neuhaus (1999). "Characterisation of a novel gene family of putative cyclic nucleotide- and calmodulin-regulated ion channels in *Arabidopsis thaliana*." *The Plant Journal* 18(1): 97-104.
- Kosobrukhov A, I Knyazeva and V Mudrik (2004). "Plantago major plants responses to increase content of lead in soil: Growth and photosynthesis." *Plant Growth Regulation* 42: 145-151.
- Kovalchuk I, V Titov, B Hohn and O Kovalchuk (2005). "Transcriptome profiling reveals similarities and differences in plant responses to cadmium and lead." *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 570(2): 149-161.
- Kraemer SM, S-F Cheah, R Zapf, J Xu, KN Raymond and G Sposito (1999). "Effect of hydroxamate siderophores on Fe release and Pb(II) adsorption by goethite." *Geochimica et Cosmochimica Acta* 63(19-20): 3003-3008.
- Kramell R, O Miersch, R Atzorn, B Parthier and C Wasternack (2000). "Octadecanoid-Derived Alteration of Gene Expression and the "Oxylipin Signature" in Stressed Barley Leaves. Implications for Different Signaling Pathways." *Plant Physiology* 123(1): 177-188.
- Krieger-Liszkay A and A Trebst (2006). "Tocopherol is the scavenger of singlet oxygen produced by the triplet states of chlorophyll in the PSII reaction centre." *Journal of Experimental Botany* 57(8): 1677-1684.
- Kromer S (1995). "Respiration During Photosynthesis." *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 46(1): 45-70.
- Kumar G, S Iyer and N Knowles (2007). "Strboh A homologue of NADPH oxidase regulates wound-induced oxidative burst and facilitates wound-healing in potato tubers." *Planta* 227(1): 25-36.

L

- Laloi C, K Apel and A Danon (2004). "Reactive oxygen signalling: the latest news." *Current Opinion in Plant Biology* 7(3): 323-328.
- Lambeth JD (2004). "NOX enzymes and the biology of reactive oxygen." *Nature Reviews Immunology* 4(3): 181-189.
- Landberg T and M Greger (2002). "Differences in oxidative stress in heavy metal resistant and sensitive clones of *Salix viminalis*." *Journal of Plant Physiology* 159(1): 69-75.
- Lane BG (2000). "Oxalate oxidases and differentiating surface structure in wheat: germins." *Biochemistry Journal* 349(1): 309-321.
- Lane SD and ES Martin (1977). "A histochemical investigation of lead uptake in *Raphanus sativus*." *New Phytologist* 79(2): 281-286.
- Lane SD, ES Martin and JF Garrod (1978). "Lead toxicity effects on indole-3-ylacetic acid-induced cell elongation." *Planta* 144(1): 79-84.
- Langebartels C, H Wohlgemuth, S Kschieschan, S Grün and H Sandermann (2002). "Oxidative burst and cell death in ozone-exposed plants." *Plant Physiology and Biochemistry* 40(6-8): 567-575.
- Lappartient AG and B Touraine (1996). "Demand-Driven Control of Root ATP Sulfurylase Activity and SO_4^{2-} Uptake in Intact Canola (The Role of Phloem-Translocated Glutathione)." *Plant Physiology* 111(1): 147-157.
- Lasat MM (2002). "Phytoextraction of Toxic Metals: A Review of Biological Mechanisms." *Journal of Environmental Quality* 31(1): 109-120.
- Laurenzi M, A Tipping, S Marcus, P Knox, R Federico, R Angelini and M McPherson (2001). "Analysis of the distribution of copper amine oxidase in cell walls of legume seedlings." *Planta* 214(1): 37-45.
- Lebeau T, A Braud and K Jezequel "Performance of bioaugmentation-assisted phytoextraction applied to metal contaminated soils: A review." *Environmental Pollution In Press, Corrected Proof*.
- Lee KC, BA Cunningham, KH Chung, GM Paulsen and GH Liang (1976). "Lead Effects on Several Enzymes and Nitrogenous Compounds in Soybean Leaf." *Journal of Environmental Quality* 5(4): 357-359.
- Lee M, K Lee, J Lee, EW Noh and Y Lee (2005). "AtPDR12 Contributes to Lead Resistance in *Arabidopsis*." *Plant Physiology* 138(2): 827-836.
- Lee S-Z, L Chang, H-H Yang, C-M Chen and M-C Liu (1998). "Adsorption characteristics of lead onto soils." *Journal of Hazardous Materials* 63(1): 37-49.
- Leitao L, P Goulas and J-P Biolley (2003). "Time-course of Rubisco oxidation in beans (*Phaseolus vulgaris* L.) subjected to a long-term ozone stress." *Plant Science* 165(3): 613-620.

Références bibliographiques

- Leng Q, RW Mercier, W Yao and GA Berkowitz (1999). "Cloning and First Functional Characterization of a Plant Cyclic Nucleotide-Gated Cation Channel." *Plant Physiology* 121(3): 753-761.
- Lessler M (1988). "Lead and lead poisoning from antiquity to modern times." *Ohio Journal of Science* 88(3): 78-84.
- Levine A, R Tenhaken, R Dixon and C Lamb (1994). "H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response." *Cell* 79(4): 583-593.
- Liavonchanka A and I Feussner (2006). "Lipoxygenases: Occurrence, functions and catalysis." *Journal of Plant Physiology* 163(3): 348-357.
- Lichtenthaler HK (1987). "Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes." *Methods in Enzymology* 148: 350-382.
- Lima AIG, SIA Pereira, EM de Almeida Paula Figueira, GCN Caldeira and HDQ de Matos Caldeira (2006). "Cadmium detoxification in roots of *Pisum sativum* seedlings: relationship between toxicity levels, thiol pool alterations and growth." *Environmental and Experimental Botany* 55(1-2): 149-162.
- Liszak A, B Kenk and P Schopfer (2003). "Evidence for the involvement of cell wall peroxidase in the generation of hydroxyl radicals mediating extension growth." *Planta* 217(4): 658-667.
- Liu D, W Jiang, C Liu, C Xin and W Hou (2000). "Uptake and accumulation of lead by roots, hypocotyls and shoots of Indian mustard [*Brassica juncea* (L.)]." *Bioresource Technology* 71(3): 273-277.
- Liu J-X, Y-G Zu, X-G Shi, Y-Z Ai, Y-J Du, Y-J Fu and Z-G An (2007). "BjMT2, a metallothionein type-2 from *Brassica juncea*, may effectively remove excess lead from erythrocytes and kidneys of rats." *Environmental Toxicology and Pharmacology* 23(2): 168-173.
- Loeb LA, DC Wallace and GM Martin (2005). "The mitochondrial theory of aging and its relationship to reactive oxygen species damage and somatic mtDNA mutations." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102(52): 18769-18770.
- Lombi E, W Wenzel, GR Gobran and DC Adriano (2001). Dependency of phytoavailability of metals on indigenous and induced rhizosphere processes: a review. Trace elements in the rhizosphere. G. R. Gobran, W. Wenzel and E. Lombi. Boca Raton, Florida, USA CRC Press LCC: 3-24.
- Lopez-Huertas E, LM Sandalio, M GÃomez and LAD del Rio (1997). "Superoxide Radical Generation in Peroxisomal Membranes: Evidence for the Participation of the 18-kDa Integral Membrane Polypeptide." *Free Radical Research* 26(6): 497 - 506.
- Loudes JP (2002). Mise au point de biotests sur les plantes pour mettre en évidence un effet toxique ou agronomique de substances exogènes (Zinc, Plomb, Substances Humiques). ENSAT. Rapport DEA.

- Lovell D, G Thomas and R Dubow (1999). "Issues related to the experimental design and subsequent statistical analysis of in vivo and in vitro comet studies." *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis* 19(2): 109-119.
- Low PS and JR Merida (1996). "The oxidative burst in plant defense: Function and signal transduction." *Physiologia Plantarum* 96(3): 533-542.
- Łukaszek M and J Poskuta (1998). "Development of photosynthetic apparatus and respiration in pea seedlings during greening as influenced by toxic concentration of lead." *Acta Physiologiae Plantarum* 20(1): 35-40.
- Lynch MP, C Faustman, LK Silbart, D Rood and HC Furr (2001). "Detection of Lipid-Derived Aldehydes and Aldehyde:Protein Adducts In Vitro and in Beef." *Journal of Food Science* 66(8): 1093-1099.
- Lynn S, J-R Gurr, H-T Lai and K-Y Jan (2000). "NADH Oxidase Activation Is Involved in Arsenite-Induced Oxidative DNA Damage in Human Vascular Smooth Muscle Cells." *Circulation Research* 86(5): 514-519.

M

- Ma T-H, Z Xu, C Xu, H McConnell, E Valtierra Rabago, G Adriana Arreola and H Zhang (1995). "The improved *Allium/Vicia* root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants." *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects* 334(2): 185-195.
- Makowski E, A Kita, W Galas, W Karcz and JM Kuperberg (2002). "Lead distribution in corn seedlings (*Zea mays* L.) and its effect on growth and the concentrations of potassium and calcium." *Plant Growth Regulation* 37: 69-76.
- Maksymiec W (2007). "Signaling responses in plants to heavy metal stress." *Acta Physiologiae Plantarum* 29: 177-187.
- Maksymiec W and Z Krupa (2006). "The effects of short-term exposition to Cd, excess Cu ions and jasmonate on oxidative stress appearing in *Arabidopsis thaliana*." *Environmental and Experimental Botany* 57(1-2): 187-194.
- Maksymiec W, M Wójcik and Z Krupa (2007). "Variation in oxidative stress and photochemical activity in *Arabidopsis thaliana* leaves subjected to cadmium and excess copper in the presence or absence of jasmonate and ascorbate." *Chemosphere* 66(3): 421-427.
- Malecka A, W Jarmuszkiewicz and B Tomaszewska (2001). "Antioxidative defense to lead stress in subcellular compartments of pea root cells." *Acta Biochimica Polonica* 48(3): 687-98.

- Małecka A, A Piechalak, I Morkunas and B Tomaszewska (2008). "Accumulation of lead in root cells of *Pisum sativum*." *Acta Physiologiae Plantarum*.
- Małkowski E, A Kita, W Galas, W Karcz and JM Kuperberg (2002). "Lead distribution in corn seedlings (*Zea mays* L.) and its effect on growth and the concentrations of potassium and calcium." *Plant Growth Regulation* 37(1): 69-76.
- Malone C, DE Koeppe and RJ Miller (1974). "Localization of Lead Accumulated by Corn Plants." *Plant Physiology* 53(3): 388-394.
- Marcato CE (2007). "Origine, devenir et impact du cuivre et du zinc des lisiers porcins. Rôle de la digestion anaérobie." Thèse de doctorat, INP de Toulouse.
- Marmiroli M, G Antonioli, E Maestri and N Marmiroli (2005). "Evidence of the involvement of plant ligno-cellulosic structure in the sequestration of Pb: an X-ray spectroscopy-based analysis." *Environmental Pollution* 134(2): 217-227.
- Marrs KA (1996). "The functions and regulation of glutathione S-transferases in plants " *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 47(1): 127-158.
- Maxwell DP, Y Wang and L McIntosh (1999). "The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96(14): 8271-8276.
- May M, T Vernoux, C Leaver, M Van Montagu and D Inze (1998). "Review article. Glutathione homeostasis in plants: implications for environmental sensing and plant development." *Journal of Experimental Botany* 49(321): 649-667.
- McBride M, S Sauve and W Hendershot (1997). "Solubility control of Cu, Zn, Cd and Pb in contaminated soils." *European Journal of Soil Science* 48(2): 337-346.
- Mehler A (1951). "Studies on reactions of illuminated chloroplasts. I. Mechanism of the reduction of oxygen and other Hill reagents." *Archives of Biochemistry* 33(1): 65-77.
- Mehlhorn H, M Lelandais, HG Korth and CH Foyer (1996). "Ascorbate is the natural substrate for plant peroxidases." *FEBS Letters* 378(3): 203-206.
- Mehra RK, VR Kodati and R Abdullah (1995). "Chain Length-Dependent Pb(II)-Coordination in Phytochelatins." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 215(2): 730-736.
- Mendoza-Cozatl DG, E Butko, F Springer, JW Torpey, EA Komives, J Kehr and JI Schroeder (2008). "Identification of high levels of phytochelatins, glutathione and cadmium in the phloem sap of *Brassica napus*. A role for thiol-peptides in the long-distance transport of cadmium and the effect of cadmium on iron translocation." *The Plant Journal* 54(2): 249-259.
- Meyer A and R Hell (2005). "Glutathione homeostasis and redox-regulation by sulfhydryl groups." *Photosynthesis Research* 86(3): 435-457.
- Meyers DER, GJ Auchterlonie, RI Webb and B Wood "Uptake and localisation of lead in the root system of *Brassica juncea*." *Environmental Pollution* In Press, Corrected Proof.

Références bibliographiques

- Mika A, F Minibayeva, R Beckett and S Lüthje (2004). "Possible functions of extracellular peroxidases in stress-induced generation and detoxification of active oxygen species." *Phytochemistry Reviews* 3(1): 173-193.
- Miller NJ, J Sampson, LP Candeias, PM Bramley and CA Rice-Evans (1996). "Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls." *FEBS Letters* 384(3): 240-242.
- Mishra A and MA Choudhuri (1998). "Amelioration of lead and mercury effects on germination and rice seedling growth by antioxidants." *Biologia Plantarum* 41(3): 469-473.
- Mishra A and MA Choudhuri (1999). "Effects of Salicylic Acid on Heavy Metal-Induced Membrane Deterioration Mediated by Lipoxygenase in Rice." *Biologia Plantarum* 42(3): 409-415.
- Mishra S, S Srivastava, RD Tripathi, R Govindarajan, SV Kuriakose and MNV Prasad (2006a). "Phytochelatin synthesis and response of antioxidants during cadmium stress in *Bacopa monnieri* L[lozenge]." *Plant Physiology and Biochemistry* 44(1): 25-37.
- Mishra S, S Srivastava, RD Tripathi, R Kumar, CS Seth and DK Gupta (2006b). "Lead detoxification by coontail (*Ceratophyllum demersum* L.) involves induction of phytochelatin and antioxidant system in response to its accumulation." *Chemosphere* 65(6): 1027-1039.
- Mittler R (2002). "Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance." *Trends in Plant Science* 7(9): 405-410.
- Mittler R, E Merquiol, E Hallak-Herr, S Rachmilevitch, A Kaplan and M Cohen (2001). "Living under a 'dormant' canopy: a molecular acclimation mechanism of the desert plant *Retama raetam*." *The Plant Journal* 25(4): 407-416.
- Mittler R, S Vanderauwera, M Gollery and F Van Breusegem (2004). "Reactive oxygen gene network of plants." *Trends in Plant Science* 9(10): 490-498.
- Miyake C and K Asada (1994). "Ferredoxin-Dependent Photoreduction of the Monodehydroascorbate Radical in Spinach Thylakoids." *Plant Cell Physiol.* 35(4): 539-549.
- Mohan BS and BB Hosetti (1997). "Potential phytotoxicity of lead and cadmium to lemna minor grown in sewage stabilization ponds." *Environmental Pollution* 98(2): 233-238.
- Moller IM (2001). "Plant mitochondria and oxidative stress: Electron Transport, NADPH Turnover, and Metabolism of Reactive Oxygen Species." *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 52(1): 561-591.
- Moller SG and MJ McPherson (1998). "Developmental expression and biochemical analysis of the *Arabidopsis* *atao1* gene encoding an H₂O₂-generating diamine oxidase." *The Plant Journal* 13(6): 781-791.
- Montillet J-L, S Chamnongpol, C Rusterucci, J Dat, B van de Cotte, J-P Agnel, C Battesti, D Inze, F Van Breusegem and C Triantaphylides (2005). "Fatty Acid Hydroperoxides and H₂O₂ in the Execution of Hypersensitive Cell Death in Tobacco Leaves." *Plant Physiology* 138(3): 1516-1526.

- Moon G, B Clough, C Peterson and W Allaway (1986). "Apoplastic and Symplastic Pathways in *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. Roots Revealed by Fluorescent Tracer Dyes." *Australian Journal of Plant Physiology* 13: 637-648.
- Moran JF, EK James, MC Rubio, G Sarath, RV Klucas and M Becana (2003). "Functional Characterization and Expression of a Cytosolic Iron-Superoxide Dismutase from Cowpea Root Nodules." *Plant Physiology* 133(2): 773-782.
- Morard P, J Silvestre, L Lacoste, E Caumes and T Lamaze (2004). "Nitrate uptake and nitrite release by tomato roots in response to anoxia." *Journal of Plant Physiology* 161(7): 855-865.
- Morelli E and G Scarano (2001). "Synthesis and stability of phytochelatins induced by cadmium and lead in the marine diatom *Phaeodactylum tricorutum*." *Marine Environmental Research* 52(4): 383-395.
- Morena M, J-P Cristol, L Senecal, H Leray-Moragues, D Krieter and B Canaud (2002). "Oxidative stress in hemodialysis patients: Is NADPH oxidase complex the culprit?" *Kidney International* 61(S80): S109-S114.
- Moustakas M, T Lanaras, L Symeonidis and S Karataglis (1997). "Growth and some photosynthetic characteristics of field grown *Avena sativa* under copper and lead stress." *Photosynthetica* 30: 389-396.
- Mozzo M, L Dall'Osto, R Hienerwadel, R Bassi and R Croce (2008). "Photoprotection in the Antenna Complexes of Photosystem II: Role of individual xanthophylls in chlorophyll triplet quenching " *Journal of Biological Chemistry* 283(10): 6184-6192.
- Mueller MJ (2004). "Archetype signals in plants: the phytoprostanes." *Current Opinion in Plant Biology* 7(4): 441-448.
- Mukherji S and P Maitra (1976). "Toxic effects of lead on growth and metabolism of germinating rice (*Oryza sativa* L.) root tip cells." *Indian Journal of Experimental Biology* 14(519-521).
- Mullineaux PM, S Karpinski, A Jimenez, SP Cleary, C Robinson and GP Creissen (1998). "Identification of cDNAs encoding plastid-targeted glutathione peroxidase." *The Plant Journal* 13(3): 375-379.

N

- Nakano Y and K Asada (1981). "Hydrogen Peroxide is Scavenged by Ascorbate-specific Peroxidase in Spinach Chloroplasts." *Plant Cell and Physiology* 22(5): 867-880.
- Navas P, J Villalba and F Córdoba (1994). "Ascorbate function at the plasma membrane." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes* 1197(1): 1-13.

- Navrot N, V Collin, J Gualberto, E Gelhaye, M Hirasawa, P Rey, DB Knaff, E Issakidis, J-P Jacquot and N Rouhier (2006). "Plant Glutathione Peroxidases Are Functional Peroxiredoxins Distributed in Several Subcellular Compartments and Regulated during Biotic and Abiotic Stresses." *Plant Physiology* 142(4): 1364-1379.
- Nedelkoska TV and PM Doran (2000). "Characteristics of heavy metal uptake by plant species with potential for phytoremediation and phytomining." *Minerals Engineering* 13(5): 549-561.
- Niedernhofer LJ, JS Daniels, CA Rouzer, RE Greene and LJ Marnett (2003). "Malondialdehyde, a Product of Lipid Peroxidation, Is Mutagenic in Human Cells." *Journal of Biological Chemistry* 278(33): 31426-31433.
- Niyogi K (1999). "Photoprotection revisited: Genetic and Molecular Approaches." *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50(1): 333-359.
- Njus D and PM Kelley (1991). "Vitamins C and E donate single hydrogen atoms in vivo." *FEBS Letters* 284(2): 147-151.
- Noctor G (2006). "Metabolic signalling in defence and stress: the central roles of soluble redox couples." *Plant, Cell and Environment* 29: 409-425.
- Noctor G, A Arisi, L Jouanin, K Kunert, H Rennenberg and C Foyer (1998). "Review article. Glutathione: biosynthesis, metabolism and relationship to stress tolerance explored in transformed plants." *Journal of Experimental Botany* 49(321): 623-647.
- Noctor G, R De Paepe and CH Foyer (2007). "Mitochondrial redox biology and homeostasis in plants." *Trends in Plant Science* 12(3): 125-134.
- Nriagu J (1990). "Global Metal Pollution: Poisoning the Biosphere." *Environment ENVIRONMENTAL TOXICOLOGY AND CHEMISTRY* 32(7): 7-11;28-33.
- Nultsch W, R Miesch and Y Sell (1998). *Botanique générale*, De Boeck Université.
- Nyathi Y and A Baker (2006). "Plant peroxisomes as a source of signalling molecules." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1763(12): 1478-1495.

O

- Obroucheva NV, EI Bystrova, VB Ivanov, OV Antipova and IV Seregin (1998). "Root growth responses to lead in young maize seedlings." *Plant and Soil* 200: 55-61.
- Ogawa Ki, S Kanematsu and K Asada (1996). "Intra- and Extra-Cellular Localization of "Cytosolic" CuZn-Superoxide Dismutase in Spinach Leaf and Hypocotyl." *Plant Cell and Physiology* 37(6): 790-799.
- Ogawa Ki, S Kanematsu, K Takabe and K Asada (1995). "Attachment of CuZn-Superoxide Dismutase to Thylakoid Membranes at the Site of Superoxide Generation (PSI) in Spinach Chloroplasts:

- Detection by Immuno-Gold Labeling After Rapid Freezing and Substitution Method." *Plant Cell and Physiology* 36(4): 565-573.
- Olmos E, JR Martinez-Solano, A Piqueras and E Hellin (2003). "Early steps in the oxidative burst induced by cadmium in cultured tobacco cells (BY-2 line)." *Journal of Experimental Botany* 54(381): 291-301.
- Orozco-Cardenas ML, J Narvaez-Vasquez and CA Ryan (2001). "Hydrogen Peroxide Acts as a Second Messenger for the Induction of Defense Genes in Tomato Plants in Response to Wounding, Systemin, and Methyl Jasmonate." *Plant Cell* 13(1): 179-191.
- Otte ML, J Rozema, L Koster, MS Haarsma and RA Broekman (1987). The iron-plaque on the roots of saltmarsh plants: A barrier to heavy metal uptake? International Conference Heavy Metals in the Environment, New Orleans (USA). CEP Consultants, Edinburgh.

P

- Pais I and J Benton Jones (2000). "The handbook of Trace Elements". Boca Raton, FL, St. Lucie Press 223 p.
- Paivoke AEA (2002). "Soil lead alters phytase activity and mineral nutrient balance of *Pisum sativum*." *Environmental and Experimental Botany* 48(1): 61-73.
- Palma J, M Garrido, MI Rodríguez-García and LA del Río (1991). "Peroxisome proliferation and oxidative stress mediated by activated oxygen species in plant peroxisomes." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 287(1): 68-74.
- Pang X, DH Wang, XY Xing, A Peng, FS Zhang and CJ Li (2002). "Effect of La^{3+} on the activities of antioxidant enzymes in wheat seedlings under lead stress in solution culture." *Chemosphere* 47(10): 1033-1039.
- Papoyan A and LV Kochian (2004). "Identification of *Thlaspi caerulescens* Genes That May Be Involved in Heavy Metal Hyperaccumulation and Tolerance. Characterization of a Novel Heavy Metal Transporting ATPase." *Plant Physiology* 136(3): 3814-3823.
- Park J, Y Gu, Y Lee, Z Yang and Y Lee (2004). "Phosphatidic Acid Induces Leaf Cell Death in *Arabidopsis* by Activating the Rho-Related Small G Protein GTPase-Mediated Pathway of Reactive Oxygen Species Generation." *Plant Physiology* 134(1): 129-136.
- Parys E, E Romanowska, M Siedlecka and J Poskuta (1998). "The effect of lead on photosynthesis and respiration in detached leaves and in mesophyll protoplasts of *Pisum sativum*." *Acta Physiologiae Plantarum* 20(3): 313-322.

- Paschalidis KA and KA Roubelakis-Angelakis (2005). "Sites and Regulation of Polyamine Catabolism in the Tobacco Plant. Correlations with Cell Division/Expansion, Cell Cycle Progression, and Vascular Development." *Plant Physiology* 138(4): 2174-2184.
- Passardi F, C Cosio, C Penel and C Dunand (2005). "Peroxidases have more functions than a Swiss army knife." *Plant Cell Reports* 24(5): 255-265.
- Passardi F, D Longet, C Penel and C Dunand (2004a). "The class III peroxidase multigenic family in rice and its evolution in land plants." *Phytochemistry* 65(13): 1879-1893.
- Passardi F, C Penel and C Dunand (2004b). "Performing the paradoxical: how plant peroxidases modify the cell wall." *Trends in Plant Science* 9(11): 534-540.
- Pastori GM and CH Foyer (2002). "Common Components, Networks, and Pathways of Cross-Tolerance to Stress. The Central Role of "Redox" and Abscisic Acid-Mediated Controls." *Plant Physiology* 129(2): 460-468.
- Patra M, N Bhowmik, B Bandopadhyay and A Sharma (2004). "Comparison of mercury, lead and arsenic with respect to genotoxic effects on plant systems and the development of genetic tolerance." *Environmental and Experimental Botany* 52(3): 199-223.
- Pei Z-M, Y Murata, G Benning, S Thomine, B Klusener, GJ Allen, E Grill and JI Schroeder (2000). "Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells." *Nature* 406(6797): 731-734.
- Pena-Ahumada A, U Kahmann, K-J Dietz and M Baier (2006). "Regulation of peroxiredoxin expression versus expression of Halliwell-Asada-Cycle enzymes during early seedling development of *Arabidopsis thaliana*." *Photosynthesis Research* 89(2): 99-112.
- Piechalak A, B Tomaszewska and D Baralkiewicz (2003). "Enhancing phytoremediative ability of *Pisum sativum* by EDTA application." *Phytochemistry* 64(7): 1239-1251.
- Piechalak A, B Tomaszewska, D Baralkiewicz and A Malecka (2002). "Accumulation and detoxification of lead ions in legumes." *Phytochemistry* 60(2): 153-162.
- Pietrangeli P, R Federico, B Mondovi and L Morpurgo (2007). "Substrate specificity of copper-containing plant amine oxidases." *Journal of Inorganic Biochemistry* 101(7): 997-1004.
- Pignocchi C and CH Foyer (2003). "Apoplasmic ascorbate metabolism and its role in the regulation of cell signalling." *Current Opinion in Plant Biology* 6(4): 379-389.
- Pinelli E (1993). "Mécanismes d'activation de l'hyperactivité oxydative des macrophages par le γ -hexachlorocyclohexane : rôle du calcium et de la Protéine kinase C." Thèse de doctorat, INP de Toulouse. 198 p
- Pinelli E, C Cambon, H Tronchere, H Chap, J Teissie and B Pipy (1994). "Ca²⁺-Dependent Activation of Phospholipases C and D from Mouse Peritoneal Macrophages by a Selective Trigger of Ca²⁺ Influx, [γ]-Hexachlorocyclohexane." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 199(2): 699-705.

- Pinz KG, S Shibutani and DF Bogenhagen (1995). "Action of Mitochondrial DNA Polymerase gamma at Sites of Base Loss or Oxidative Damage." *Journal of Biological Chemistry* 270(16): 9202-9206.
- Pitzschke A, C Forzani and H Hirt (2006). "Reactive oxygen species signaling in plants." *Antioxidant Redox Signal* 8(9-10): 1757-64.
- Poirier Y, VD Antonenkov, T Glumoff and JK Hiltunen (2006). "Peroxisomal β -oxidation -A metabolic pathway with multiple functions." *Molecular Cell Research* 1763(12): 1413-1426.
- Poskuta J, E Parys and E Romanowaska (1996). "Toxicity of lead to photosynthesis, accumulation of chlorophyll, respiration and growth of *Chlorella pyrenoidosa*. Protective role of dark respiration." *Acta Physiologiae Plantarum* 18(2): 165-171.
- Poskuta J, E Parys and E Romanowska (1987). "The effects of lead on the gaseous exchange and photosynthetic carbon metabolism of pea seedlings." *Acta societatis botanicorum Poloniae* 56: 127-137.
- Poskuta JW, E Parys, E Romanowska, H Gajdzis-Gujdan and B Wróblewska (1988). "The effects of lead on photosynthesis, ^{14}C distribution among photoassimilates and transpiration of maize seedlings." *Acta societatis botanicorum Poloniae* 57: 149-155.
- Potters G, L De Gara, H Asard and N Horemans (2002). "Ascorbate and glutathione: guardians of the cell cycle, partners in crime?" *Plant Physiology and Biochemistry* 40(6-8): 537-548.
- Pourrut B (2003). Etude des profils d'expression de peroxydases chez une plante sentinelle en fonction d'un stress métal lourd, ENSAT. Rapport de DEA: 34 pp
- Pourrut B, G Perchet, J Silvestre, M Cecchi, M Guiresse and E Pinelli (2008). "Potential role of NADPH-oxidase in early steps of lead-induced oxidative burst in *Vicia faba* roots." *Journal of Plant Physiology* 165(6): 571-579.
- Prasad DDK and ARK Prasad (1987). "Effect of lead and mercury on chlorophyll synthesis in mung bean seedlings." *Phytochemistry* 26(4): 881-883.
- Prasad MNV and F Hagemeyer (1999). *Heavy Metal Stress in Plants: From Molecules to Ecosystems*. Berlin, Springer-Verlag.
- Przymusiński R, R Rucińska-Sobkowiak, B Ilska and E Gwóźdź (2007). "Organospecific responses of lupin seedlings to lead Localization of hydrogen peroxide and peroxidase activity." *Acta Physiologiae Plantarum* 29(5): 411-416.
- Pulford ID, AJ Kimber and HJ Duncan (1982). "Influence of pH and manganese oxides on the extraction and adsorption of trace metals in colliery spoil from the Central Scotland Coalfield." *Reclamation and Revegetation Research* 1: 19-31.

Q

- Quartacci MF, E Cosi and F Navari-Izzo (2001). "Lipids and NADPH-dependent superoxide production in plasma membrane vesicles from roots of wheat grown under copper deficiency or excess." *Journal of Experimental Botany* 52(354): 77-84.
- Qureshi M, M Abdin, S Qadir and M Iqbal (2007). "Lead-induced oxidative stress and metabolic alterations in *Cassia angustifolia* Vahl." *Biologia Plantarum* 51(1): 121-128.

R

- Raab A, H Schat, AA Meharg and J Feldmann (2005). "Uptake, translocation and transformation of arsenate and arsenite in sunflower (*Helianthus annuus*): formation of arsenic-phytochelatin complexes during exposure to high arsenic concentrations." *New Phytologist* 168(3): 551-558.
- Ralph PJ and MD Burchett (1998). "Photosynthetic response of *Halophila ovalis* to heavy metal stress." *Environmental Pollution* 103(1): 91-101.
- Razem FA and MA Bernards (2003). "Reactive oxygen species production in association with suberization: evidence for an NADPH-dependent oxidase." *J. Exp. Bot.* 54(384): 935-941.
- Rea G, M Laurenzi, E Tranquilli, R D'Ovidio, R Federico and R Angelini (1998). "Developmentally and wound-regulated expression of the gene encoding a cell wall copper amine oxidase in chickpea seedlings." *FEBS Letters* 437(3): 177-182.
- Reddy AM, SG Kumar, G Jyothsnakumari, S Thimmanaik and C Sudhakar (2005). "Lead induced changes in antioxidant metabolism of horsegram (*Macrotyloma uniflorum* (Lam.) Verdc.) and bengalgram (*Cicer arietinum* L.)." *Chemosphere* 60(1): 97-104.
- Rhoads DM, AL Umbach, CC Subbaiah and JN Siedow (2006). "Mitochondrial Reactive Oxygen Species. Contribution to Oxidative Stress and Interorganellar Signaling." *Plant Physiology* 141(2): 357-366.
- Rodriguez-Serrano M, MC Romero-Puertas, GM Pastori, FJ Corpas, LM Sandalio, LA del Rio and JM Palma (2007). "Peroxisomal membrane manganese superoxide dismutase: characterization of the isozyme from watermelon (*Citrullus lanatus* Schrad.) cotyledons." *Journal of Experimental Botany* doi:10.1093/jxb/erm095
- Rodriguez AA, H Ramiro Lascano, D Bustos and E Taleisnik (2007). "Salinity-induced decrease in NADPH oxidase activity in the maize leaf blade elongation zone." *Journal of Plant Physiology* 164(3): 223-230.

- Roelfsema MRG and R Hedrich (2005). "In the light of stomatal opening: new insights into 'the Watergate'." *New Phytologist* 167(3): 665-691.
- Romanowska E (2002). Gas exchange functions in metal stressed plants. *Physiology and Biochemistry of metal toxicity and tolerance in plants*. M. Prasad and K. Strzrlka. Dordrecht, The Netherlands, Kluwer Academic Publishers: 257-285.
- Romanowska E, AU Igamberdiev, E Parys and P Gardeström (2002). "Stimulation of respiration by Pb^{2+} in detached leaves and mitochondria of C3 and C4 plants." *Physiologia Plantarum* 116: 148-154.
- Romanowska E, B Pokorska and M Siedlecka (2005). "The effects of oligomycin on content of adenylates in mesophyll protoplasts, chloroplasts and mitochondria from Pb^{2+} treated pea and barley leaves." *Acta Physiologiae Plantarum* 27(1): 29-36.
- Romanowska E, B Wroblewska, A Drozak and M Siedlecka (2006). "High light intensity protects photosynthetic apparatus of pea plants against exposure to lead." *Plant Physiology and Biochemistry* 44(5-6): 387-394.
- Romanowska M, A Maciag, AL Smith, JR Fields, LW Fornwald, KD Kikawa, KS Kasprzak and LM Anderson (2007). "DNA damage, superoxide, and mutant K-ras in human lung adenocarcinoma cells." *Free Radical Biology and Medicine* 43(8): 1145-1155.
- Romero-Puertas MC, I McCarthy, LM Sandalio, JM Palma, FJ Corpas, M mez, R del and LA o (1999). "Cadmium toxicity and oxidative metabolism of pea leaf peroxisomes." *Free Radical Research* 31: 25-31.
- Romero-Puertas MC, M Rodriguez-Serrano, FJ Corpas, M Gomez, LA Del Rio and LM Sandalio (2004). "Cadmium-induced subcellular accumulation of O_2^- and H_2O_2 in pea leaves." *Plant, Cell and Environment* 27(9): 1122-1134.
- Ross SM (1994). "Retention, transformation and mobility of toxic metals in soils. " In: *Toxic metals in soil-plant systems*. S. M. R. editor: 63-152.
- Rouhier N and J-P Jacquot (2002). "Plant peroxiredoxins: alternative hydroperoxide scavenging enzymes." *Photosynthesis Research* 74(3): 259-268.
- Roy M and B Ghosh (1996). "Polyamines, both common and uncommon, under heat stress in rice (*Oryza sativa*) callus." *Physiologia Plantarum* 98(1): 196-200.
- Rucinska R and EA Gwozdz (2005). "Influence of lead on membrane permeability and lipoxygenase activity in lupine roots." *Biologia Plantarum* 49(4): 617-619.
- Rucińska R, R Sobkowiak and E Gwóźdź (2004). "Genotoxicity of lead in lupin root cells as evaluated by the comet assay." *Cellular and Molecular Biology Letter* 9(3): 519-28.
- Ruciska-Sobkowiak R and PM Pukacki (2006). "Antioxidative defense system in lupin roots exposed to increasing concentrations of lead." *Acta Physiologiae Plantarum* 28(4): 357-364.
- Ruley A, NC Sharma and SV Sahi (2004a). "Antioxidant defense in a lead accumulating plant, *Sesbania drummondii*." *Plant Physiology and Biochemistry* 42(11): 899-906.

Ruley AT, NC Sharma and SV Sahi (2004b). "Antioxidant defense in a lead accumulating plant, *Sesbania drummondii*." *Plant Physiology and Biochemistry* 42(11): 899-906.

S

Sagi M and R Fluhr (2001). "Superoxide Production by Plant Homologues of the gp91phox NADPH Oxidase. Modulation of Activity by Calcium and by Tobacco Mosaic Virus Infection." *Plant Physiology* 126(3): 1281-1290.

Sagi M and R Fluhr (2006). "Production of Reactive Oxygen Species by Plant NADPH Oxidases." *Plant Physiology* 141(2): 336-340.

Saint-Martin W and B Pourrut (2005). "Etude de l'impact du plomb sur le stress oxydatif d'une plante sentinelle : *Vicia faba*." ENSAT. Rapport de stage de BTS.

Salin ML (1988). "Toxic oxygen species and protective systems of the chloroplast." *Physiologia Plantarum* 72(3): 681-689.

Sandalio LM and LA Del Rio (1988). "Intraorganellar Distribution of Superoxide Dismutase in Plant Peroxisomes (Glyoxysomes and Leaf Peroxisomes)." *Plant Physiology* 88(4): 1215-1218.

Sandalio LM, VM Fernandez, FL Ruperez and LA Del Rio (1988). "Superoxide Free Radicals Are Produced in Glyoxysomes." *Plant Physiology* 87(1): 1-4.

Sandalio LM, E LÃ³pez-Huertas, P Bueno and LAD RÃo (1997). "Immunocytochemical Localization of Copper, Zinc Superoxide Dismutase in Peroxisomes from Watermelon (*Citrullus vulgaris* Schrad.) Cotyledons." *Free Radical Research* 26(3): 187 - 194.

Saradhi AP and PP Saradhi (1991). "Proline accumulation under heavy metal stress." *Journal of Plant Physiology* 138(5): 554-558.

Sauer P, J Frébortová, M Sebelá, P Galuszka, S Jacobsen, P Pec and I Frébort (2002). "Xanthine dehydrogenase of pea seedlings: a member of the plant molybdenum oxidoreductase family." *Plant Physiology and Biochemistry* 40(5): 393-400.

Saxena A, DK Saxena and HS Srivastava (2003). "The Influence of Glutathione on Physiological Effects of Lead and its Accumulation in Moss *Sphagnum Squarrosum*." *Water, Air, & Soil Pollution* 143(1): 351-361.

Sayed SA (1999). "Effects of lead and kinetin on the growth, and some physiological components of safflower." *Plant Growth Regulation* 29(3): 167-174.

Scarano G and E Morelli (2002). "Characterization of cadmium- and lead- phytochelatin complexes formed in a marine microalga in response to metal exposure." *BioMetals* 15: 145-151.

- Schutzendubel A and A Polle (2002). "Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization." *Journal of Experimental Botany* 53(372): 1351-1365.
- Schuurink RC, SF Shartzler, A Fath and RL Jones (1998). "Characterization of a calmodulin-binding transporter from the plasma membrane of barley aleurone." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95(4): 1944-1949.
- Sebela M, A Radova, R Angelini, P Tavladoraki, I Frebort and P Pec (2001). "FAD-containing polyamine oxidases: a timely challenge for researchers in biochemistry and physiology of plants." *Plant Science* 160(2): 197-207.
- Segal AW (2008). "The function of the NADPH oxidase of phagocytes and its relationship to other NOXs in plants, invertebrates, and mammals." *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 40(4): 604-618.
- Segal AW and A Abo (1993). "The biochemical basis of the NADPH oxidase of phagocytes." *Trends in Biochemical Sciences* 18(2): 43-47.
- Seregin I and V Ivanov (1997). "Histochemical Investigation of Cadmium and Lead Distribution in Plants." *Russian Journal of Plant Physiology* 44(6): 791-796.
- Seregin IV and VB Ivanov (2001). "Physiological Aspects of Cadmium and Lead Toxic Effects on Higher Plants." *Russian Journal of Plant Physiology* 48(4): 523-544.
- Seregin IV, VM Pekhov and VB Ivanov (2002). "Plasmolysis as a Tool to Reveal Lead Localization in the Apoplast of Root Cells." *Russian Journal of Plant Physiology* 49(2): 283-285.
- Seregin IV, LK Shpigun and VB Ivanov (2004). "Distribution and Toxic Effects of Cadmium and Lead on Maize Roots." *Russian Journal of Plant Physiology* 51(4): 525-533.
- Settle DM and CC Patterson (1980). "Lead in albacore: guide to lead pollution in Americans." *Science* 207(4436): 1167-1176.
- Sgherri C, MF Quartacci and F Navari-Izzo (2007). "Early production of activated oxygen species in root apoplast of wheat following copper excess." *Journal of Plant Physiology* 164(9): 1152-1160.
- Shapiro AD and L Gerald (2005). *Nitric Oxide Signaling in Plants. Vitamins & Hormones*, Academic Press. Volume 72: 339-398.
- Sharma P and RS Dubey (2005). "Lead toxicity in plants." *Brazilian Journal of Plant Physiology* 17: 35-52.
- Shashidhar VR, TG Prasad and L Sudharshan (1996). "Hormone Signals from Roots to Shoots of Sunflower (*Helianthus annuus* L.). Moderate Soil Drying Increases Delivery of Abscisic Acid and Depresses Delivery of Cytokinins in Xylem Sap." *Annals of Botany* 78(2): 151-155.
- Shi H, LG Hudson and KJ Liu (2004). "Oxidative stress and apoptosis in metal ion-induced carcinogenesis." *Free Radical Biology and Medicine* 37(5): 582-593.

Références bibliographiques

- Shim I-S, Y Momose, A Yamamoto, D-W Kim and K Usui (2003). "Inhibition of catalase activity by oxidative stress and its relationship to salicylic acid accumulation in plants." *Plant Growth Regulation* 39(3): 285-292.
- Sies H (1997). "Oxidative stress: oxidants and antioxidants." *Experimental Physiology* 82(2): 291-295.
- Silbergeld E, M Waalkes and J Rice (2000). "Lead as a carcinogen: Experimental evidence and mechanisms of action." *American Journal of Industrial Medicine* 38(3): 316-323.
- Silbergeld EK (2003). "Facilitative mechanisms of lead as a carcinogen." *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 533(1-2): 121-133.
- Silvestre J (2008). "Etudes des effets de différents stress abiotiques sur des organismes chlorophylliens." *Habilitation à Diriger les Recherches INP Toulouse*, 80 pp
- Simonovicova M, B Bocova, J Huttova, I Mistrik and L Tamas (2005). "Effect of cadmium on oxalate oxidase activity in barley roots." *Biologia Plantarum* 60(4): 463-46.
- Simonovicova M, J Huttova, I Mistrik, iacute, B Siroka and L Tamas (2004a). "Peroxidase mediated hydrogen peroxide production in barley roots grown under stress conditions." *Plant Growth Regulation* 44: 267-275.
- Simonovicova M, L Tamás, J Huttová and I Mistrík (2004b). "Effect of Aluminium on Oxidative Stress Related Enzymes Activities in Barley Roots." *Biologia Plantarum* 48(2): 261-266.
- Singh B, R Sharma and B Garg (2006). "Kinetics and molecular modeling of biologically active glutathione complexes with lead(II) ions." *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* 84(3): 593-600.
- Singh RP, RD Tripathi, SK Sinha, R Maheshwari and HS Srivastava (1997). "Response of higher plants to lead contaminated environment." *Chemosphere* 34(11): 2467-2493.
- Sinha P, BK Dube, P Srivastava and C Chatterjee (2006). "Alteration in uptake and translocation of essential nutrients in cabbage by excess lead." *Chemosphere* 65(4): 651-656.
- Skinner RH and JW Radin (1994). "The effect of phosphorus nutrition on water flow through the apoplastic bypass in cotton roots." *Journal of Experimental Botany* 45(4): 423-428.
- Smirnoff N (1998). "Plant resistance to environmental stress." *Current Opinion in Biotechnology* 9(2): 214-219.
- Smirnoff N, C Foyer, K Dietz, R Mittler, J Feierabend, S Grace, R Desikan, M Jones, R Vreeburg, B Logan and P Jaspers (2005). *Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants*, Blackwell publishing.
- SOGREAH (2007). "Bilan des flux de contaminants entrant sur les sols agricoles de France métropolitaine."
- Spiteller G (1998). "Linoleic acid peroxidation--the dominant lipid peroxidation process in low density lipoprotein--and its relationship to chronic diseases." *Chemistry and Physics of Lipids* 95(2): 105-162.

- Sposito G, LJ Lund and AC Chang (1982). "Trace Metal Chemistry in Arid-zone Field Soils Amended with Sewage Sludge: I. Fractionation of Ni, Cu, Zn, Cd, and Pb in Solid Phases." *Soil Science Society American Journal* 46(2): 260-264.
- Stadtman ER and RL Levine (2000). "Protein Oxidation." *Annals of NY Academy of Science* 899(1): 191-208.
- Stefanov K, I Popova, E Kamburova, T Pancheva, G Kimenov, L Kuleva and S Popov (1993). "Lipid and sterol changes in *Zea mays* caused by lead ions." *Phytochemistry* 33(1): 47-51.
- Stefanov K, I Popova, B Nikolova-Damyanova, G Kimenov and S Popov (1992). "Lipid and sterol changes in *Phaseolus vulgaris* caused by lead ions." *Phytochemistry* 31(11): 3745-3748.
- Stefanov K, K Seizova, S Pandev, N Yanishlieva, E Marinova, L Tyankova, L Kuleva and S Popov (1995a). "Effect of lead ions on lipids and antioxidant complex activity of *Capsicum annuum* L leaves, pericarp and seeds." *Journal of the Science of Food and Agriculture* 67(2): 259-266.
- Stefanov K, K Seizova, I Popova, V Petkov, G Kimenov and S Popov (1995b). "Effect of lead ions on the phospholipid composition in leaves of *Zea mays* and *Phaseolus vulgaris*." *Journal of Plant Physiology* 147(2): 243-246.
- Stefanov KL, SD Pandev, KA Seizova, LA Tyankova and SS Popov (1995c). "Effect of lead on the lipid metabolism in spinach leaves and thylakoid membranes " *Biologia Plantarum* 37(2): 251-256.
- Stiborova M, M Doubravova, A Brezinova and F A. (1986). "Effect of heavy metal ions on growth and biochemical characteristics of photosynthesis of barley (*Hordeum vulgare* L.)." *Photosynthetica* 20(4): 418-425.
- Stohs SJ and D Bagchi (1995). "Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions." *Free Radical Biology and Medicine* 18(2): 321-336.
- Subramaniam R, C Despres and N Brisson (1997). "A Functional Homolog of Mammalian Protein Kinase C Participates in the Elicitor-Induced Defense Response in Potato." *Plant Cell* 9(4): 653-664.

T

- Tamás L, J Huttová, I Mistrík and M Ollé (2006). "Cadmium-induced microsomal membrane-bound peroxidases mediated hydrogen peroxide production in barley roots." *Acta Physiologiae Plantarum* 28(5): 453-457.
- Tang D, L-S Wen and PH Santschi (2000). "Analysis of biogenic thiols in natural water samples by high-performance liquid chromatographic separation and fluorescence detection with

- ammonium 7-fluorobenzo-2-oxa-1,3-diazole-4-sulfonate (SBD-F)." *Analytica Chimica Acta* 408(1-2): 299-307.
- Tanton TW and SH Crowdy (1971). "The distribution of lead chelate in the transpiration stream of higher plants." *Pesticide Science* 2(5): 211-213.
- Tao S, WX Liu, YJ Chen, J Cao, BG Li, FL Xu, PM Huang and GR Gobran (2005). Fractionation and bioavailability of copper, cadmium and lead in rhizosphere soil. *Biogeochemistry of Trace Elements in the Rhizosphere*. Amsterdam, Elsevier: 313-336.
- Tatar E, VG Mihucz, A Varga, G Zaray and E Cseh (1999). "Effect of lead, nickel and vanadium contamination on organic acid transport in xylem sap of cucumber." *Journal of Inorganic Biochemistry* 75(3): 219-223.
- Tatar E, VG Mihucz, A Varga, G Zaray and F Fodor (1998). "Determination of Organic Acids in Xylem Sap of Cucumber: Effect of Lead Contamination." *Microchemical Journal* 58(3): 306-314.
- Telfer A, S Dhimi, S Bishop, D Phillips and J Barber (1994). "beta-Carotene quenches singlet oxygen formed by isolated photosystem II reaction centers." *Biochemistry* 33(48): 14469-74.
- Tognolli M, C Penel, H Greppin and P Simon (2002). "Analysis and expression of the class III peroxidase large gene family in *Arabidopsis thaliana*." *Gene* 288(1-2): 129-138.
- Tomulescu I, E Radovicu, V Merca and A Tuduce (2004). "Effect of Copper, Zinc and Lead and Their Combinations on the Germination Capacity of Two Cereals." *Journal of agricultural sciences* 15: 39-42.
- Torres MA, JL Dangl and JDG Jones (2001). "Arabidopsis gp91phox homologues AtrbohD and AtrbohF are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response." *Proceedings of the National Academy of Sciences*: 012452499.
- Torres MA, H Onouchi, S Hamada, C Machida, KE Hammond-Kosack and JDG Jones (1998). "Six *Arabidopsis thaliana* homologues of the human respiratory burst oxidase (gp91phox)." *The Plant Journal* 14(3): 365-370.
- Tung G and PJ Temple (1996a). "Histochemical detection of lead in plant tissues." *Environmental Toxicology and Chemistry* 15(6): 906-914.
- Tung G and PJ Temple (1996b). "Uptake and localization of lead in corn (*Zea mays* L.) seedlings, a study by histochemical and electron microscopy." *Science of The Total Environment* 188(2-3): 71-85.
- Turcsanyi E, T Lyons, M Plöchl and J Barnes (2000). "Does ascorbate in the mesophyll cell walls form the first line of defence against ozone? Testing the concept using broad bean *Vicia faba* L." *Journal of Experimental Botany* 51: 901-910.

U

- Ueno D, T Iwashita, F-J Zhao and JF Ma (2008). "Characterization of Cd Translocation and Identification of the Cd Form in Xylem Sap of the Cd-Hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*." *Plant Cell and Physiology* 49(4): 540-548.
- Ursini F, M Maiorino, R Brigelius-Flohé, K Aumann, A Roveri, D Schomburg and L Flohé (1995). "Diversity of glutathione peroxidases." *Methods in Enzymology* 252: 38-53.

V

- Valério L, M De Meyer, C Penel and C Dunand (2004). "Expression analysis of the *Arabidopsis* peroxidase multigenic family." *Phytochemistry* 65(10): 1331-1342.
- Valko M, CJ Rhodes, J Moncol, M Izakovic and M Mazur (2006). "Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer." *Chemico-Biological Interactions* 160(1): 1-40.
- Vallee BL and DD Ulmer (1972). "Biochemical Effects of Mercury, Cadmium, and Lead." *Annual Review of Biochemistry* 41(1): 91-128.
- Valverde M, C Trejo and E Rojas (2001). "Is the capacity of lead acetate and cadmium chloride to induce genotoxic damage due to direct DNA-metal interaction?" *Mutagenesis* 16(3): 265-270.
- Van Assche F and H Clijsters (1990). "Effects of metals on enzyme activity in plants." *Plant cell and Environment* 13: 195-206.
- Van Breusegem F, E Vranova, JF Dat and D Inze (2001). "The role of active oxygen species in plant signal transduction." *Plant Science* 161(3): 405-414.
- Vanin AF, DA Svistunenko, VD Mikoyan, VA Serezhenkov, MJ Fryer, NR Baker and CE Cooper (2004). "Endogenous Superoxide Production and the Nitrite/Nitrate Ratio Control the Concentration of Bioavailable Free Nitric Oxide in Leaves." *Journal of Biological Chemistry* 279(23): 24100-24107.
- Vassil AD, Y Kapulnik, I Raskin and DE Salt (1998). "The Role of EDTA in Lead Transport and Accumulation by Indian Mustard." *Plant Physiology* 117(2): 447-453.
- Vatamaniuk OK, S Mari, Y-P Lu and PA Rea (2000). "Mechanism of Heavy Metal Ion Activation of Phytochelatin (PC) Synthase. Blocked thiols are sufficient for PC synthase-catalysed transpeptidation of glutathione and related thiol peptides." *Journal of Biological Chemistry* 275(40): 31451-31459.

- Verma S and RS Dubey (2003). "Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants." *Plant Science* 164(4): 645-655.
- Vodnik D, G Jentschke, E Fritz, N Gogala and DL Godbold (1999). "Root-applied cytokinin reduces lead uptake and affects its distribution in norway spruce seedlings." *Physiologia Plantarum* 106(1): 75-81.
- Vojtechova M and S Leblova (1991). "Uptake of lead and cadmium by maize seedlings and the effect of heavy metals on the activity of phosphoenolpyruvate carboxylase isolated from maize." *Biologia Plantarum* 33(5): 386-394.
- Vranova E, D Inze and F Van Breusegem (2002). "Signal transduction during oxidative stress." *Journal of Experimental Botany* 53(372): 1227-1236.
- Vyas MN, BL Jacobson and FA Quioco (1989). "The calcium-binding site in the galactose chemoreceptor protein. Crystallographic and metal-binding studies." *Journal of Biological Chemistry* 264(34): 20817-20821.

W

- Waite KA, R Wallin, D Qualliotine-Mann and LC McPhail (1997). "Phosphatidic Acid-mediated Phosphorylation of the NADPH Oxidase Component p47-phox. Evidence that phosphatidic acid may activate a novel protein kinase." *Journal of Biological Chemistry* 272(24): 15569-15578.
- Wang C, X Wang, Y Tian, H Yu, X Gu, W Du and H Zhou (2007a). "Oxidative stress, defence response and early biomarkers for lead-contaminated soil in *Vicia faba* seedlings." *Environmental Toxicology and Chemistry*: 1.
- Wang H, X Shan, T Liu, Y Xie, B Wen, S Zhang, F Han and M Genuchten (2007b). "Organic acids enhance the uptake of lead by wheat roots." *Planta* 225: 1483-1494.
- Weber H, A Chetelat, P Reymond and EE Farmer (2004). "Selective and powerful stress gene expression in *Arabidopsis* in response to malondialdehyde." *The Plant Journal* 37: 877-888.
- Weiser H and M Vecchi (1982). "Stereoisomers of alpha-tocopheryl acetate. II. Biopotencies of all eight stereoisomers, individually or in mixtures, as determined by rat resorption-gestation tests." *International Journal for Vitamin and Nutrition Research* 52(3): 351-370.
- Welinder K (1992). "Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases." *Current Opinion in Structural Biology* 2(388-393).
- Weryszko-Chmielewska E and M Chwil (2005). "Lead-Induced Histological and Ultrastructural Changes in the Leaves of Soybean (*Glycine max* (L.) Merr.)." *Soil Science and Plant Nutrition* 51(2): 203-212.

- Wierzbicka M (1987). "Lead translocation and localization in *Allium cepa* roots." *Canadian Journal of Botany* 65(9): 1851-1860.
- Wierzbicka M (1989). "Disturbances in cytokinesis caused by inorganic lead." *Environmental and Experimental Botany* 29(2): 123-133.
- Wierzbicka M (1994). "Resumption of mitotic activity in *Allium cepa* L. root tips during treatment with lead salts." *Environmental and Experimental Botany* 34(2): 173-180.
- Wierzbicka M (1998). "Lead in the apoplast of *Allium cepa* L. root tips--ultrastructural studies." *Plant Science* 133(1): 105-119.
- Wierzbicka M (1999a). "Comparison of lead tolerance in *Allium cepa* with other plant species." *Environmental Pollution* 104(1): 41-52.
- Wierzbicka M (1999b). "The effect of lead on the cell cycle in the root meristem of *Allium cepa* L." *Protoplasma* 207(3): 186-194.
- Wierzbicka M and J Obidzinska (1998). "The effect of lead on seed imbibition and germination in different plant species." *Plant Science* 137(2): 155-171.
- Wierzbicka MH, E Przedpeńska, R Ruzik, L Ouerdane, K Połec-Pawlak, M Jarosz, J Szpunar and A Szakiel (2007). "Comparison of the toxicity and distribution of cadmium and lead in plant cells." *Protoplasma* 231(1): 99-111.
- Willekens H, S Chamnongpol, M Davey, M Schraudner, C Langebartels, MV Montagu, D Inzé and WV Camp (1997). "Catalase is a sink for H₂O₂ and is indispensable for stress defence in C3 plants." *The EMBO Journal* 16: 4806-4816.
- Wingate VPM, MA Lawton and CJ Lamb (1988). "Glutathione Causes a Massive and Selective Induction of Plant Defense Genes." *Plant Physiology* 87(1): 206-210.
- Wingler A, P Lea, W Quick and R Leegood (2000). "Photorespiration: metabolic pathways and their role in stress protection." *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 355(1402): 1517-1529.
- Wojas S, A Ruszczynska, E Bulska, M Wojciechowski and DM Antosiewicz (2007). "Ca²⁺-dependent plant response to Pb²⁺ is regulated by LCT1." *Environmental Pollution* 147(3): 584-592.
- Wojtaszek P (1997). "Oxidative burst : an early plant response to pathogen infection." *Biochem Journal* 322(3): 681-692.
- Wong CM, AK Cheema, L Zhang and YJ Suzuki (2008). "Protein Carbonylation as a Novel Mechanism in Redox Signaling." *Circulation Research* 102(3): 310-318.
- Wormuth D, I Heiber, J Shaikali, A Kandlbinder, M Baier and K-J Dietz (2007). "Redox regulation and antioxidative defence in *Arabidopsis* leaves viewed from a systems biology perspective." *Journal of Biotechnology* 129(2): 229-248.

- Wozniak K and J Blasiak (2003). "In vitro genotoxicity of lead acetate: induction of single and double DNA strand breaks and DNA-protein cross-links." *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 535(2): 127-139.
- Wozny A, J Schneider and EA Gwozdz (1995). "The effects of lead and kinetin on greening barley leaves." *Biologia Plantarum* 37(4): 541-552.
- Wu Z, Z Gu, X Wang, L Evans and H Guo (2003). "Effects of organic acids on adsorption of lead onto montmorillonite, goethite and humic acid." *Environmental Pollution* 121(3): 469-475.

X

- Xing SG, YB Jun, ZW Hau and LY Liang (2007). "Higher accumulation of γ -aminobutyric acid induced by salt stress through stimulating the activity of diamine oxidases in *Glycine max* (L.) Merr. roots." *Plant Physiology and Biochemistry* 45(8): 560-566.
- Xing T, VJ Higgins and E Blumwald (1997). "Race-Specific Elicitors of *Cladosporium fulvum* Promote Translocation of Cytosolic Components of NADPH Oxidase to the Plasma Membrane of Tomato Cells." *Plant Cell* 9(2): 249-259.
- Xiong Z, F Zhao and M Li (2006). "Lead toxicity in *Brassica pekinensis* Rupr.: Effect on nitrate assimilation and growth." *Environmental Toxicology* 21(2): 147-153.
- Xu J, L-j Lian, C Wu, X-f Wang, W-y Fu and L-h Xu (2008). "Lead induces oxidative stress, DNA damage and alteration of p53, Bax and Bcl-2 expressions in mice." *Food and Chemical Toxicology* 46(5): 1488-1494.
- Xu Y, G Zhou, L Zhou, Y Li and J Liu (2007). "Expression patterns of the rice class I metallothionein gene family in response to lead stress in rice seedlings and functional complementation of its members in lead-sensitive yeast cells." *Chinese Science Bulletin* 52(16): 2203-2209.

Y

- Yamasaki H and MF Cohen (2006). "NO signal at the crossroads: polyamine-induced nitric oxide synthesis in plants?" *Trends in Plant Science* 11(11): 522-524.
- Yang JY, XE Yang, ZL He, TQ Li, JL Shentu and PJ Stoffella (2006a). "Effects of pH, organic acids, and inorganic ions on lead desorption from soils." *Environmental Pollution* 143(1): 9-15.
- Yang S, C Huang, Z Wu, J Hu, T Li, S Liu and W Jia (2006b). "Stomatal movement in response to long distance-communicated signals initiated by heat shock in partial roots of *Commelina communis* L." *Science in China Series C: Life Sciences* 49(1): 18-25.

- Ye Z, AJM Baker, M-H Wong and AJ Willis (1998). "Zinc, lead and cadmium accumulation and tolerance in *Typha latifolia* as affected by iron plaque on the root surface." *Aquatic Botany* 61(1): 55-67.
- Yeo AR, ME Yeo and TJ Flowers (1987). "The Contribution of an Apoplastic Pathway to Sodium Uptake by Rice Roots in Saline Conditions." *Journal of Experimental Botany* 38(7): 1141-1153.
- Yoshida K, I Terashima and K Noguchi (2006). "Distinct Roles of the Cytochrome Pathway and Alternative Oxidase in Leaf Photosynthesis." *Plant Cell and Physiology* 47(1): 22-31.
- Young TA, CC Cunningham and SM Bailey (2002). "Reactive oxygen species production by the mitochondrial respiratory chain in isolated rat hepatocytes and liver mitochondria: studies using myxothiazol." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 405(1): 65-72.
- Yu Z-L, J-G Zhang, X-C Wang and J Chen (2008). "Excessive Copper Induces the Production of Reactive Oxygen Species, which is Mediated by Phospholipase D, Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxidase and Antioxidant Systems." *Journal of Integrative Plant Biology* 50(2): 157-167.

Z

- Zenk MH (1996). "Heavy metal detoxification in higher plants - a review." *Gene* 179(1): 21-30.
- Zhang S, J Weng, J Pan, T Tu, S Yao and C Xu (2003). "Study on the photo-generation of superoxide radicals in Photosystem II with EPR spin trapping techniques." *Photosynthesis Research* 75(1): 41-48.
- Zhang SQ, W H. Outlaw and K Aghoram (2001). "Relationship between changes in the guard cell abscisic-acid content and other stress-related physiological parameters in intact plants." *Journal of Experimental Botany* 52(355): 301-308.
- Zhang Z and DB Collinge (1995). "Germin-like oxalate oxidase, a H₂O₂-producing enzyme, accumulates in barley attacked by the powdery mildew fungus." *Plant journal* 8(1): 139-145.
- Zheljazkov VD, LE Craker and B Xing (2006). "Effects of Cd, Pb, and Cu on growth and essential oil contents in dill, peppermint, and basil." *Environmental and Experimental Botany* 58(1-3): 9-16.
- Zimmermann P, M Hirsch-Hoffmann, L Hennig and W Gruissem (2004). "GENEVESTIGATOR. *Arabidopsis* Microarray Database and Analysis Toolbox." *Plant Physiology* 136(1): 2621-2632.

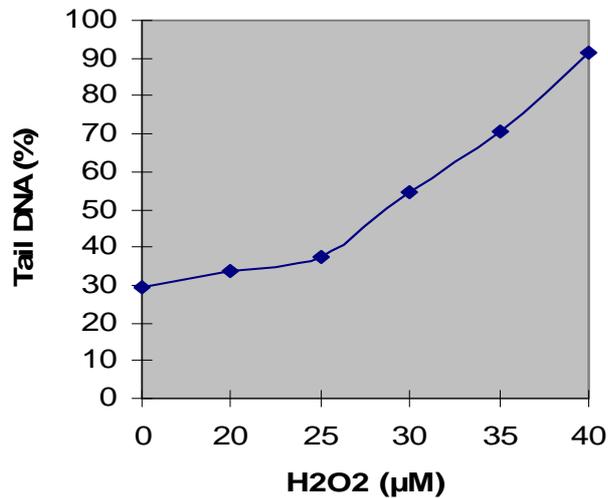
Annexes

Annexe 1 : Composition de la solution de Hoagland

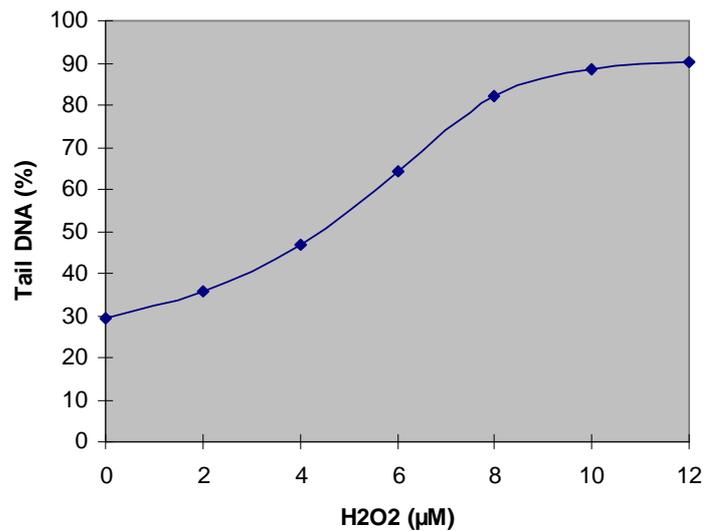
Sels	Concentration
KNO ₃	5 mM
Ca(NO ₃) ₂ , 4H ₂ O	5 mM
MgSO ₄ , 7H ₂ O	5 mM
KH ₂ PO ₄	1 mM
Tartrate de fer	9 μM

Annexe 2 : Courbes de calibration du Comet assay

Comet cellulaire : incubation des racines pendant 1 h, dans une solution de Hoagland contenant diverses concentrations en H_2O_2 .



Comet acellulaire : incubation des lames (sur lesquelles sont fixées les noyaux) pendant 1 h, dans une solution d'incubation (1 M NaCl, 10 mM Trizma) contenant diverses concentrations en H_2O_2 .



Annexe 3 : Analyse des ultrastructures cellulaires

Les échantillons de feuilles et racines subissent d'abord une étape de fixation dans du tampon Cacodylate 0.05M à pH 4.7, additionné de glutaraldéhyde 2.5%. Ils sont ensuite progressivement déshydratés, grâce à des bains successifs d'éthanol, en concentrations croissantes (de 20 à 100%), puis plongés progressivement dans la résine LR White (medium grade anylic resine), afin de réaliser l'inclusion des échantillons. Les bains dans la résine sont effectués dans des mélanges à concentrations croissantes en résine : tout d'abord 1/3 de résine et 2/3 d'éthanol, puis 2/3 de résine et 1/3 d'éthanol et enfin 100% résine. Ensuite, les échantillons sont déposés dans des gélules, contenant de la résine pure, puis placés au four à 70°C pendant une nuit, afin de faire polymériser la résine. Après refroidissement, les gélules sont découpées en coupes semi-fines à l'aide d'un couteau diamant histo (Leica microsystemes). Ces coupes sont réalisées à l'IFR 40 à l'INRA d'Auzeville-Tolosane en collaboration avec Alain Jauneau. Les coupes sont ensuite déposées sur des lames et colorées au bleu de Toluidine 0.1%. Cette coloration permet une visualisation des structures à l'échelle tissulaire, par observation en microscopie optique. Les tissus prennent une couleur variable en fonction de leur composition et de leur acidité. Les parois des tissus lignifiés par exemple apparaissent bleu foncé intense, les parois riches en pectine acide quand à elles apparaissent plus claires et peuvent prendre des teintes roses.

Résumé :

Le plomb est un des métaux les plus utilisés par l'Homme mais c'est aussi l'un des plus toxiques. Dans les écosystèmes, la teneur en plomb d'origine anthropique n'a cessé d'augmenter depuis plusieurs siècles. Dans plusieurs régions en France, le plomb pose actuellement des problèmes importants en matière de contamination de l'environnement. Les plantes, du fait de leur immobilité, sont particulièrement exposées. De nombreuses études ont déjà évalué la toxicité de ce métal sur les végétaux, mais la très grande majorité a utilisé des concentrations en plomb très largement supérieures à celles pouvant se retrouver dans des sites pollués. Le but de ces travaux a été d'évaluer sur une espèce sentinelle, *Vicia faba*, la toxicité de doses de plomb réalistes. Nous avons montré que le plomb pénétrait rapidement dans le système racinaire et générait, après seulement quelques heures, un important stress oxydatif à l'origine d'une peroxydation lipidique et de l'induction d'effets génotoxiques dans les cellules racinaires : cassures au niveau de l'ADN et induction d'aberrations chromosomiques. Nous avons pu mettre en évidence que la source de ce stress oxydatif était directement liée à l'activation de NADPH oxydases racinaires via une calmoduline kinase. L'utilisation d'inhibiteurs de cette enzyme et d'antioxydants a permis de montrer que la production d'espèces réactives de l'oxygène, initiée par la NADPH oxydase, était impliquée dans la toxicité du plomb et plus particulièrement dans sa génotoxicité.

Mots-clefs :

Plomb, stress oxydatif, phytochélatine, *Vicia faba*, peroxydation lipidique, glutathion, génotoxicité, NADPH oxydase, Espèces Réactives de l'Oxygène

Abstract :

Lead contamination of ecosystems from human sources has increased for centuries. Owing to their immobility, plants are specially exposed. The goal of this study was to assess the toxicity of realistic lead doses on *Vicia faba*. We demonstrated that lead uptake in roots was quick. After only few hours, lead uptake induced an important oxidative stress in *Vicia faba* roots. This oxidative stress caused lipid peroxidation and genotoxic effects on roots cells: DNA strand breaks and chromosomal aberrations. We also demonstrated that NADPH oxidase activation via a calmodulin kinase was implicated in oxidative stress generation. The use of antioxidant and NADPH oxidase inhibitors highlighted that NADPH oxidase-mediated ROS production was implicated in lead toxicity and genotoxicity.

Key words:

Lead, oxidative stress, phytochélatine, *Vicia faba*, lipid peroxidation, glutathione, genotoxicity, NADPH oxidase, Reactive oxygen species