



Modifications métaboliques, moléculaires et génotoxicité induites par le cadmium chez *Vicia faba*

Dalila Souguir

► **To cite this version:**

Dalila Souguir. Modifications métaboliques, moléculaires et génotoxicité induites par le cadmium chez *Vicia faba*. Biologie végétale. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II; Université d'Auvergne - Clermont-Ferrand I; Université du 7 Novembre, Carthage, Tunisie, 2009. Français. <NNT : 2009CLF21937>. <tel-00725461>

HAL Id: tel-00725461

<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00725461>

Submitted on 27 Aug 2012

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE DU 7 NOVEMBRE A CARTHAGE
Faculté des Sciences de Bizerte, Tunisie

UNIVERSITE BLAISE PASCAL
Clermont Ferrand-II, France

UNIVERSITÉ D'Auvergne
Clermont Ferrand-II, France

N° D.U. 1937

ANNEE 2009

ECOLE DOCTORALE
DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE
N° d'ordre 503

Thèse de Doctorat en co-tutelle

Présentée par

Melle SOUGUIR Dalila

Pour l'obtention du grade de:

DOCTEUR D'UNIVERSITE
(Spécialité: Sciences Biologiques)

*Modifications métaboliques, moléculaires
et génotoxicité induites par le cadmium chez Vicia faba*

Soutenue publiquement le **26 Juin 2009** devant le jury composé de :

Mr Ezzeddine AOUBANI (Professeur, Faculté des Sciences de Bizerte)	Président
Mme Huguette SALLANON (Professeur, Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse)	Rapporteur
Mr Ahmed LANDOULSI (Professeur, Faculté des Sciences de Bizerte)	Rapporteur
Mr Moez JEBARA (Maître de conférences, CB Borj Cédria)	Examineur
Mme Pascale GOUPIL (Maître de Conférences, Université Blaise Pascal, Clermont ferrand)	Examinatrice
Mr Ali RAÏS (Professeur, Faculté des Sciences de Tunis)	Examineur
Mr Gérard LEDOIGT (Professeur, Université Blaise Pascal, Clermont ferrand)	Directeur de thèse
Mr Ezzeddine FERJANI (Professeur, Faculté des Sciences de Bizerte)	Directeur de thèse

Laboratoire de Bio-Physiologie Cellulaires Végétales

Laboratoire d'Autosurveillance Cellulaire "ERTAC-PIAF "

A l'âme de mon père

A l'âme de ma sœur

Qui sont toujours présents dans mon cœur

Dédicaces

A ma mère

A mes chers frères

A mes chères soeurs

A mes beaux frères

A ma belle sœur

A mes nièces et mes neveux

*A tous ceux que j'aurais oublié de citer mais qui existent au fond de mon
cœur et de ma pensée*

Remerciements

C'est avec un réel plaisir que je réserve ces lignes en signe de gratitude et de profonde reconnaissance à tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation et à l'aboutissement de ce travail.

Je tiens tout d'abord à remercier mes directeurs de thèse: Monsieur Ezzeddine EL FERJANI, Professeur à la Faculté des Sciences de Bizerte et Monsieur Gérard LEDOIGT, Professeur à l'Université Blaise Pascal de Clermont ferrand qui n'ont épargné aucun effort pour que ce travail s'effectue dans les meilleures conditions. Je voudrais leur exprimer ma profonde gratitude pour l'accueil bienveillant qu'ils ont su me réserver au sein de leurs équipes de recherche depuis le jour où j'ai commencé la préparation de mon mastère et pour avoir guidé mes pas sur la voie de la recherche scientifique. Leur soutien s'est avéré déterminant pour mener ce travail à terme.

Si aujourd'hui, je suis parvenue à achever ma thèse, c'est grâce à leurs encadrements et leurs encouragements. Je leur exprime mon admiration pour leurs grandes qualités tant scientifiques qu'humaines.

Pour ses précieux conseils de tout ordre, sa disponibilité, sa patience et sa gentillesse lors de mon séjour à Clermont ferrand, je remercie tout particulièrement Madame Pascale GOUPIL, Maître de conférences à l'Université Blaise Pascal de Clermont ferrand. Elle m'a aidé énormément dans la réalisation de la partie moléculaire de ce travail et dans la rédaction de mes articles. Ses commentaires et ses suggestions ont été fort judicieux et appréciés lors de la correction de ma thèse. Je la remercie également d'être présente parmi les membres de jury de ma thèse. Qu'elle trouve ici les marques de ma reconnaissance et de mon respect.

Je suis particulièrement reconnaissante à Monsieur Ezzeddine AOUANI, Professeur à la Faculté des Sciences de Bizerte pour l'honneur qu'il m'a fait d'avoir accepté la présidence du jury de ma thèse. Qu'il soit assuré de ma respectueuse considération.

Je remercie énormément Madame Huguette SALLANON, Professeur à l'Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse et Monsieur Ahmed LANDOULSI, Professeur à la Faculté des Sciences de Bizerte d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce manuscrit.

Mes remerciements s'adressent aussi à Monsieur Moez JEBARA, Maître de conférences au CBBC et Monsieur Ali RAÏS, Professeur à la Faculté des Sciences de Tunis qui ont bien voulu accepter d'examiner mon mémoire de thèse.

Je tiens à remercier aussi Monsieur Béchir AZIB, technicien à la Faculté des Sciences de Bizerte pour son aide permanente.

Je ne dois pas oublier de remercier Monsieur Othman BOUSANDEL, pour l'aide qu'il m'a accordée lors des dosages par spectrométrie d'absorption atomique.

Il m'est très agréable de remercier Yolande, Céline, Boris, David, Dominique et tous mes amis à la cité universitaire des Cézeaux; Wassim, Senda Aïcha, Imen, Chaima, Khaoula, Housseem et sa famille de m'avoir acceptée entre eux et de m'avoir beaucoup aidée pour que je puisse effectuer mon travail dans les meilleures conditions.

Tous mes meilleurs remerciements à Rym, Ikram, Sonia, Houda, Mourad, Samir et Majed pour leurs encouragements et leurs aides.

Que tous mes collègues et amis au laboratoire de Biophysologie Végétales à la Faculté des Sciences de Bizerte (Monsieur Abdelilah, Tinni, Amira, Hager, Sondess, Saoussen, Moez) trouvent ici l'expression de ma profonde amitié.

Je remercie enfin mes frères, mes sœurs et ma mère qui ont tant fait pour moi et qui sans leurs encouragements, soutien et amour, je n'aurais jamais pu mener à terme ce travail. Qu'ils trouvent ici le témoignage de toute ma gratitude.

Sommaire

Introduction générale.....- 1 -

Synthèse bibliographique.....- 3 -

I. La contamination de l'environnement par les métaux lourds	- 3 -
II. Le Cd dans la plante	- 3 -
III. Effets des métaux lourds	- 5 -
1. Sur la croissance.....	- 5 -
2. Sur la photosynthèse.....	- 6 -
3. Sur la nutrition minérale.....	- 8 -
4. Induction des espèces réactives de l'oxygène	- 8 -
4.1. Définition d'un stress oxydant	- 10 -
4.2. Système antioxydant	- 11 -
4.2.1. Systèmes antioxydants enzymatiques	- 11 -
4.2.1.1. La superoxyde dismutase	- 11 -
4.2.1.2. La catalase (CAT)	- 12 -
4.2.1.3. La gaïacol peroxydase (GPX)	- 13 -
4.2.1.4. L'ascorbate peroxydase (APX).....	- 13 -
4.2.1.5. La monodéhydroascorbate réductase (MDHAR).....	- 14 -
4.2.1.6. La déhydroascorbate réductase (DHAR)	- 14 -
4.2.1.7. La glutathion réductase (GR)	- 14 -
4.2.2. Antioxydants non-enzymatiques	- 16 -
5. Sur l'intégrité membranaire	- 16 -
6. Sur le génome nucléaire	- 17 -
6.1. Avantages de l'utilisation des plantes supérieures dans les tests de génotoxicité	- 21 -
6.2. Les différents tests de génotoxicité associés aux plantes supérieures.....	- 22 -
6.2.1. Clastogénicité	- 22 -
6.2.2. Aneugénicité.....	- 24 -
6.2.3. Induction de micronoyaux.....	- 24 -
6.2.4. Induction des échanges de chromatides sœurs (SCEs)	- 25 -
6.2.5. Test des comètes.....	- 25 -
6.3. Exemples de tests de génotoxicité associés aux plantes supérieures	- 26 -
6.4. Génotoxicité du Cd.....	- 27 -
7. Sur l'expression des gènes	- 28 -

Matériel et Méthodes.....- 31 -

I. Matériel végétal et conditions de culture	- 31 -
1. Germination des graines.....	- 31 -
2. Culture hydroponique.....	- 31 -
3. Traitement métallique et récolte des plantules	- 33 -
II. Préparation des minéralisats et dosage des éléments minéraux	- 33 -
III. Dosage des pigments photorécepteurs	- 34 -
IV. Analyse des lipoperoxydes membranaires	- 34 -

1. Extraction	- 34 -
2. Dosage	- 34 -
V. Dosage du superoxyde d'oxygène	- 35 -
VI. Dosage du peroxyde d'hydrogène	- 35 -
VII. Dosage de l'activité lipoxigénase (LOX)	- 35 -
VIII. Mesure de l'intégrité cellulaire	- 36 -
IX. Détermination de l'activité des enzymes antioxydantes	- 36 -
1. Extraction	- 36 -
2. Dosage des protéines	- 36 -
3. Dosage des activités enzymatiques par spectrophotométrie	- 37 -
3.1. Détermination de l'activité de la superoxyde dismutase	- 37 -
3.2. Détermination de l'activité de la catalase	- 37 -
3.3. Détermination de l'activité de la gaïacol peroxydase	- 38 -
3.4. Détermination de l'activité de l'ascorbate peroxydase (APX)	- 38 -
3.5. Détermination de l'activité de la monodéhydroascorbate réductase (MDHAR) ..	- 38 -
3.6. Détermination de l'activité de la déhydroascorbate réductase (DHAR)	- 39 -
3.7. Détermination de l'activité de la glutathion réductase	- 39 -
X. Mesure des métabolites anti-oxydants	- 40 -
1. Extraction	- 40 -
2. Dosage	- 40 -
2.1. Dosage de l'ascorbate et du déhydroascorbate	- 40 -
2.1.1. Détermination de l'acide ascorbique libre	- 40 -
2.1.2. Détermination de l'acide ascorbique total	- 40 -
2.2. Dosage du glutathion réduit et oxydé	- 41 -
2.2. a. Principe de la méthode de "recyclage par DTNB-GR" pour doser le GSH _T (GSH+GSSG)	- 41 -
2.2. b. Principe de la méthode de "recyclage par DTNB-GR" pour doser le GSSG ..	- 42 -
2.2. c. Détermination de la teneur en glutathion réduit (GSH)	- 42 -
2.3. Dosage des thiols non-protéiques acido-solubles (SH _T) (pH<1)	- 43 -
2.4. Estimation des teneurs en phytochélatines	- 43 -
XI. Dosage des phénols	- 43 -
XII. Extraction des ARN totaux et PCR quantitative en temps réel	- 44 -
1. Extraction des ARN	- 44 -
2. Dosage des ARN par spectrophotométrie	- 44 -
3. Electrophorèse des ARN sur gel d'agarose	- 45 -
4. Synthèse des ADN complémentaires	- 45 -
5. Polymerase Chain Reaction: PCR	- 46 -
5.1. Choix des amorces	- 46 -
5.2. PCR de contrôle	- 46 -
5.3. Séquençage	- 47 -
5.4. PCR quantitative en temps réel	- 47 -
5.5. Quantification de l'ADN par la détection de fluorescence	- 48 -
5.5.1. Cycle-seuil et nombre de copies initiales	- 48 -
5.5.2. Quantification relative	- 49 -
5.5.3. Techniques des 2 ^{-Δ(ΔCt)}	- 49 -
XIII. Indice mitotique et numérisation des micronoyaux	- 50 -

Résultats et Discussion.....- 51 -

Chapitre I : Effets du cadmium sur la croissance et accumulation intracellulaire du cadmium chez la fève

I. Introduction.....	- 51 -
II. Résultats.....	- 51 -
1. Effets du Cd sur certains paramètres de la croissance et l'hydratation des tissus chez la fève.....	- 51 -
1.1. Symptômes de toxicité de Cd.....	- 51 -
1.2. Effets de Cd sur les biomasses fraîche et sèche et sur la teneur en eau.....	- 51 -
2. Effets de Cd sur les pigments photorécepteurs.....	- 54 -
3. Effets de Cd sur la nutrition minérale.....	- 58 -
4. Accumulation de Cd.....	- 58 -
III. Discussion.....	- 63 -

Chapitre II : Effets du cadmium sur le métabolisme oxydant chez la fève

Partie 1: Etude du stress oxydant chez la fève.....- 68-

I. Introduction.....	- 68 -
II. Résultats.....	- 68 -
1. Effet de Cd sur l'accumulation des lipoperoxydes.....	- 68 -
2. Effet de Cd sur la production de l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$).....	- 70 -
3. Effet de Cd sur la production du peroxyde d'hydrogène.....	- 70 -
4. Effet de Cd sur l'activité lipoxygénasique.....	- 73 -
5. Effet de Cd sur l'intégrité cellulaire.....	- 73 -

Partie 2: Effets de cd sur les activités enzymatiques antioxydantes.....- 76 -

I. Introduction.....	- 76 -
II. Résultats.....	- 76 -
1. Les superoxydes dismutases.....	- 76 -
2. La catalase.....	- 78 -
3. La gaïacol peroxydase.....	- 78 -
4. Cycle ascorbate-glutathion.....	- 78 -

Partie 3: Effets de Cd sur les systèmes antioxydants non enzymatiques....- 89 -

I. Introduction.....	- 89 -
II. Résultats.....	- 89 -
1. Teneur en ascorbate.....	- 89 -
2. Teneur en glutathion.....	- 91 -
3. Teneur des groupements thiols non-protéiques et estimation de la teneur en phytochélatines.....	- 96 -
4. Teneur en phénols.....	- 100 -

Partie 4: Discussion.....- 103 -

Chapitre III : Effets du cadmium sur l'expression de gènes liés au stress métallique

I. Introduction.....	- 112 -
II. Résultats.....	- 112 -
1. Analyse électrophorétique des ARN	- 112 -
2. Contrôle de l'intégrité des ADNc: PCR de contrôle	- 114 -
3. Quantification relative des ARN sur gel d'agarose	- 114 -
4. Séquençage des produits PCR.....	- 116 -
5. Validation du gène de référence : l'Actine.....	- 116 -
4. PCR semi-quantitative en temps réel (qPCR)	- 120 -
4.1. Analyse de la spécificité de la qPCR	- 120 -
4.2. Dosage semi-quantitatif des séquences cibles.....	- 122 -
III. Discussion	- 124 -

Chapitre IV : Effets génotoxiques du cadmium chez la fève

I. Introduction.....	- 130 -
II. Résultats.....	- 130 -
1. Effets de Cd sur la variation de l'indice mitotique	- 130 -
2. Effets de Cd sur l'induction des micronoyaux	- 130 -
3. Effets de Cd sur l'induction d'aberrations chromosomiques	- 130 -
III. Discussion	- 143 -

Discussion générale.....- 147 -

Conclusion générale et Perspectives.....- 153 -

Références Bibliographiques.....- 157 -

Annexes.....- 175 -

Abréviations

°C	degré celsius
µg	microgramme
µL	microlitre
µM	micromole par litre
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc:	acide désoxyribonucléique complémentaire
APX	ascorbate peroxydase
ARN	acide ribonucléique
ARNm	acide ribonucléique messenger
ASA	ascorbate
BET	Bromure d'éthidium
BSA	Bovin serum albumin
CAT	catalase
cm	centimètre
Cu-Zn SODCy	Cu-Zn superoxyde dismutase cytosolique
DHA	déhydroascorbate
DHAR	déhydroascorbate réductase
DNTP	désoxynucléoside triphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
DTAP	acide diéthylène triamine pentaacétique
DTNB	5-5'-dithiobis (acide -2- nitrobenzoïque
DTT	dithiothreitol
Fe SOD	Fe superoxyde dismutase
GPX	gàïacol peroxydase
GR	glutathion réductase
GSH	glutathion réduit
GSH _T	glutathion total
GSSG	glutathion oxydé
HSP	protéines de choc thermique
L	litre
LOX	lipoxigénase
M	mole par litre
MDA	malondialdéhyde
MDHA	monodéhydroascorbate
MDHAR	monodéhydroascorbate réductase
MF	matière fraîche
mg	milligramme
min	minute
mL	millitre
mM	millimole par litre
Mn SOD	Mn superoxyde dismutase
MS	matière sèche
MT	métallothionéine
NAD(P)	nicotinamide adénine dinucléotide (phosphate)
NBT	nitrobleu de tétrazolium
nm	nanomètre
pb	paires de bases
PC	phytochélatine
PCR	réaction de polymérisation en chaîne (<i>polymerase chain reaction</i>)

q.s.p	quantité suffisante pour
RNase	ribonucléase
ROS	espèces réactives de l'oxygène (Reactive Oxygen Species)
RT	<i>Reverse Transcriptase</i>
RT-PCR	<i>Reverse Transcription-PCR</i>
SDS	Dodécyl sulfate de sodium
SOD	superoxyde dismutase
Taq polymérase	polymérase à ADN de <i>thermophilus aquaticus</i>
TCA	acide trichloroacétique
Tm	Melting Temperature
UE	unité enzymatique
UV	ultraviolet
V	volts
V	volume
v/v	volume par volume
w/v	poids par volume
ϵ	coefficient d'extinction molaire

Introduction générale

Les activités urbaines, industrielles et agricoles sont responsables d'une contamination croissante des sols et de l'eau par les ions métalliques. Les plantes sont directement exposées à ces éléments dont le potentiel toxique est indéniable.

Les ions métalliques peuvent être toxiques en activant les formes réduites de l'oxygène pour aboutir à la formation d'espèces radicalaires qui en réagissant avec les molécules essentielles de l'architecture de la plante tels que les acides nucléiques, les protéines ou les lipides, engendrent des dégâts cellulaires, des dysfonctionnements enzymatiques ou la peroxydation des lipides.

Les mécanismes de réponse des plantes à la toxicité métallique restent compliqués. Toutefois, trois principes de base peuvent être annoncés (**Briat et Lebrun, 1999**):

a- la régulation de l'acquisition racinaire, du transport "longue distance" entre organes et de la distribution intracellulaire sont nécessaires pour contrôler la surcharge métallique.

b- les nombreuses variations de l'environnement subies par les plantes peuvent conduire à une augmentation des concentrations intracellulaires de métaux. Des systèmes efficaces de stockage et de détoxification de ceux-ci doivent donc être activés dans ces conditions.

c- en cas de dépassement des capacités de stockage des ions métalliques sous forme non toxique, la balance redox cellulaire sera déplacée vers un état pro-oxydant. L'activation par les métaux en excès des systèmes de détoxification des formes réduites de l'oxygène participera donc à la protection des plantes quand les contrôles opérant au niveau du transport et du stockage seront dépassés.

Les végétaux vont mobiliser des systèmes de défense anti-espèces oxydantes: l'un enzymatique et l'autre non-enzymatique impliquant différents composés qui possèdent une affinité pour les radicaux libres et peuvent être considérés comme des "pièges" ou des antioxydants.

La cellule possède des systèmes de réparation. Parmi eux, certains réparent l'ADN en totalité et ne laissent aucune trace de l'attaque de l'ion métallique. D'autres assurent la survie de la cellule quand les premiers sont dépassés. L'endommagement de l'ADN, évalué par l'altération de la division cellulaire et l'induction des anomalies chromosomiques qui touchent la structure et le nombre des chromosomes, a fait l'objet de nos travaux de recherche en mastère. En effet, notre présent travail est la continuation d'une étude comparative de l'effet génotoxique de deux métaux lourds, cadmium et cuivre, chez des plantes cultivées : *Pisum*

sativum et *Vicia faba* qui a révélé une sensibilité plus importante de *Vicia faba* vis-à-vis des deux métaux testés, le Cd apparaissant plus génotoxique que le Cu. Ces résultats nous ont mené à choisir *Vicia faba* comme plante modèle et le Cd comme élément inducteur du stress métallique.

Lors de notre présent travail et dans le but de mieux comprendre la réponse des plantules de fève au stress causé par la présence du cadmium, plusieurs points ont été analysés:

- ⇒ L'effet du cadmium sur la croissance et sa cinétique d'accumulation intracellulaire.
 - ⇒ L'effet du cadmium sur le métabolisme oxydant. L'analyse de cette partie a été initiée par la détermination de certains paramètres témoignant de l'établissement du stress oxydant tels que la lipoperoxydation membranaire, les espèces réactives de l'oxygène et l'intégrité cellulaire. Les réponses enzymatiques et non-enzymatiques ont été étudiées aussi.
 - ⇒ L'effet du cadmium sur l'expression de certains gènes impliqués dans le stress (protéines de stress de type HSP), dans les mécanismes de résistance (les métallothionéines) et dans le métabolisme antioxydant (enzymes antioxydantes).
 - ⇒ L'effet du cadmium sur la division cellulaire et l'induction des aberrations chromosomiques.
-

Synthèse bibliographique

I. La contamination de l'environnement par les métaux lourds

Les métaux sont des constituants naturels des roches et des sols. Ces métaux sont présents à l'état de trace d'où le nom "éléments traces métalliques". Leurs sources d'émission dans l'environnement sont très nombreuses et difficiles à limiter, les plus importantes sont d'origine anthropique (industries, fonderies, engrais chimiques...). Les engrais chimiques, en particulier les fertilisants phosphatés sont des produits non purifiés et contiennent de ce fait des quantités variables d'impuretés parmi lesquelles les métaux lourds occupent une place de premier plan (**Mulla et al., 1980; Mortvedt et al., 1981**).

Les boues résiduaires d'origine urbaine constituent une autre source de contamination des zones agricoles par les métaux lourds. Certains métaux lourds sont présents en grande quantité dans ces boues (**Cabrea et al., 1994; Petruzelli et al., 1994; Terslov, 1997**). En effet, ces dernières renferment des éléments traces sous différentes formes: à l'état ionique libre, sous forme de précipités d'hydroxydes, fixés sur des particules solides en suspension ou bien sous forme de complexes organométalliques (**Rejeb, 1990**). En plus de ces métaux lourds, ces boues contiennent des composés organiques dangereux (**Rogers, 1996; Terslov et al., 1997**) dont certains sont des mutagènes comme la nitrosamine, les PCB, le dibenzo-p-dioxine polychlorinate et le furan (PCDD/F) et les hydrocarbures polyaromatiques (HAP).

Il existe d'autres sources de contamination de l'environnement par les métaux lourds reposant sur l'utilisation des produits phytosanitaires essentiellement les herbicides, les insecticides et les fongicides mercuriels et cupriques destinés au traitement des cultures ou à la conservation des semences. Ces produits contribuent à la toxicité du sol par des éléments traces.

Parmi les métaux lourds, le Cd est un élément trace assez rare dans la croûte terrestre (0.3ppm). Son rejet lié aux activités anthropiques est environ 10 fois plus important que celui provenant des sources naturelles comme les volcans (**Wagner, 1993**). Aussi, les teneurs du sol en Cd sont notablement plus élevées au voisinage des mines (**Baker, 1987**) et des foyers industriels (**Humphreys et Nicholis, 1984**).

II. Le Cd dans la plante

Le Cd est un métal lourd, toxique pour l'Homme, les animaux et les végétaux. Sa pénétration dans la plante se fait par le système racinaire (**Salt et al., 1995; Sanita di Toppi et Gabbrielli, 1999; Liu et al., 2007**). En effet, les racines constituent la voie principale par laquelle les éléments métalliques peuvent transiter de la solution du sol vers le tissu végétal.

Culter et Rains (1974) ont montré que l'absorption de Cd par des racines excisées d'orge se fait, probablement, par simple diffusion alors que chez d'autres espèces végétales, l'absorption se fait sous contrôle métabolique.

L'absorption du Cd dépend de la composition de la solution du sol, son pH, sa quantité de matière organique et sa concentration en d'autres ions. En effet, à des pH élevés, la biodisponibilité du Cd est faible. L'humidité du sol peut augmenter aussi cette biodisponibilité en favorisant l'activité des microorganismes et en augmentant la conductivité hydraulique du sol favorisant ainsi la diffusion des ions métalliques vers la surface racinaire. La température du sol est un facteur susceptible d'influencer d'une manière indirecte la biodisponibilité des métaux lourds.

Le transport des ions métalliques par les racines des végétaux s'effectue dans la solution du sol rhizosphérique en contact avec les cellules de l'épiderme par deux voies distinctes: la voie apoplasmique et la voie symplasmique.

L'apoplasme est constitué par l'ensemble des espaces intercellulaires présents dans les tissus en avant de la bande de caspary. Il constitue "l'espace de Donnan" car il existe de nombreuses charges négatives à la surface de la paroi des cellules (en particulier les groupements carboxyles des acides uroniques) qui créent un équilibre de Donnan favorisant l'absorption des cations. La fixation des éléments chimiques dans l'apoplasme s'effectue suivant leur affinité pour les pectines des parois (Pb>Cu>Cd>Zn) (**Hart et al., 1998**).

La voie d'entrée symplasmique correspond à un transport de cellule à cellule à travers les membranes plasmiques. Pour la plupart des métaux ou des métalloïdes, on suppose que le transport du milieu extérieur vers le milieu intérieur des cellules met en contribution des transporteurs de nature protéique dont l'existence a été mise en évidence, chez certaines espèces végétales (**Mullins et Sommers, 1986**). Des transporteurs pour le fer (IRT, Nramp), pour le zinc (ZIP), pour le cuivre (COPT) ont ainsi déjà été identifiés. Des métaux comme le cadmium et le manganèse semblent utiliser les transporteurs du fer. D'ailleurs, une carence en fer induite par une surexpression de ferritine conduit à augmenter le prélèvement de Cd, Mn et Zn (**Vansuyt et al., 2000**).

Dans la plante, la quantité de métal accumulée dépend de l'organe : Un gradient d'accumulation semble s'établir selon les organes : Racines > Feuilles > Tiges > Inflorescence > Graines; mais cet ordre varie selon les espèces. Le Cd est fortement accumulé au niveau de la partie souterraine, organe en contact direct avec le métal, chez la plupart des espèces végétales (**Dixit et al., 2001; Baccouche et al., 2001; Iannelli et al., 2002; Chaiffi, 2003; Gichner et al., 2004; Mishra et al., 2006 ; Liu et al., 2007**). D'ailleurs certains

auteurs ont suggéré que cette accumulation racinaire pourrait être une stratégie pour limiter son transport vers la partie aérienne et donc défendre le système aérien de l'intoxication par le métal (Jarvis et al., 1976). La capacité des feuilles à accumuler ce métal peut aussi dépendre de leur âge (Godzik, 1993; Salt et al., 1995).

Au niveau des semences, le tégument de la graine constitue une barrière à l'absorption du métal par les graines en germination. Ceci a été montré par Lane et Martin (1982) et Obroucheva et al. (1998) qui ont rapporté que le Cd se trouvait principalement au niveau des cellules tégumentaires et qu'il n'atteignait pas l'embryon même à des concentrations létales.

III. Effets des métaux lourds

1. Sur la croissance

La mesure de la croissance est un paramètre biométrique souvent utilisée pour la détermination d'un éventuel effet phytotoxique des métaux lourds (Breckle, 1991; Jiang et al., 2000). Des études, visant à évaluer cet effet, ont été effectuées sur de nombreuses espèces notamment l'orge (Agarwala et al., 1977), le riz (Gupta et Mukherlji, 1977), la tomate (Mazhoudi et al., 1997), le haricot (Chaoui et al., 1997), le blé (Lin et al., 2007), le maïs (Baccouche et al., 1998) et le tournesol (Jouili et El Ferjani, 2003).

Dans les conditions environnementales, les métaux lourds pénètrent par les racines où ils causent les premiers dommages (Muller et al., 2000). Le Cd peut causer une réduction de la croissance des racines et des parties aériennes, un enroulement des feuilles, une chlorose foliaire et un brunissement racinaire (Sanita di Toppi et Gabbrielli., 1999; Mishra et al., 2006).

La croissance racinaire est très sensible au traitement par le Cd. Schützendübel et al. (2001) ont montré que des concentrations de 5 et 50 μ M de Cd induisent une réduction de 20% et 90% respectivement de l'élongation racinaire chez *Pinus sylvestris* suite à une exposition de 12 h. Une prolongation de la durée du traitement des racines en présence de 50 μ M de Cd a montré un arrêt de la croissance. Ceci est corrélé avec la forte accumulation de ce métal au niveau du système racinaire de la plante.

L'inhibition de la croissance racinaire peut résulter de l'interférence du Cd avec la division cellulaire et/ou l'élongation cellulaire (Seregin et Ivanov, 2001). Seregin et Ivanov (2001) ont illustré un schéma décrivant les mécanismes possibles qui sont à l'origine de la diminution de la division cellulaire et par la suite une réduction de la croissance en présence d'un stress métallique causé par le Cd ou le Pb. Parmi ces mécanismes, on peut noter la

diminution de la plasticité cellulaire, la stimulation de la synthèse de l'acide abscissique (ABA) et de l'éthylène, la diminution du pool de GSH, l'inhibition de la polymérisation des microtubules, l'induction des aberrations chromosomiques et la fixation directe de l'ion métallique à l'ADN (**Figure 1**).

La diminution de l'indice mitotique, qui reflète le nombre de cellules en division dans les zones méristématiques, a été montrée suite à un traitement par le Cd (**Clain et Daysson, 1977; Liu et al., 2003**). De plus, l'induction des micronoyaux et des anomalies qui touchent la structure et le nombre des chromosomes peuvent être également à l'origine de la diminution de la croissance racinaire (**Liu et al., 2003**).

Cependant, il a été démontré que des faibles concentrations de Cd (1-10 μ M) stimulent la croissance (**Lin et al., 2007; Aina et al., 2007**). Cette augmentation a été attribuée à l'effet des faibles concentrations de ce métal sur la stimulation de la division et la prolifération cellulaire aussi bien chez les animaux que les végétaux suite à des études sur des cultures cellulaires (**Von Zglinick et al., 1992; Beyersmann et Hechtenberg, 1997**). La stimulation de la prolifération cellulaire par des faibles concentrations de Cd peut être due à la capacité de ce métal à substituer Zn²⁺ qui assure la liaison de plusieurs facteurs de transcription aux régions régulatrices des gènes. Zn²⁺ est de plus un composant essentiel de plusieurs enzymes impliquées dans les processus de transcription et de traduction (**Sobkowiak et Deckert, 2003**).

2. Sur la photosynthèse

L'effet des métaux lourds sur la photosynthèse et la synthèse de la chlorophylle est largement documenté. L'inhibition de la photosynthèse causée par le Cd est due à un désordre de l'ultrastructure des chloroplastes, la diminution de synthèse de la chlorophylle, de la plastoquinone, des caroténoïdes, le transport des électrons, l'inhibition de l'activité des enzymes du cycle de Calvin et la déficience en CO₂ due à la fermeture des stomates (**Seregin et Ivanov, 2001; Sandalio et al., 2001; Mishra et al., 2006**).

Le Cd altère le transport des électrons du PSII (**Baszinsky et al., 1980**). Ceci est dû probablement au changement structural et fonctionnel des thylacoïdes et la réduction de l'activité de la ferredoxine-NADP⁺ réductase.

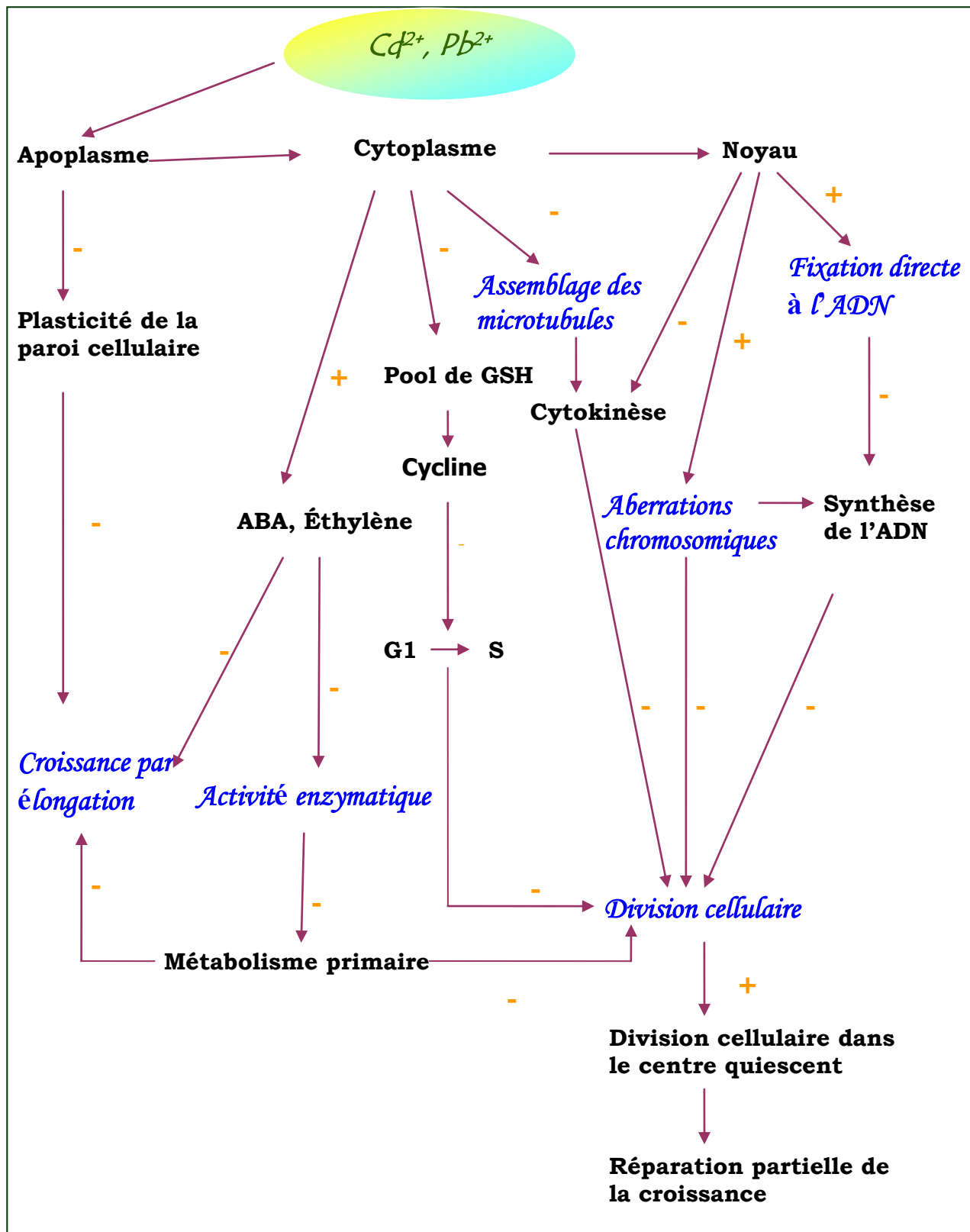


Figure 1: Différents mécanismes altérant la division cellulaire et la croissance suite à un stress métallique (GSH : Glutathion réduit ; G1: phase G1 ; S: phase S; +:stimulation; -: diminution) (Seregin et Ivanov, 2001).

3. Sur la nutrition minérale

La présence de Cd dans la solution nutritive peut agir sur l'absorption et l'accumulation des éléments nutritifs essentiels pour la croissance des plantes (**Sanita di Toppi et Gabbrielli, 1999; Sandalio et al., 2001; Aravind et Prasad, 2003; Elloumi et al., 2007**). Dans la plupart des cas, le Cd inhibe l'absorption des cations K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} et Fe^{3+} (**Srivastava et Jaiswal, 1990; Breckle, 1991; Ouariti et al., 1997**) et des anions NO_3^- (**Burzynski et Grabowski, 1984; Hernandez et al., 1997; Ouariti et al., 1997**).

Certains signes de toxicité des plantes par le Cd ont été attribués à des perturbations d'origine nutritionnelle. **Greger et Lindberg (1987)** ont montré que les plantules de *Beta vulgaris*, traitées par le Cd, développent des racines latérales courtes. Les mêmes auteurs ont supposé que ces signes sont dûs à une carence en approvisionnement calcique. La réduction des teneurs en calcium en présence d'un stress cadmique a été montrée aussi chez le pois (**Sandalio et al., 2001**). D'autres travaux ont montré que les chloroses et les nécroses qui se manifestent suite au traitement par le Cd sont corrélées à des déficiences en oligoéléments tels que : Fe, Cu et Mn (**Leita et al., 1991; Ouariti et al., 1997**).

4. Induction des espèces réactives de l'oxygène

Les ions métalliques peuvent être très toxiques en activant les formes réduites de l'oxygène aboutissant à la formation accrue des espèces réactives de l'oxygène ou ROS (**Radetski et al., 2004; Piquers et al., 1999**). Ces dernières réagissent avec les macromolécules tels que les lipides, les protéines et les acides nucléiques. Les ROS altèrent la composition lipidique des membranes plasmiques ce qui est à l'origine d'une peroxydation membranaire. Ils sont à l'origine d'une activation ou une désactivation de plusieurs enzymes tels que les enzymes intervenant dans le métabolisme oxydant. Au niveau du noyau, les ROS entraînent des dommages au niveau de l'ADN d'où une stimulation de la synthèse des poly (ADP-ribose) et une modification de l'expression de gènes (**Figure 2**). Il peut en résulter une altération des fonctions vitales de la cellule, conduisant parfois à sa mort (**Briat et Lebrun, 1999**).

Espèces oxygénées réactives

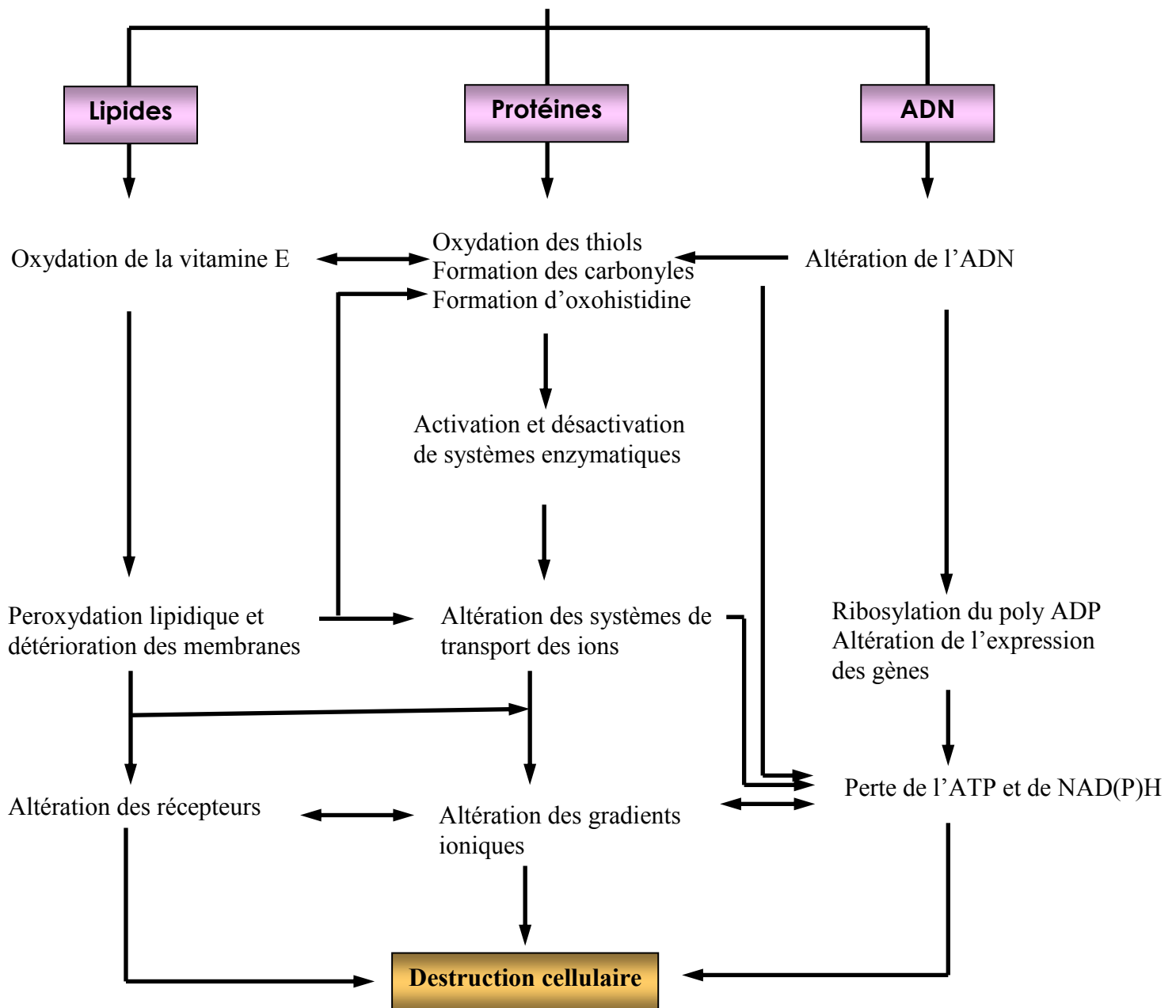


Figure 2: Effets biologiques cellulaires des espèces réactives de l'oxygène (Lefèvre et al., 1998).

4.1. Définition d'un stress oxydant

La terminologie de "stress oxydant" est généralement utilisée pour toute agression environnementale ayant pour conséquence une production accrue d'oxydants, molécules toxiques dérivées de l'oxygène.

La particularité des végétaux réside dans le fait qu'ils sont des producteurs de l'oxygène, molécule à la fois vitale et nocive. La présence de cette molécule entretient de surcroît toute une chaîne de réactions radicalaires ayant pour conséquence la génération de molécules oxydantes couramment appelées "espèces réactives de l'oxygène: Reactive oxygen species (ROS)". Les radicaux libres sont des espèces chimiques neutres ou chargées présentant dans leur orbite électronique externe un électron non apparié dit célibataire. Le radical libre est instable et très réactif et pour devenir stable il doit appairier son électron ou bien céder le sien à une autre molécule. Chacune de ces réactions aboutit à la formation de nouveaux radicaux libres. Dans les cellules végétales, les chloroplastes, les mitochondries et les peroxysomes sont les principales sources génératrices des ROS (**Hernandez et al., 1995; Lamb et Dixon, 1997**).

En général, la réduction partielle de l'oxygène par les électrons circulant à travers la chaîne des transporteurs d'électrons donne naissance à l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) (**Haliwell et Gutteridge, 1986**). L'anion superoxyde ainsi formé se trouve rapidement transformé en H_2O_2 (**Figure 3**) par la superoxyde dismutase (SOD) qui de ce fait joue un rôle important dans la lutte contre le stress oxydant dans la mesure où H_2O_2 est moins réactif que $O_2^{\cdot-}$.

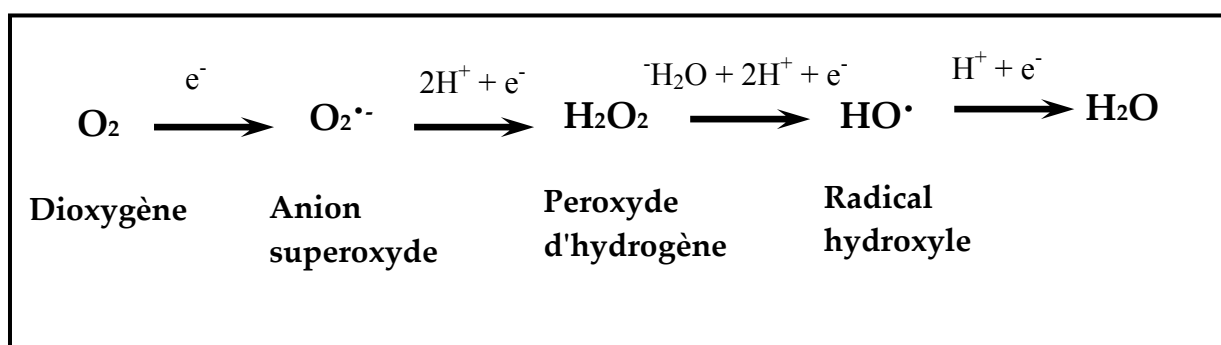


Figure 3: Réduction monovalente de l'oxygène

Le peroxyde d'hydrogène est une espèce stable, non radicalaire, mais toxique en raison de son pouvoir oxydant. Dans l'organisme, H_2O_2 peut diffuser à travers les membranes plasmique, mitochondriale, chloroplastique ou peroxysomale favorisant ainsi des perturbations à distance (**Schützendübel et al., 2001, Romero-Puertas et al., 2004**). Le

peroxyde d'hydrogène généré peut suivre la réaction de Haber-Weiss, dans laquelle le fer [Fe(II)] est un donneur d'électrons pour former le radical hydroxyle qui est très nocif.

Au niveau mitochondrial, le mécanisme principal de la production de l'anion superoxyde fait appel à la cytochrome oxydase et consiste en une réduction tétravalente directe de l'O₂ en H₂O. Un autre mécanisme minoritaire de la chaîne respiratoire consiste en l'oxydation spontanée de l'ubiquinone (Uq) par O₂ et la production de l'anion superoxyde (**McCord, 1985**).

Les ROS ont tendance, par leurs propriétés oxydantes à arracher des électrons à d'autres molécules comme les lipides membranaires, les protéines ou l'ADN des chromosomes aboutissant à la destruction des constituants cellulaires essentiels. Cependant, plusieurs auteurs ont montré que ces ROS jouent un rôle important dans le système de défense contre les pathogènes (**Doke, 1997; Bolwell et al., 2002**) et permettent la lignification et le déclenchement d'autres processus comme la mort cellulaire programmée (**Teichmann, 2001**). Elles jouent le rôle d'une molécule signal et alertent la cellule de la présence du stress environnant (**Rentel et Knight, 2004; Maksymiec, 2007**).

De ce fait, il est nécessaire pour la cellule de contrôler la quantité des ROS et non de l'éliminer complètement. Le contrôle de ces espèces est réalisé par le système antioxydant.

4.2. Système antioxydant

Le stress oxydant, conséquence naturelle du métabolisme de l'oxygène, est normalement contrôlé par des systèmes endogènes de défense antioxydante. Les antioxydants cellulaires peuvent être enzymatiques ou non-enzymatiques (**Cho et Seo, 2005**).

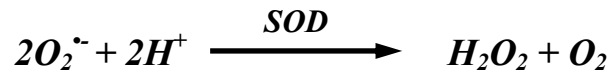
Généralement, l'augmentation des activités des enzymes impliquées dans les réactions de défense semble être liée à l'espèce ou à la variété végétale utilisée, aux conditions physiologiques de la plante utilisée, ou encore au type de stress oxydant appliqué.

4.2.1. Systèmes antioxydants enzymatiques

4.2.1.1. La superoxyde dismutase

Le rôle déterminant de la superoxyde dismutase (SOD) dans les systèmes de défense antioxydante de l'organisme est connu depuis 1968. On sait que l'ion superoxyde (O₂^{•-}) est le point de départ de la chaîne de production des radicaux libres. Or, dès ce stade précoce, la superoxyde dismutase inactive l'ion superoxyde en le transformant en peroxyde d'hydrogène

(H₂O₂). Celui-ci est ensuite rapidement catabolisé par la catalase et les peroxydases en dioxygène (O₂) et en molécules d'eau (H₂O).



La SOD présente divers isoformes comportant divers cofacteurs métalliques (Kliebenstein et al., 1998 ; Moran et al., 2003) tels que :

- ⇒ le cuivre et le zinc dans l'isoforme Cu-Zn SOD présent dans le cytosol, les chloroplastes, le noyau et l'apoplasme
- ⇒ le fer dans l'isoforme Fe SOD présent au niveau des chloroplastes
- ⇒ le manganèse dans l'isoforme Mn SOD présent au niveau des mitochondries et des peroxysomes.

En étudiant l'activité de différents isoformes de la SOD en présence d'un stress cadmique, **Drażkiewicz et al. (2007)** ont observé une diminution de l'activité Cu-Zn SOD et une augmentation de celle de Mn SOD et Fe SOD au niveau des feuilles d'*Arabidopsis thaliana* traitées par 5 et 50µM de Cd. Ces auteurs ont suggéré aussi qu'en présence d'un stress cadmique, l'activité de différents isoformes de SOD dépend de la quantité des ROS accumulée dans la cellule. En effet, les activités de Mn SOD et Cu-Zn SOD dépendent de la quantité de l'anion superoxyde alors que l'activité de Fe SOD dépend de la quantité de peroxyde d'hydrogène.

4.2.1.2. La catalase (CAT)

La catalase réagit efficacement avec H₂O₂ pour donner l'eau et l'O₂.



La catalase est localisée principalement dans les peroxysomes ; mais elle se trouve aussi dans le cytoplasme.

De nombreux travaux ont montré la diminution de l'activité de cette enzyme suite à un traitement par le cadmium chez *Pisum sativum* (Sandalio et al., 2001), *Phaseolus vulgaris* (Chaoui et al., 1997) et *Helianthus annuus* (Gallego et al., 1996). Cette baisse est due soit au fait que cette enzyme est associée aux peroxysomes qui contiennent des protéases, soit à sa

photoinactivation (Sandalio et al., 2001), soit à une déficience en Fe qui est un constituant du site actif de cette enzyme (Jurcsuk et al., 2004).

4.2.1.3. La gaïacol peroxydase (GPX)

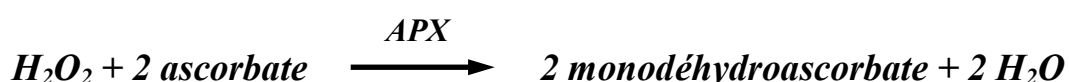
Plusieurs études ont montré que la gaïacol peroxydase (GPX) participe à de nombreux processus physiologiques comme le développement des plantes (Kay et Basile, 1987), la sénescence (Abdes et al., 1988), la biosynthèse des lignines (Kay et Basile, 1987), l'organogenèse via la dégradation de l'AIA (Schneider et Wightman, 1974) et la biosynthèse de l'éthylène. La GPX intervient dans des conditions de stress (Albert et Anderson, 1987). Elle possède une importante capacité potentielle à éliminer les formes actives d'oxygène. En effet, cette enzyme consomme le H₂O₂ en utilisant le gaïacol ou le pyrogallol comme donneur d'électrons selon la réaction suivante:



4.2.1.4. L'ascorbate peroxydase (APX)

L'ascorbate peroxydase (APX) est une enzyme impliquée dans l'élimination du peroxyde d'hydrogène lors d'un stress oxydant. C'est une enzyme clé du cycle ascorbate-glutathion (Figure 4).

L'ascorbate peroxydase réduit le H₂O₂ en H₂O en utilisant l'acide ascorbique comme donneur d'électrons selon la réaction:

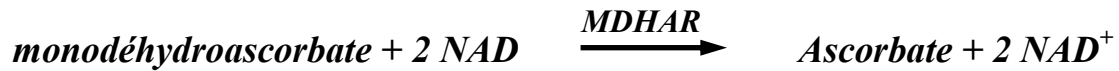


Chez les plantes supérieures, l'activité APX est localisée à la fois au niveau des chloroplastes (chAPX) et du cytosol (cytAPX) (Chen et Asada, 1989 ; Tanaka et al., 1991). Selon sa localisation, la chAPX présente deux isoformes: l'APX du stroma (sAPX) et l'APX thylacoïdale (tAPX) (Miyake et Asada, 1992; Miyake et al., 1993).

La tAPX élimine le H₂O₂ généré lorsque la chaîne de transfert d'électrons est surchargée au niveau des thylacoïdes (Miyake et Asada, 1992). Comparée à la cytAPX, l'activité de la chAPX est rapidement inactivée dans un milieu pauvre en ascorbate (Nakano et Asada, 1981; Chen et Asada, 1989).

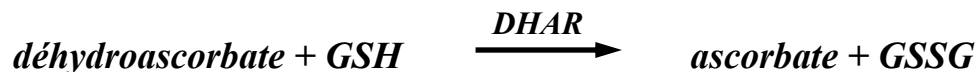
4.2.1.5. La monodéhydroascorbate réductase (MDHAR)

La monodéhydroascorbate réductase est une enzyme du cycle ascorbate-glutathion (**Figure 4**). Elle catalyse la réaction suivante :



4.2.1.6. La déhydroascorbate réductase (DHAR)

La déhydroascorbate réductase (DHAR) est une enzyme du cycle ascorbate-glutathion (**Figure 4**). Elle catalyse la conversion du déhydroascorbate en ascorbate en utilisant le GSH comme substrat selon la réaction suivante:



4.2.1.7. La glutathion réductase (GR)

La glutathion réductase (GR) joue un rôle essentiel dans la protection des chloroplastes contre le dommage oxydant en maintenant un rapport GSH/GSSG élevé (**Mishra et al., 2006**).

Cette enzyme catalyse la réduction de GSSG en GSH (glutathion réduit) selon la réaction suivante:



Au niveau du cycle ascorbate-glutathion, la GR élimine les peroxydes d'hydrogène en utilisant le NADPH comme donneur d'électrons. Sous l'effet d'un stress cadmique, l'activité de cette enzyme a été étudiée chez diverses espèces tels que *Phaseolus vulgaris* (**Chaoui et al., 1997**), *genus Alyssum* (**Schickler et Caspi, 1999**), *Helianthus annuus* (**Gallego et al., 1996**), *Cuscuta reflexa* (**Srivastava et al., 2004**) et *Bacopa monnieri* (**Mishra et al., 2006**).

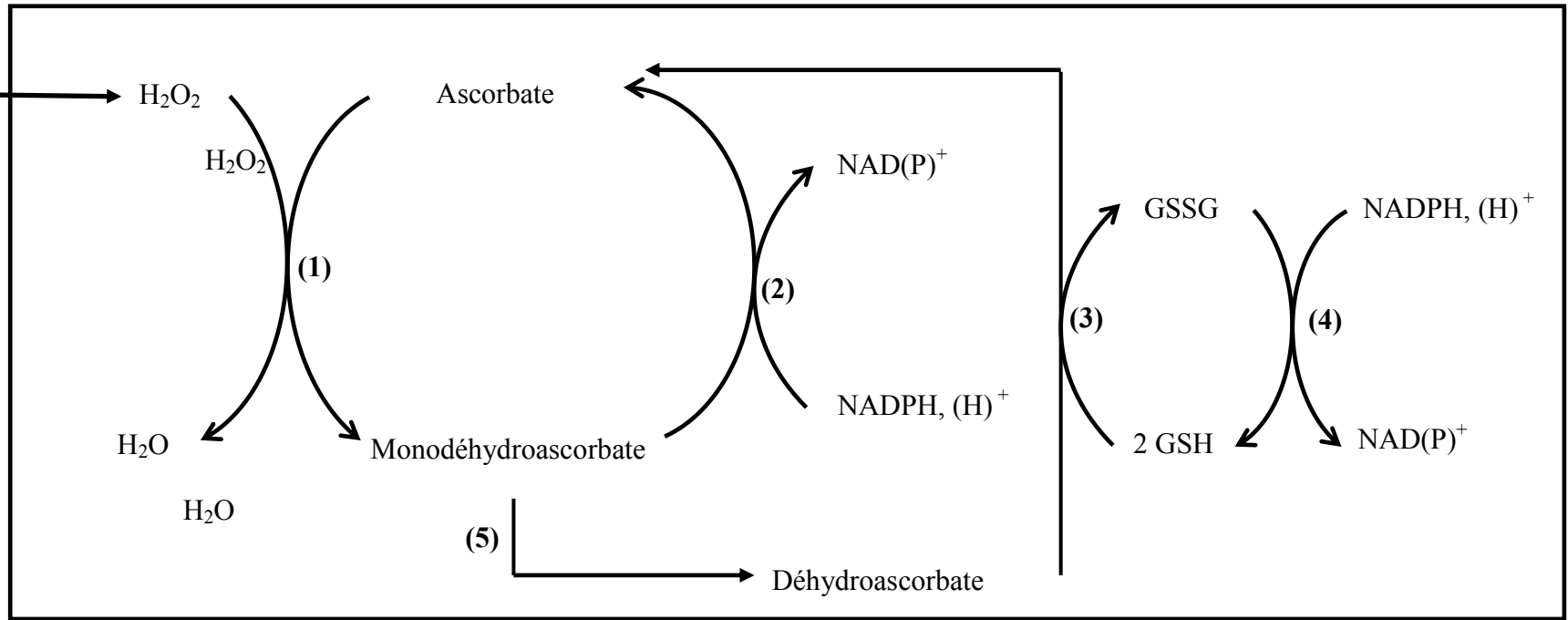


Figure 4 : Cycle Ascorbate-glutathion (Asada et Takahashi, 1987)

- 1:** Ascorbate peroxydase **2:** Monodéhydroascorbate réductase **3 :** Déhydroascorbate réductase
4: Glutathion réductase **5:** Réaction spontanée **GSSG :** Glutathion oxydé **GSH :** Glutathion réduit.

4.2.2. Antioxydants non-enzymatiques

• L'ascorbate est un antioxydant de l'apoplasme (**Castillo et Greppin, 1988**). L'ascorbate joue le rôle de donneur d'électrons terminal dans le processus de désactivation des radicaux libres tels que $O_2^{\cdot-}$ et H_2O_2 . En plus de son rôle comme antioxydant primaire, l'acide ascorbique possède d'importantes fonctions comme antioxydant secondaire.

L'ascorbate participe également à l'action des dioxygénases qui interviennent dans la biosynthèse de plusieurs hormones végétales et de nombreux métabolites secondaires. Il intervient aussi dans le contrôle du cycle cellulaire.

En tant qu'antioxydant, l'ascorbate réagit directement avec les radicaux libres (ions superoxydes, H_2O_2 , radical tocophéroxyl,...) pour former du monodéhydroascorbate (instable) et/ou du déhydroascorbate, sans catalyse enzymatique.

• En ce qui concerne le glutathion, plusieurs travaux ont montré son rôle dans les mécanismes de défense et d'adaptation des cellules aux stress oxydants (**Dixit et al., 2001; Mishra et al., 2006; Liu et al., 2007**). Ce métabolite intervient dans la synthèse des phytochélatines qui jouent un rôle essentiel dans l'homéostasie des ions métalliques chez les plantes en chélatant, dans le cytoplasme, des métaux comme le Cd. Des transporteurs transtonoplastiques ATP-dépendants véhiculent ces complexes vers les vacuoles où ils seront stockés. Les phytochélatines sont synthétisées au niveau des racines (**Zhu et al., 1999**) et leur induction par le Cd a été beaucoup étudiée (**Srivastava et al., 2004; Mishra et al., 2006**).

• Au niveau des membranes, et principalement celles des chloroplastes, l' α -tocophérol (vitamine E) est un antioxydant important (**Fryer, 1992**). Le mécanisme, par lequel il élimine les radicaux libres et protège les phospholipides membranaires, fait souvent appel à d'autres composés tels que le glutathion et l'ascorbate (**Fryer, 1992**). En plus des nombreux rôles dans la protection des membranes des plantes contre la détérioration photo-oxydative, l' α -tocophérol joue un rôle très important dans le recyclage de l'acide ascorbique et du glutathion réduit lors de la photo-oxydation des lipides (**Fryer 1992**).

5. Sur l'intégrité membranaire

Les phospholipides sont les composants principaux des interfaces entre les milieux intra et extracellulaires. Ils sont disposés régulièrement en monocouches (lipoprotéines) ou en bicouches (membranes cellulaires) dans lesquelles les acides gras polyinsaturés sont très voisins les uns des autres et peuvent se déplacer à l'intérieur d'une même couche ou entre des couches différentes. Les radicaux libres provoquent leur lipoperoxydation. En effet, cette

peroxydation lipidique est le processus le plus destructif de la structure et des fonctions des membranes cellulaires et subcellulaires. De plus, les produits formés au cours de la lipoperoxydation sont eux-mêmes mutagènes.

Parmi les aldéhydes formés, le plus connu est le malondialdéhyde (MDA). C'est le beta-dialdéhyde tricarboné, produit lors de la coupure des acides gras polyinsaturés possédant au moins trois doubles liaisons (acide arachidonique, acide gamma-linolénique...) (**Figure 5**). Il peut également être formé à partir de composés non lipidiques tels que l'acide ascorbique, les acides aminés, lorsqu'ils sont exposés à l'action des radicaux hydroxyles, en présence de métaux par exemple (**Janero, 1990**).

La lipoperoxydation peut être initiée (initiation primaire) par la soustraction de l'atome d'hydrogène aux groupements méthylènes (-CH₂-) des acides gras polyinsaturés. Elle peut être initiée aussi par la conversion d'hydroperoxydes stables préexistants en radicaux libres alkoxy et peroxy; ce qui est connu sous le nom d'initiation secondaire ou initiation hydroxyde dépendante (**Girotti, 1985; Kappus, 1985**).

La lipoperoxydation peut être initiée aussi par la lipoxygénase qui est une métalloenzyme à fer localisée au niveau de la membrane et oxydant les acides gras polyinsaturés (**Spiteller, 2003 ; Yurekli et Porgali, 2006; Skórzynska-Polit et al., 2006**).

6. Sur le génome nucléaire

L'ADN est une molécule très sensible à l'attaque par les ROS générés par les métaux lourds. Cinq classes principales de dommages oxydants médiés par OH^{*} peuvent être induites. Parmi elles, les bases oxydées, les sites abasiques, des adduits intra-caténaux, des cassures de brins et des pontages ADN-protéines (**Cadet et al., 2002**) (**Figure 6**).

Les bases qui composent l'ADN, et particulièrement la guanine, sont sensibles à l'oxydation. L'attaque radicalaire peut être directe et entraîner l'oxydation des bases, engendrant un grand nombre de bases modifiées, mais le stress oxydant peut aussi attaquer la liaison entre la base et le désoxyribose, créant un site abasique, ou attaquer le sucre lui-même, créant une coupure de chaîne simple brin. Des dommages indirects peuvent résulter de l'attaque des lipides dont la peroxydation génère des aldéhydes mutagènes, formant des adduits sur les bases de l'ADN de type MDA-guanine ou éthénodérivés.

L'attaque radicalaire des protéines, qui sont très nombreuses à entrer en contact avec l'ADN pour le protéger (histones) ou pour le lire (enzymes et facteurs de réplication ou de transcription), entraîne des pontages de protéines ou des adduits sur des bases de type

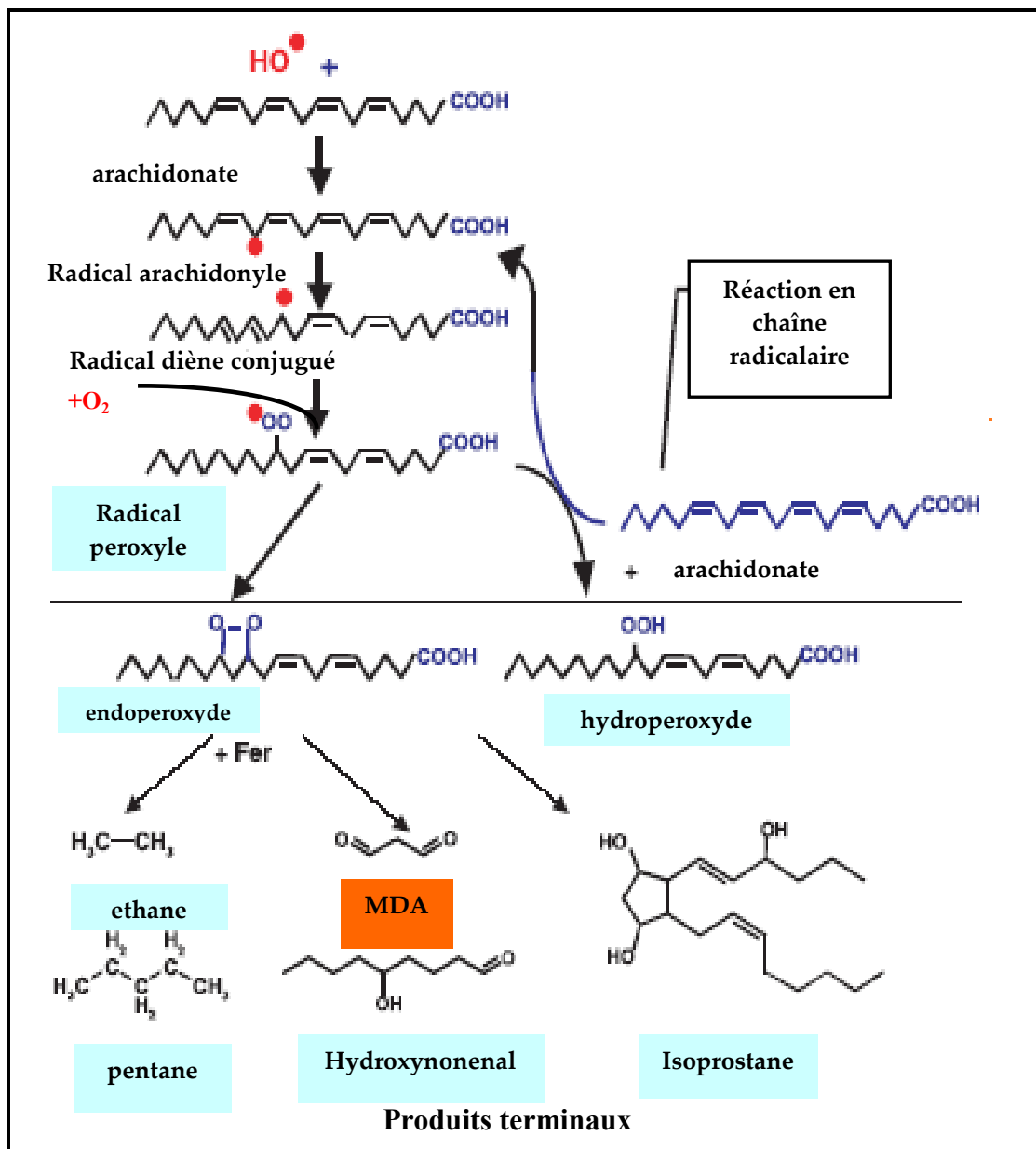


Figure 5: Mécanismes en chaîne de la peroxydation lipidique et nature des produits terminaux formés (Favier, 2003).

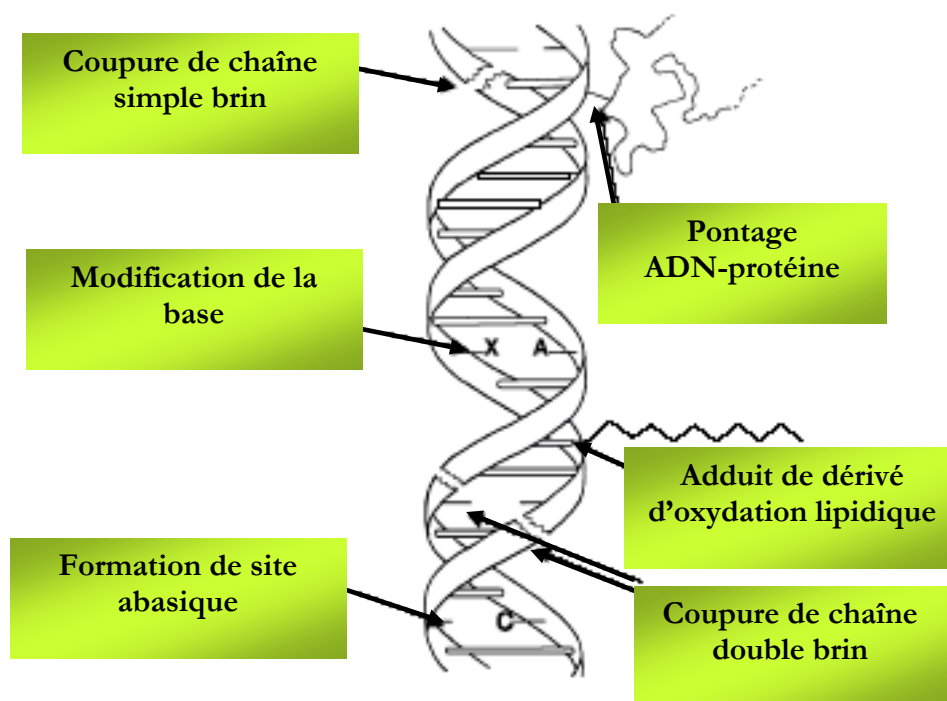


Figure 6: Lésions de l'ADN formées par attaque radicalaire du patrimoine génétique des cellules (**Favier, 2003**).

lysino-guanine.

Selon leurs effets génotoxiques, certains métaux sont classés comme étant :

- essentiels mais relativement non toxiques ; exemple : le Zn^{2+} .
- essentiels mais toxiques à des concentrations élevées ; exemple : le Cu^{2+} .
- non essentiels et hautement toxiques ; exemple : le Cd^{2+} (**Koppen et Verschave, 1996**).

Au cours de la division cellulaire, les métaux lourds (tels que le Cd, le Cr et le Cu) peuvent engendrer des anomalies de la mitose:

-mauvaise ségrégation des chromatides migrant difficilement vers les pôles. Certains chromosomes sont retardés et isolés (effet aneugène).

-fragmentation des chromosomes. Les fragments dépourvus de centromères se répartissent au hasard dans les cellules filles. Ils peuvent se ressouder soit à d'autres fragments, soit à des chromosomes entiers ou ne pas réintégrer le noyau des cellules filles et donner des micronoyaux (effet clastogène) (**Liu et al., 2003; Qian et al., 2006; Souguir et al., 2008**).

Plusieurs auteurs ont montré que les métaux lourds (Cd^{2+} , Pb^{2+} , Cr^{3+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Hg^{2+}) causent des aberrations chromosomiques en induisant des micronoyaux, des ponts et des fragments de chromosomes (**Agarwal et al., 1987; Fiskejo, 1988; Elftheriou et Karataglis, 1989; Punz et Sieghardt, 1993; Wierzicka, 1994; Liu et al., 1995; Liu et al., 2003; Gichner et al., 2004; Ünyayar et al., 2006; Souguir et al., 2008**). Ils altèrent le fonctionnement du fuseau mitotique et leur interférence avec la division cellulaire peut induire une inhibition de l'élongation racinaire (**Jiang et al., 2000; Seregin et Ivanov, 2001**).

La cellule possède des systèmes de réparation. Parmi eux, certains réparent en totalité l'ADN et ne laissent aucune trace de l'attaque du composé génotoxique, d'autres assurent la survie de la cellule quand les premiers sont dépassés mais dans ce cas, la réparation de l'ADN n'est pas totale et peut conduire à des mutations. Certains auteurs ont suggéré que la génotoxicité induite par le Cd est due à son interaction directe ou indirecte avec le système de réparation de l'ADN (**Valverde et al., 2001; Gichner et al., 2004**). Les lésions non réparées vont perturber les mécanismes de réplication de l'ADN et entraîner soit des erreurs de lecture et de synthèse par des ADN polymérases inappropriés aboutissant à une mutation ponctuelle dans le génome, soit une impossibilité de copier l'ADN qui aboutira à la mise en route du suicide programmé des cellules par un mécanisme appelé apoptose.

De part sa capacité à engendrer des effets aneugènes et clastogènes, le Cd est considéré comme un polluant hautement toxique. Son effet génotoxique sur l'ADN est comparable à celui engendré par l'hydrazide maléique (HM) qui est un herbicide (**Rank et al., 2002; Marcano et al., 2004**). En effet, **Del Compo et coletto (1998)** ont montré que l'effet clastogénique de ce dernier est dû à sa capacité d'inhiber l'activité de certaines polymérase ; enzymes intervenant lors de la réparation de l'ADN. En effet, il a été testé chez *Allium cepa* (**Marcano et al., 2004 ; Rank et al., 2002**), *Vicia faba* (**De Marco et al., 1995**), *Clitoria ternata* (**Patil et Bhat, 1992**) et peut induire des dommages au niveau de l'ADN des lymphocytes humains (**Ribas et al., 1995**).

6.1. Avantages de l'utilisation des plantes supérieures dans les tests de génotoxicité

Plus de 200 tests utilisant des microorganismes, des insectes et des plantes ont été développés pour permettre l'identification des agents causant des dommages à l'homme (**Waters et al., 1988**). L'utilisation des plantes a permis de mettre au point des tests de génotoxicité très performants.

Les avantages de l'utilisation des plantes supérieures dans ce type de tests sont :

- ↳ Le nombre et la structure des chromosomes de certaines plantes supérieures. Les anomalies mitotiques sont faciles à détecter lorsque les chromosomes sont longs et en nombre réduit. Par exemple: *Allium cepa* ($2n = 16$), *Pisum sativum* ($2n = 14$), clones de *Tradescantia* ($2n = 12$), *Vicia faba* ($2n = 12$) et *Crepis capillaris* ($2n = 6$), offrent d'excellents systèmes de cytogénicité et permettent la détection des aberrations chromosomiques lors de la méiose et de la mitose ainsi que l'endommagement de l'ADN (**Grant, 1999**).
- ↳ le cycle de développement très court de certaines espèces (*Arabidopsis*).
- ↳ Evaluation aisée de la génotoxicité des polluants chimiques utilisés purs ou en mélange.
- ↳ Evaluation de la pollution des sols. En effet, ces plantes participent au transfert des composés polluants le long de la chaîne alimentaire (**Wiersma et al., 1986 ; Dudka et Miller, 1999**).
- ↳ La facilité de manipulation.

Environ 233 espèces ont été utilisées, dans les tests de génotoxicité (**Shelby, 1976**). Parmi ces plantes : *Allium cepa* ($2n = 16$), *Arabidopsis thaliana* ($2n = 10$), *Crepis capillaris*

($2n = 6$), *Glycine max* ($2n=40$), *Hordeum vulgare* ($2n =14$), *Lycopersicon esculentum* ($2n = 16$), *Nicotiana tabacum* ($2n = 48$), *Pisum sativum* ($2n = 14$), *Tradescantia crassifolia* ($2n = 24$), *Vicia faba* ($2n = 12$) et *Zea mays* ($2n=20$) (Grant, 1993 ; Grant et Owens, 1998 ; Steinkellner et al., 1998 ; Knasmuller et al., 1998).

Vicia faba est un modèle fréquemment utilisé dans la détection des aberrations chromosomiques et la formation de micronoyaux au niveau des cellules somatiques durant la division cellulaire en raison de ses chromosomes de grande taille (Degarssi et Rizzoni, 1982; Ma, 1982a; Dekergommeaux et al., 1983; Kihlman et Anderson, 1984; De Marco et al., 1990 ; Qian et al., 2006).

6.2. Les différents tests de génotoxicité associés aux plantes supérieures

L'utilisation de plantes supérieures a permis de détecter les effets génotoxiques des métaux lourds dont :

- 1- Les cassures des chromosomes ou clastogénicité ou aberrations structurales des chromosomes.
- 2- Le dysfonctionnement du fuseau mitotique affectant par la suite le nombre de chromosomes ou aneuploïdie.
- 3- La formation des micronoyaux (Test MCN)
- 4- L'échange des chromatides sœurs (Test de SCEs).
- 5- Les cassures des brins d'ADN qui peuvent être évaluées par le test de comète.

6.2.1. Clastogénicité

L'induction des cassures de chromosomes est considérée comme l'un des tests de base de la génotoxicité. Le test d'aberration chromosomique *in vitro* est pratiqué chez les plantes au niveau de la zone méristématique (Marcano et al., 2004; Ji et al., 1999; Steinkellner et al., 1998) et chez les animaux au niveau des cellules des mammifères en culture (Evans, 1976; Galloway et al., 1978; Ishidate et Sofuni, 1985). Ce test est destiné à détecter les agents polluants qui provoquent des anomalies touchant la structure des chromosomes.

Ces aberrations sont détectables par un examen au microscope au stade de la métaphase et se présentent sous la forme de délétions, de cassures, de modifications intrachromosomiques ou interchromosomiques. Ces modifications structurales des chromosomes sont induites directement par l'agent polluant en créant des dommages au niveau de l'ADN, soit

indirectement suite à la production d'espèces réactives de l'oxygène (**Kovalchuk et al., 2001**).

Selon **Jiang et al. (2000)** et **Marcano et al. (2004)**, les aberrations structurales sont sous forme d'adhérences de chromosomes ou "stickiness", des ponts anaphasiques accompagnés de ruptures, des chromosomes isolés (absence de migration des chromosomes), des chromosomes non-disjoints (chromatides non séparées) et des micronoyaux.

Les délétions terminales ou les pertes de télomères ont comme conséquence la formation de ponts et de chromosomes collants en ana-télophase (**Nicoloff et Gecheff, 1976 ; Rank et Nielson, 1993**). En effet, quand un chromosome se coupe en un point unique, les fragments distaux, c'est à dire les fragments qui sont détachés du centromère, ou acentriques et donc ne possédant pas de centromère sont perdus. Bien que le grand fragment restant contienne le centromère, l'absence de télomère fonctionnel à l'une des extrémités conduit fréquemment à l'instabilité du chromosome. Les télomères protègent de la dégradation nucléotidique et de la fusion bout à bout.

L'induction des ponts chromosomiques lors de l'ana-télophase est une forme évidente de clastogénicité. Ces ponts se forment entre des chromosomes ou des fragments isolés résultant des coupures simples ou doubles brins. Selon **Cornforth et Goodwin (1991)**, les ponts proviennent des chromosomes dicentriques suite à des processus d'échange après cassure double brin.

Les adhérences de chromosomes ou "stickiness" sont définies comme étant des agglutinations de chromosomes de nature inconnue qui ont comme conséquence un aspect collant des chromosomes (**Rieger et al., 1995 ; Jiang et al., 2000**). Ces adhérences sont supposées provenir des endommagements de protéines périphériques telle que l'ADN-topoisomérase-II qui peut également être à l'origine des cassures chromosomiques (**Gaulden, 1987**). En effet, la topoisomérase-II joue un rôle dans la condensation des chromosomes pendant la prophase ainsi que la séparation des deux chromatides sœurs pendant l'anaphase.

Les tests s'intéressant à l'étude de l'effet clastogénique des métaux lourds utilisant *Allium cepa* (**Fiskesjo, 1979 ; Fiskesjo, 1988 ; Lerda, 1992 ; Rank et Nielsen, 1994 ; Liu et al., 1995 ; Borboa et De la Torre, 1996**), *Crepis capillaris* (**Ruposhev, 1976**) ou *Hordeum vulgare* (**Zhang et Yang, 1994**) ont montré que des métaux tels que Al, Cd, Cr, Hg, Pb, Se et Zn ont des effets génotoxiques, alors que le Cu n'est pas clastogène.

Plusieurs auteurs considèrent que l'augmentation de la fréquence des aberrations chromosomiques dans les extrémité racinaires est dépendante de la concentration et du temps d'exposition à l'agent polluant jusqu'à un certain seuil où la fréquence de ces aberrations commence à diminuer suite au blocage de la division cellulaire (**Rank et Nielsen, 1997 ; Alvarez-Moya et al., 2001 ; Marcano et al., 2004**). Ce blocage est évalué par l'indice mitotique (IM) qui permet d'estimer la fréquence des divisions cellulaires

6.2.2. Aneugénicité

Tout agent qui interagit avec la fonction du fuseau mitotique, durant la mitose ou la méiose, cause des erreurs de ségrégation chromosomique. Cet agent est dit aneugène (**Sandhu et al., 1986**) et peut provoquer deux types d'aberrations :

-**une non-disjonction** (**Newcombe, 1979; Marcano et al., 2004**) qui correspond à l'incapacité des chromosomes appariés à se séparer (disjonction) lors de la division réductionnelle de la méiose ou à l'incapacité des chromatides sœurs de se disjoindre, soit au moment de la division équationnelle de la méiose, soit lors de la mitose. Les deux chromosomes ou chromatides jointes migrent vers l'un des pôles et seront inclus dans une des deux cellules filles, l'autre cellule fille en sera dépourvue.

-**un décalage de l'anaphase** qui décrit l'échec de l'incorporation d'un chromosome dans le noyau de l'une des cellules filles après division cellulaire. Ceci résulte du déplacement retardé (décalage) du chromosome au cours de l'anaphase et de la perte chromosomique qui en résulte.

Le Cd, ainsi que d'autres métaux lourds ayant une grande affinité pour les groupements SH, sont associés préférentiellement à des tubulines et par la suite à la fonction du fuseau (**Ahlberg et al., 1972 ; Fiskesjo, 1979 ; 1988 ; 1997 ; Mukherjee et Sharma, 1986 ; Anderson, 1986 ; Lerda, 1992 ; Liu et al., 1995 ; Borboa et De la Torre, 1996**).

6.2.3. Induction de micronoyaux

L'induction de micronoyaux *in vitro* est un des tests de mutagénicité utilisé pour la détection de la capacité de tout agent physique ou chimique à induire la formation de petits noyaux (micronoyaux) dans le cytoplasme de cellules en interphase. Lors d'une lésion majeure de l'ADN, une fraction de chromosome ou un chromosome entier, après la division cellulaire, peut se détacher et former un micronoyau visible en microscopie photonique après coloration.

Ces entités nucléaires présentes dans le cytoplasme de cellules mitotiques en interphase ou des tétrades résultent des fragments de chromosomes acentriques induits par la clastogénicité (Ma 1982b; Ma, 1982c; Sandhu et al., 1989, Souguir et al., 2008), de la rupture des ponts ou d'un retard de la ségrégation des chromosomes dû à l'aneugénicité (Zaka et al., 2002; Souguir et al., 2008).

Le test des micronoyaux (ou Test MCN) constitue un outil valable pour déterminer la génotoxicité des métaux lourds, des pesticides, des radiations, des produits tabagiques et, qui appliqué aux lymphocytes humains, permet d'évaluer les conséquences de l'exposition professionnelle à des produits toxiques.

Les tests MCN appliqués sur les cellules méristématiques des extrémités racinaires de plusieurs espèces (Ahberg et al., 1972; Fiskesjo, 1979; 1988; 1997; Mukherjee et Sharma, 1986; Lerda, 1992; Liu et al., 1995; Borboa et De la Torre, 1996; Knasmuller et al., 1998; Steinkellner et al., 1998; Wang, 1999; Jiang et al., 2000; Souguir et al., 2008) ont été utilisés pour tester l'effet génotoxique de divers métaux tels que l'As, le Cu, le Cd, le Cr, le Hg, le Ni, le Pb, le V, le Zn et des eaux contaminées par certains de ces métaux (Helma et al., 1992).

6.2.4. Induction des échanges de chromatides sœurs (SCEs)

Le test SCEs permet d'identifier des génotoxines même à de très faibles concentrations (Tucker et al., 1993). Il permet de visualiser les échanges réciproques des bras chromatidiques appartenant à un même chromosome et il a été employé sur différentes plantes : *Allium cepa* (Schvartzman et Cortes, 1977; Panda et al., 1998), *Vicia faba* (Kihlman et Komberg, 1975; Templaar et al., 1982) et *Nicotiana plumbaginifolia* (Panda et al., 1998; Schvatzman, 1987; Schubert, 1994). Testé chez *Allium cepa*, le Cd induit des échanges de chromatides sœurs (Panda et al., 1996).

6.2.5. Test des comètes

Le test des comètes permet de mesurer les cassures induites directement par un agent génotoxique, indirectement lors des processus de réparation des dommages et enfin lors des processus secondaires de fragmentation de l'ADN telle que l'apoptose. C'est une technique récente qui est considérée comme très efficace pour la détection de la génotoxicité à court terme de certains polluants (Singh et al., 1988; Fairbain et al., 1995; Frenzelli et al., 2000).

Suite à une migration électrophorétique, les noyaux dont l'ADN a subi des cassures prennent une forme de comète alors que les noyaux dont l'ADN n'est pas endommagé restent ronds.

Ce test a été appliqué chez les plantes telles que *Vicia faba* (Koppen et Verschaeve, 1996), *Allium cepa* (Navarrete et al., 1997) et *Nicotiana tabacum* (Gichner, 2003). Il a été utilisé pour la détection *in vitro* de l'effet génotoxique de divers métaux tels que : le As^{3+} , le Cd^{2+} , le Cr^{3+} , le Hg^{2+} , le Ni^{2+} , le Pb^{2+} et le V^{5+} chez des cellules humaines ou de rats (Betti et al., 1993 ; Pool-Zool et al., 1994; Hartmann et Speit 1994; Rojas et al., 1996; Blasiak et Kowalik, 2000).

6.3. Exemples de tests de génotoxicité associés aux plantes supérieures

Le Tableau 1 résume et fait apparaître quelques exemples de plantes supérieures utilisées comme modèle dans les tests de génotoxicité.

Tableau 1: Exemples des plantes étudiées et tests associés

<i>Système utilisé</i>	<i>Tests de génotoxicité</i>	<i>Références</i>
<i>Allium cepa</i>	-Division mitotique et aberrations chromosomiques -MCN -SCE -Test de Comète	-Grant, 1982; Fiskesjo, 1997; Rank et Nielson, 1993 -Reddy et al., 1995; Ma et al., 1995 -Schvartzman et Cortes, 1977; Panda et al., 1998 -Narvette et al., 1997
<i>Vicia faba</i>	Division mitotique et aberrations chromosomiques	Ma, 1982b; Kanaya et al., 1994 ; Ünyayar et al., 2006 ; Qian et al., 2006
<i>Hordeum vulgare</i>	Aberrations chromosomiques en mitose et en méiose	Constantin et Nilman, 1982a ; 1982b; Panda et al., 1992
<i>Crepis capillaris</i>	Aberrations chromosomiques en mitose	Grant et Owens, 1998

6.4. Génotoxicité du Cd

Le **tableau 2** mentionne les diverses anomalies génétiques observées chez diverses espèces végétales après traitement au Cd. On peut remarquer que le modèle *Allium cepa* a été largement utilisé dans les études génotoxiques du Cd.

Tableau 2: Génotoxicité de Cd (+: effet positif).

<i>Génotoxicité</i>	<i>Effet</i>	<i>Plantes utilisées</i>
Clastogénicité	+	<i>Creppis capillaris</i> (Ruposhev, 1976) <i>Allium cepa</i> (Lerda, 1992 ; Borboa et De la Torre, 1996) <i>Allium sativum</i> (Liu et al., 2003)
Aneugénicité	+	<i>Allium cepa</i> (Borboa et De la Torre, 1996) <i>Creppis capillaris</i> (Ruposhev, 1976)
MCN	+	<i>Allium sativum</i> (Liu et al., 2003) <i>Allium cepa</i> (Ünyayar et al., 2006) <i>Vicia faba</i> (Ünyayar et al., 2006)
SCE	+	<i>Allium cepa</i> (Panda et al., 1996)
Mutation	+	<i>Allium cepa</i> (Reddy et Vaidyanth, 1978)

7. Sur l'expression des gènes

La plante répond au stress métallique par exclusion, chélation et compartimentation des ions métalliques et aussi par expression des gènes codant pour des protéines de stress. L'induction ou la synthèse de plusieurs protéines lors du stress est considérée comme un mécanisme ubiquitaire de défense impliqué dans la réponse des plantes aux agressions biotiques et abiotiques imposées par leur environnement. Ces protéines pourraient être regroupées en fonction des rôles qu'elles accomplissent à l'intérieur de la cellule pendant les stress. Parmi ces protéines, certaines sont impliquées dans le métabolisme antioxydant, d'autres interviennent dans les processus d'adaptation de la plante à son nouvel environnement et le maintien du métabolisme de base.

Les métallothionéines et les phytochélatines sont induites lors d'une intoxication par les métaux lourds. Ces deux molécules ont la capacité de fixer les métaux lourds par la formation de complexes stables afin d'empêcher leur circulation à l'état libre dans les tissus. Les métallothionéines (MT) sont des polypeptides riches en cystéines. Elles sont classées en deux catégories définies sur la base de l'arrangement de leurs résidus cystéines (**Robinson et al., 1993**):

- Les métallothionéines type 1 ou MT1: Cys-aa-Cys; aa est un acide aminé quelconque
- Les métallothionéines type 2 ou MT2: Cys-Cys et Cys-aa-aa-Cys.

Chez les plantes, une relation directe semble exister entre l'accumulation des polluants métalliques et l'induction simultanée des MT (**Whitelaw et al., 1997**).

Les phytochélatines (PC) sont des peptides de structure $[\gamma\text{-Glu}-(\text{Cyst})_{2-11}\text{-Gly}]$. Elles jouent un rôle essentiel dans l'homéostasie des ions métalliques chez les plantes en chélatant dans le cytoplasme divers métaux tels que le Cd, le Zn et le Cu. Des transporteurs transmembranaires ATP-dépendants véhiculent ces complexes vers les vacuoles où ils seront stockés. La phytochélatine synthase (PCs) qui est une γ -glutamylcystéine dipeptidyl transpeptidase est l'enzyme responsable de leur synthèse (**Grill et al., 1989**).

Les phytochélatines sont synthétisées à partir du glutathion (**Grill et al., 1989**). Une diminution de la quantité de glutathion réduit s'accompagne d'une augmentation de l'activité des enzymes responsables de sa synthèse qui sont la γ -glutamylcystéine synthétase, la glutathion synthétase (**Rueggsegger et al., 1990; Coi et al., 1996**) et l'ATP sulfurylase (**Ernst, 1999; Seregin et Ivanov, 2001**). L'augmentation de l'activité de ces enzymes est corrélée

avec celle de l'expression des gènes correspondants sous contrôle de l'acide jasmonique (Reese et Wagner, 1987).

Les protéines de choc thermique (HSP) ou protéines de stress sont des molécules "chaperonnes". Elles protègent les protéines d'une dégradation enzymatique, réparent les protéines endommagées, empêchent ou stimulent l'expression de certains gènes. Certaines de ces protéines sont exprimées de manière stable, mais d'autres sont induites sous l'effet de différents stress physiques, métaboliques ou chimiques telle que la présence de Cd (Fenik et al., 1995; Sanita di Toppi et Gabrielli, 1999). On distingue trois familles majeures de protéines de choc thermique selon leur poids moléculaire: 90 kD, 70 kD et 27 kD. Les HSP 90 interviennent dans la transduction de signaux du cycle cellulaire lors d'un stress. Les HSP 70/27 permettent le maintien d'une production correcte d'ATP conduisant à une meilleure gestion du stress cellulaire, facilitent la protéolyse des protéines altérées ou étrangères (apoptose ou mort cellulaire programmée) limitant ainsi les dommages cellulaires.

L'apparition ou la surexpression des gènes codant pour les protéines de choc thermique sont les premiers signes de réponse d'une cellule à des agressions. Même si cette réponse a d'abord été observée pour une élévation thermique, c'est un mécanisme de protection cellulaire essentiel contre une multitude de stress. Suite à une exposition au Cd, une augmentation de l'expression du gène *Hvhsp 17* codant pour HSP a été notée chez le maïs et l'orge (Sanita di Toppi, et Gabrielli, 1999). De plus, un traitement par ce métal augmente la synthèse des protéines HSP 70 sur des cultures cellulaires de *Lycopersicon peruvianum* (Neumann et al., 1994).

En ce qui concerne le métabolisme antioxydant, l'expression des gènes codant pour des enzymes antioxydantes a été peu étudié en présence du Cd. Les métaux lourds dont le Cd semblent exercer une régulation transcriptionnelle sur les gènes codant pour la CAT, la GR, l'APX et la GPX (Tamás et al., 2008). L'expression de la DHAR ne montre aucune modification durant le traitement par le Cd (Tamás et al., 2008). Concernant les peroxydases, ces mêmes auteurs ont noté une accumulation des transcrits *PRX8* alors que l'expression du gène *PRX7* est inchangée durant le traitement.

Une autre enzyme du métabolisme antioxydant, la SOD, a été étudiée par Romero-Puertas et al. (2002). Ces auteurs ont suggéré que la diminution de l'activité de l'isoforme Cu-Zn SOD suite à un traitement par le Cd est due à la modification de la biosynthèse de cette enzyme au niveau de la transcription ou de la traduction.

Pour la GR, le Cd semble exercer une régulation d'ordre transcriptionnel ou post-traductionnel selon les espèces. Une régulation post-traductionnelle de la glutathion réductase a été suggérée par **Yannarelli et al. (2006)** chez *Triticum aestivum*. En effet, ces auteurs ont montré une augmentation de l'activité de la GR en absence d'une accumulation des ARNm codant pour cette enzyme et de l'expression des protéines. Ce résultat a été confirmé par celui trouvé chez *Pisum sativum*, en présence de Cd (**Romero-Puertas et al., 2006**) et d'ozone (**Edwards et al., 1994**). Le même type de régulation post-traductionnelle de l'ascorbate peroxydase a été suggéré par **Ortega-Villasante et al. (2007)** chez *Medicago sativa*.

Matériel et Méthodes

I. Matériel végétal et conditions de culture

Le matériel végétal utilisé dans ce travail est la fève (*Vicia faba*), variété : Aguadulce

1. Germination des graines

Les graines de *Vicia faba* sont triées et désinfectées par un lavage à l'eau de Javel (10 %) pendant 20 min, puis rincées abondamment à l'eau distillée pour lessiver les produits de conservation ayant adhéré à la graine.

Pour faciliter et homogénéiser leur germination, les graines sont placées dans de l'eau distillée pendant une nuit. Elles sont ensuite, mises à germer entre deux couches de coton imbibé continuellement par de l'eau distillée. La germination se fait à l'obscurité et à une température de $24 \pm 2^\circ\text{C}$.

2. Culture hydroponique

Après 4 jours de germination, les plantules sont repiquées en sceaux contenant un milieu nutritif hydroponique continuellement aéré par des pompes d'aquarium (**Figure 7**).

Les solutions nutritives sont renouvelées tous les 2 jours pour éviter les variations de pH et l'épuisement des ions minéraux. La culture se déroule en salle climatisée sous conditions contrôlées : 16h de lumière/8h d'obscurité, à une température $25^\circ\text{C}/20^\circ\text{C}$ et à une humidité relative de $65(\pm 5) \%$. L'intensité lumineuse au niveau des plantules, assurée par des lampes de mercure, est de $150\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Les plantules sont cultivées sur un milieu nutritif équilibré enrichi en macro- et oligoéléments.

Macro-éléments :

Les macro-éléments sont préparés individuellement et apportés dans le milieu nutritionnel à des concentrations définies:

KNO₃	2mM
KH₂PO₄	1mM
Ca(NO₃)₂, 4H₂O	2.5mM
MgSO₄, 7H₂O	1mM

Oligo-éléments :

Les oligo-éléments, excepté le fer, sont réunis dans une solution mère unique et apportés au milieu nutritionnel aux concentrations finales suivantes:



Figure 7 : Plantules de fève en culture hydroponique

MnSO ₄ , 7H ₂ O	10μM
ZnSO ₄ , 7H ₂ O.....	1μM
CuSO ₄ , 5H ₂ O.....	1μM
H ₃ BO ₄	30μM.
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	0.03μM

Quant au fer, il est apporté à une concentration de 50μM dans le milieu nutritif et fourni sous forme de complexe Fe-K-EDTA préparé selon les indications de **Jacobson (1951)**.

3. Traitement métallique et récolte des plantules

Les plantules de *Vicia faba* âgées de 12 jours sont traitées par le cadmium ajouté dans la solution nutritive sous forme CdCl₂, à trois concentrations différentes, 50, 100 et 200μM. Pour chaque traitement, 3 répliquats sont réalisés. Les plantules sont récoltées après 12, 24 et 48 heures de traitement.

Les plantules sont fractionnées en deux parties : racines et feuilles (stade deux premiers étages foliaires). Les racines sont lavées dans trois bains successifs d'eau distillée puis séchées entre deux couches de papier filtre.

Les lots destinés à l'étude de la croissance sont mis à sécher dans l'étuve à 70°C après avoir pesé leurs masses de matière fraîche et mesuré les longueurs des racines et de la surface foliaire. D'autres lots sont placés immédiatement dans l'azote liquide pour une utilisation ultérieure.

II. Préparation des minéralisats et dosage des éléments minéraux

La quantité de cadmium prélevée par la plante est dosée par rapport à un témoin.

On effectue une minéralisation à froid ; les organes sont déshydratés à 60°C pendant 15 jours puis placés dans des piluliers en verre contenant l'acide nitrique à 65%. Après une semaine, les minéralisats obtenus sont dilués cinq fois puis filtrés sur filtre sans cendre.

Le dosage des éléments minéraux et du cadmium a été effectué par spectrophotométrie d'absorption atomique (Perkin Elmer-model 2380.). Une gamme d'étalonnage a été préparée pour chaque élément.

III. Dosage des pigments photorécepteurs

Les feuilles sont immergées dans l'acétone 80% puis placées à l'obscurité et au froid. Après 24 h, l'échantillon est broyé puis filtré sur gaze. Le résidu est repris dans l'acétone 80%. Le filtrat obtenu est centrifugé pendant 5 min à une vitesse de 3 000 rpm. Le culot est repris dans l'acétone jusqu'à ce qu'il prenne une coloration blanche.

La densité optique est ensuite mesurée au spectrophotomètre aux longueurs d'onde 450, 645 et 663 nm. Les concentrations en chlorophylles a et b et en caroténoïdes sont déterminées à l'aide des équations proposées par **Mac Kinney (1941)** et **Arnon (1949)**. Les résultats sont exprimés en mg/g MF.

IV. Analyse des lipoperoxydes membranaires

1. Extraction

Les racines et les feuilles fraîches de plantules de fève sont broyées dans un tampon formé de 0.5% d'acide thiobarbiturique (TBA) et 20% d'acide trichloroacétique (TCA) (m/v:1/10) avec une pincée de sable stérile. Le broyat est chauffé dans un bain marie à 95°C pendant 30 min. Pendant cette incubation, un complexe se forme entre le TBA et les composés aldéhydiques, essentiellement le malondialdéhyde (MDA) : TBA-MDA. La réaction est arrêtée par un refroidissement immédiat dans un bain de glace. Après centrifugation à 10 000xg pendant 10 min, le surnageant est récupéré pour un dosage colorimétrique des lipoperoxydes.

2. Dosage

Les concentrations en lipoperoxydes sont déterminées par la méthode de **Heath et Packer (1968)**. Les produits de peroxydation lipidique, qui réagissent avec le TBA sont principalement le MDA et les endoperoxydes (**Buege et Aust, 1978**).

Le dosage est effectué par spectrophotométrie. L'absorbance du complexe TBA-MDA est mesuré à 532 nm contre un blanc constitué de tampon d'extraction. La densité optique est corrigée par une lecture à 600 nm. La concentration de MDA est calculée en utilisant son coefficient d'extinction molaire ($\epsilon = 155\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

$$\text{MDA (nmol/g MF)} = \frac{(A_{532} - A_{600}) \times V}{155 \times \text{MF}} \times 1000$$

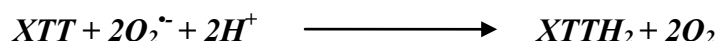
A = Absorbance

V = Volume de l'extrait (mL)

MF = Matière végétale fraîche (g)

V. Dosage du superoxyde d'oxygène

La production de l'anion superoxyde d'oxygène est déterminée par le XTT (sodium, 3-[phenylamino-carbonyl]-3,4-tetrazolium]-bis (4-methoxy-6-nitro) benzene-sulfonic acid hydrate) qui est réduit en présence de $O_2^{\cdot-}$ (Sutherland et Learmonth, 1997) selon l'équation :



Le matériel végétal (1g) est broyé dans un tampon d'extraction composé de 50mM Tris-HCl (pH 7.5). L'extrait est centrifugé pendant 20 min à 14 000xg. Le surnageant est récupéré par la suite pour servir au dosage du superoxyde d'oxygène.

Le milieu réactionnel comporte le tampon d'extraction, l'extrait protéique et le XTT (0.5mM). La réduction de XTT est déterminée à 470 nm en utilisant un coefficient d'extinction molaire $\epsilon = 21.6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

VI. Dosage du peroxyde d'hydrogène

La matière végétale fraîche est broyée dans une solution de 0.1% TCA à raison de 10 mL/g de matière fraîche. Le broyat est ensuite centrifugé à 6 000xg pendant 15 min à 4°C. Un volume de surnageant est incubé en présence d'iodure de potassium (1M) additionné au 10mM tampon phosphate (KH_2PO_4/K_2HPO_4 ; pH 7).

La densité optique est déterminée à 390 nm (Sergiev et al., 1997).

VII. Dosage de l'activité lipoxigénase (LOX)

L'activité de la lipoxigénase est déterminée seulement au niveau des racines de *Vicia faba*. Les racines sont broyées dans un mortier en présence d'un tampon d'extraction composé de 50mM tampon phosphate (KH_2PO_4/K_2HPO_4 ; pH 7), 5mM cystéine et 10mM EDTA. L'homogénat ainsi obtenu est centrifugé à 14 000xg pendant 20 min et le surnageant est récupéré pour le dosage de l'activité lipoxigénasique (LOX). Cette activité est déterminée par la mesure de l'absorbance des hydroperoxydes à 234 nm (Axerold et al., 1981). Le milieu réactionnel, de volume final égal à 1mL, est composé de 0.16% tween-20 (v/v), tampon à 0.2M glycine (pH 10.0), de 100mM acide linoléique et de l'extrait enzymatique. L'activité enzymatique de la lipoxigénase est calculée en utilisant un coefficient d'extinction molaire $\epsilon = 25 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

VIII. Mesure de l'intégrité cellulaire

La mort cellulaire indiquant la perte de l'intégrité de la membrane plasmique est mesurée spectrophotométriquement à l'aide de l'absorption de la solution de bleu Evans (**Baker et Mock, 1994**). L'intensité de la couleur est proportionnelle au nombre de cellules mortes.

Trois extrémités racinaires (1cm) sont coupées puis incubées dans une solution de 0.025% bleu Evans (m/v) pendant 30 min. Ces racines sont rincées pendant 15 min et broyées dans 800 μ L d'une solution de 50% MeOH (v/v) et 1% SDS (m/v). L'homogénat est incubé dans un bain marie pendant 15 min à 50°C puis centrifugé à 14 000xg pendant 15 min. La densité optique du surnageant est lue à 600 nm.

IX. Détermination de l'activité des enzymes antioxydantes

1. Extraction

Le matériel végétal est broyé dans un mortier maintenu dans la glace en présence d'une pincée de sable stérile.

Le tampon d'extraction, à raison de 5mL pour 1g de matière végétale, est composé de:

- ⇒ **Phosphate de potassium $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$50mM, pH 7**
- ⇒ **Ascorbate de Sodium.....5mM**
- ⇒ **EDTA.....0.2mM**

Le broyat est ensuite centrifugé à 12 000xg pendant 15 min. Le surnageant récupéré représente la fraction des protéines solubles ou extrait brut.

2. Dosage des protéines

Le dosage des protéines est effectué selon la méthode de **Bradford (1976)**. Le principe de cette méthode est basé sur la liaison du Bleu de Coomassie G-250 avec les liaisons peptidiques; ce qui entraîne un changement du maximum d'absorption du colorant de 465 nm à 595 nm.

Une aliquote de l'extrait est additionnée à 2.5mL du colorant. La coloration se développe dans un temps minimum de 5 min mais ne dépassant pas 30 min. L'absorbance est lue à 595 nm. La gamme étalon est réalisée avec des concentrations croissantes de BSA.

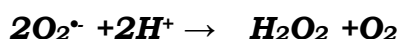
❖ Préparation de la solution de Bleu de Coomassie :

Le Bleu de Coomassie Brillant G-250 (100mg) est dissous dans 50mL d'éthanol (95%) puis 100ml d'acide ortho-phosphorique (85%) sont ajoutés. Le mélange résultant est ajusté à un volume final d'un litre par de l'eau distillée puis filtré et conservé à froid (4°C).

3. Dosage des activités enzymatiques par spectrophotométrie

3.1. Détermination de l'activité de la superoxyde dismutase

La superoxyde dismutase catalyse la réaction:



Selon **Mishra et Fridovich (1972)**, l'adrénaline (épinéphrine), en présence de l'anion superoxyde $O_2^{\cdot -}$ s'oxyde spontanément en adrénochrome ; composé coloré qui absorbe à 480 nm. Les SOD, dont le rôle est de réduire l'anion $O_2^{\cdot -}$ inhibent ainsi cette réaction (**Polle et al., 1989**).

Le dosage de l'activité SOD se fait en suivant l'évolution de la densité optique à 490 nm d'un milieu contenant :

- ⇒ **Bicarbonate de sodium/Carbonate de sodium...62.5mM, pH 10.4**
- ⇒ **EDTA125µM**
- ⇒ **Catalase.....1.88UE/mL de milieu réactionnel**

Le milieu réactionnel ne contenant pas l'extrait protéique est additionné d'une aliquote de solution d'adrénaline de manière à avoir une variation de la densité optique de l'ordre de 0.025/min, ce qui constitue le témoin.

L'ajout de 1mM KCN dans le milieu réactionnel inhibe les Cu-Zn SOD et ne laisse persister que l'activité de la Mn SOD et de la Fe SOD.

3.2. Détermination de l'activité de la catalase

L'activité de la catalase est mesurée par la diminution de la densité optique à 240 nm ($\epsilon = 0.036 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) due à la consommation de H_2O_2 (**Aebi, 1984**).

Le milieu réactionnel est formé de :

- ⇒ **KH₂PO₄/K₂HPO₄.....25mM, pH 7**
- ⇒ **H₂O₂.....30mM**

La réaction est déclenchée par l'ajout de l'extrait protéique.

3.3. Détermination de l'activité de la gaïacol peroxydase

L'activité de la gaïacol peroxydase est déterminée selon la méthode de **Fielding et Hall (1978)**. Cette activité est mesurée par l'augmentation de l'absorbance à 470 nm due à la polymérisation du gaïacol en tétragaïacol en présence de peroxyde d'hydrogène selon la réaction:



Le coefficient d'extinction molaire du tétragaïacol est de $26.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. La réaction est initiée par l'addition de l'extrait protéique.

Le milieu réactionnel est formé par :

- ⇒ $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$25mM, pH 7
- ⇒ H_2O_210mM
- ⇒ Gaïacol.....9mM

3.4. Détermination de l'activité de l'ascorbate peroxydase (APX)

L'ascorbate peroxydase catalyse la réaction suivante :



Le milieu réactionnel est formé de:

- ⇒ Phosphate de potassium ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$)....50mM, pH 7
- ⇒ EDTA.....0.1mM
- ⇒ H_2O_25mM
- ⇒ Ascorbate de Sodium.....0.5mM

La réaction est suivie par la variation de l'absorbance à 290 nm suite à l'ajout de l'extrait protéique.

L'activité de l'enzyme est calculée selon le coefficient d'extinction molaire $\varepsilon = 2.8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

3.5. Détermination de l'activité de la monodéhydroascorbate réductase (MDHAR)

La monodéhydroascorbate réductase catalyse la réaction suivante :



La composition du milieu réactionnel est la suivante:

- ⇒ **Phosphate de potassium (KH₂PO₄/K₂HPO₄).....50mM, pH 7.6**
- ⇒ **EDTA.....0.1mM**
- ⇒ **NADH.....0.1mM**
- ⇒ **Ascorbate de Sodium.....2.5mM**
- ⇒ **Ascorbate oxydase.....5U/100mL de milieu réactionnel**

Après addition de l'extrait protéique, le déroulement de la réaction est suivi par l'évolution de l'absorbance à 340 nm due à l'oxydation de NADH. L'activité de l'enzyme, exprimée en nanokatal, est calculée selon le coefficient d'extinction molaire $\epsilon = 6.2 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

3.6. Détermination de l'activité de la déhydroascorbate réductase (DHAR)

La déhydroascorbate réductase catalyse la réaction suivante :



Le milieu réactionnel (Doulis et al., 1997) comprend:

- ⇒ **Phosphate de potassium (KH₂PO₄/K₂HPO₄)...90mM, pH 7**
- ⇒ **EDTA.....0.1mM**
- ⇒ **Déhydroascorbate.....0.2mM**
- ⇒ **Glutathion réduit (GSH).....5mM**

En présence de l'extrait protéique, la réaction est suivie par l'évolution de l'absorbance à 290 nm correspondant à la formation de l'ascorbate. L'activité de cette enzyme est calculée à l'aide du coefficient d'extinction molaire $\epsilon = 2.8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

3.7. Détermination de l'activité de la glutathion réductase

La glutathion réductase catalyse la réaction suivante:



Son activité est mesurée selon Albrecht et Wiedenroth (1994) dans un milieu réactionnel composé de :

- ⇒ **Tris-HCL.....0.1M, pH=9**
- ⇒ **NADPH.....0.2mM**

⇒ **Glutathion oxydé (GSSG).....0.5mM**

Suite à l'ajout de l'extrait protéique, le déroulement de la réaction est suivi par la diminution de l'absorbance à 340 nm due à l'oxydation de NADPH.

L'activité est calculée à l'aide du coefficient d'extinction molaire $\epsilon=6.2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

X. Mesure des métabolites anti-oxydants

1. Extraction

Le matériel végétal frais (1g) est broyé dans de l'azote liquide dans un mortier préalablement refroidi. L'échantillon est mixé et homogénéisé en présence de 4mL d'acide métaphosphorique 5% (m/v) pendant une minute dans la glace. Le broyat est transvasé dans un tube à centrifuger et le mortier est rincé par 1mL d'acide métaphosphorique.

Après centrifugation de l'extrait à 2 000xg pendant 35 min et à 4°C, le surnageant est récupéré et stocké à -20°C pour la détermination des métabolites anti-oxydants.

2. Dosage

2.1. Dosage de l'ascorbate et du déhydroascorbate

Le dosage de l'ascorbate et du déhydroascorbate est déterminé selon la méthode de **Knörzer et al. (1996)**

L'ascorbate réduit le Fe^{3+} en Fe^{2+} qui se complexe alors avec le 2,2'-dipyridyl. Le composé ainsi formé absorbe à 525 nm. Le déhydroascorbate est réduit en ascorbate par le DTT.

2.1.1. Détermination de l'acide ascorbique libre

Une aliquote de 125 μL de l'extrait végétal est neutralisé avec 25 μL de 1.5M triéthanolamine. Un mélange de 150 μL de tampon phosphate (150mM, pH 7.4) et 150 μL de H_2O sont alors ajoutés.

2.1.2. Détermination de l'acide ascorbique total

Une aliquote de 125 μL d'extrait végétal est neutralisé avec 25 μL de 1.5M triéthanolamine. On additionne 150 μL de tampon phosphate et 75 μL de 10mM DTT. Le mélange est incubé à la température ambiante pendant 15 min afin de réduire le déhydroascorbate présent dans l'extrait.

L'excès de DTT est éliminé par l'ajout de 75 μL de 0.5% N-éthylmaléimide (m/v). L'échantillon est ensuite incubé pendant au moins 30 secondes à température ambiante.

Dans l'ensemble des échantillons, on ajoute successivement :

- 300µL d'acide trichloroacétique à 10% (m/v),
- 300µL d'acide phosphorique à 44% (v/v),
- 300µL de 2,2'dipyridyl à 4% (m/v) dans l'éthanol 70%
- 150µL de FeCl₃ à 3% (m/v)

La courbe étalon est préparée avec une gamme d'acide ascorbique en solution avec 5% d'acide métaphosphorique.

2.2. Dosage du glutathion réduit et oxydé

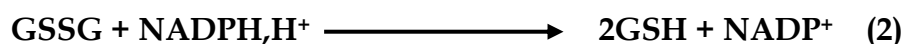
La méthode enzymatique, spécifique et sensible, dite de recyclage par DTNB-glutathion réductase (« DTNB-GSSG réductase Recycling assay ») permet de doser séparément, le glutathion total (GSH_T= GSH + GSSG) et le glutathion oxydé (GSSG). Ce dernier se fait par dérivation (alkylation) de la forme réduite (GSH).

2.2. a. Principe de la méthode de "recyclage par DTNB-GR" pour doser le GSH_T (GSH+GSSG)

Le GSH est oxydé par le DTNB [5-5'-dithiobis (acide -2- nitrobenzoïque)] pour donner GSSG avec la formation stœchiométrique de TNB, selon la réaction:



A cette étape, la totalité du glutathion de l'échantillon est sous forme oxydée (soit provenant de la réaction (1) soit préexistant dans l'extrait sous cette forme). GSSG est ensuite entièrement réduit par la GR en présence de NADPH, suivant la réaction (2):



Le GSH_T produit à partir de cette réaction s'engage à nouveau (d'où le terme "recyclage" de la méthode) dans la réaction (1) et le taux de formation de TNB est suivi à 412 nm et est proportionnel à la somme de GSH + GSSG.

* Mesure

NADPH (0.3mM) et DTNB (6mM) sont extemporanément préparés dans un tampon stock composé de 143mM K₂HPO₄ et de 6.3mM DTAP (acide diéthylène triamine pentaacétique) (pH final 7.5). Le mélange est incubé à 30°C pendant 15 min dans les proportions suivantes :

- NADPH	700µL
- DTNB	100µL
- H ₂ O	100µL

A l'ensemble, 100µL de l'extrait (surnageant) sont ajoutés, suivis de 0.5U de GR (type III de levure, Sigma), en mélangeant, pour initier la réaction puis la DO à 412 nm est immédiatement suivie en fonction du temps (seule la zone de linéarité est prise en considération). Un essai à blanc sans extrait contenant 100µL de tampon d'extraction sert pour la correction de base.

Une gamme étalon, réalisée dans les mêmes conditions, est préparée à partir des concentrations adéquates de GSSG.

2.2. b. Principe de la méthode de "recyclage par DTNB-GR" pour doser le GSSG

Le glutathion oxydé peut être dosé de la même manière que le glutathion total, et ce après traitement de la forme réduite (GSH) par le 2-vinylpyridine. Cet agent réagit avec les groupements (-SH) du glutathion réduit et son élimination du milieu réactionnel avant incubation de la GR s'avère non indispensable (**Anderson, 1985**).

***Mesure**

Le dosage de GSSG est réalisé de la même manière que pour le GSH_T, ce qui diffère est l'alkylation préalable des extraits par le 2-vinylpyridine avant le test enzymatique. En effet, 500µL de l'extrait sont incubés en présence de 10µL de 2-vinylpyridine. Le mélange est bien homogénéisé puis 30µL de triéthanolamine sont ajoutés et l'ensemble est vigoureusement agité.

Après 60 min, le GSSG est dosé à partir de 100µL du mélange, suivant la même procédure de GSH_T mais contenant 1UE de GR au lieu de 0.5 seulement pour le cas de GSH_T. Un contrôle avec le tampon d'extraction substituant l'extrait racinaire et une gamme étalon avec le GSSG est réalisé en parallèle.

2.2. c. Détermination de la teneur en glutathion réduit (GSH)

Les teneurs racinaires en GSH sont calculées par la différence des teneurs en glutathion total (GSH_T = GSH + GSSG) préalablement déterminées et celles en glutathion oxydé (GSSG).

$$\text{GSH} = \text{GSH}_T - \text{GSSG}$$

2.3. Dosage des thiols non-protéiques acido-solubles (SH_T) (pH<1)

Les teneurs en SH_T sont déterminées en utilisant le réactif d'Ellman, le DTNB. A 200µL de surnageant sont ajoutés 630µL de 0.5M K₂HPO₄ (pH 7.5) et l'absorbance à 412 nm est mesurée à 30°C. Après addition de 25µL de DTNB (extemporanément préparés dans un tampon stock (143mM K₂HPO₄ contenant 6.3mM DTAP, pH 7.5)), la DO est lue après 2 min. L'augmentation de l'absorbance de l'échantillon avant et après l'addition de DTNB est corrigée par l'absorbance du réactif DTNB lui-même. Ceci est réalisé avec un essai à blanc où le surnageant est substitué par 300µL de tampon d'extraction.

On calcule les concentrations de SH_T en utilisant le coefficient d'extinction molaire du DTNB; $\epsilon = 13600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Ellman, 1959).

2.4. Estimation des teneurs en phytochélatines

La soustraction de la teneur du glutathion réduit de celle des thiols non protéiques acido-solubles (pH<1) totaux est utilisée comme une estimation des phytochélatines (PC).

$$\begin{array}{rcccl} \text{PC} & = & \text{SH}_T & - & \text{GSH} \\ \text{Phytochélatines} & & \text{Thiols} & & \text{Glutathion} \\ & & \text{non-protéiques} & & \text{réduit} \\ & & \text{totaux} & & \end{array}$$

XI. Dosage des phénols

La quantité des phénols est estimée selon la méthode de Swain et Hillis (1959). Le dosage repose sur l'utilisation du réactif de Folin-Ciocalteu. Ce réactif est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique. L'oxydation des phénols réduit ce réactif en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène. L'intensité de la couleur est proportionnelle au taux de composés phénoliques oxydés.

La matière végétale est broyée dans l'éthanol 80%(v/v) puis agitée à chaud pendant 30 min. L'éthanol est évaporé et le résidu est solubilisé dans 20mL d'eau distillée. A 1mL d'aliquote, on ajoute 7.5mL d'eau distillée et 0.5mL de réactif de Folin, puis on agite rigoureusement.

Après 3 min, on ajoute dans le tube 1mL d'une solution saturée de Na₂CO₃ (40%). On incube 1 heure à température ambiante. L'absorbance à 725 nm est mesurée et la quantité de phénols est exprimée en unités selon la formule suivante :

$$\text{Phénols totaux (Unités)} = \frac{A_{725} \times V}{MF}$$

A = Absorbance à 725nm

V = Volume de l'extrait (mL)

MF = Matière végétale fraîche (g)

XII. Extraction des ARN totaux et PCR quantitative en temps réel

1. Extraction des ARN

Les échantillons sont broyés dans l'azote liquide, empêchant ainsi tout réchauffement des tissus pouvant être à l'origine de la dégradation des ARN par les ARNases (très fragiles à l'extraction) (**Annexe I**).

On ajoute 1mL de Tri-Reagent : La composition du Kit n'est pas connu mais on peut supposer qu'il contient un anti-oxydant pour éviter l'oxydation des composants cellulaires, un inhibiteur des ARNases, du LiCl à 2M final permettant la précipitation différentielle des ARN (vis-à-vis de l'ADN génomique) lors de l'addition de l'isopropanol, du phénol pour la déprotéinisation en présence de chloroforme, des sels tels que l'acétate de sodium pour la précipitation des ARN avec l'isopropanol. Le Tri-Reagent permet de maintenir l'intégrité des acides nucléiques tout en dégradant les composants cellulaires.

L'addition de chloroforme, réagissant avec le phénol du Tri-Reagent, suivie d'une étape de centrifugation permet la séparation de l'homogénat en 2 phases :

- une phase organique contenant du chloroforme et du phénol
- une phase aqueuse contenant les acides nucléiques.

Après récupération de la phase aqueuse, l'ajout d'isopropanol permet la précipitation des ARN. Après centrifugation, on obtient un culot d'ARN qui sera lavé à l'éthanol 70% afin d'éliminer les traces de sels et permettra un séchage rapide du culot.

Le culot est resuspendu dans un volume minimum d'eau à déterminer. Une nouvelle centrifugation est réalisée afin d'éliminer les dernières insolubilités. Le surnageant contient alors les ARN solubilisés et purifiés.

2. Dosage des ARN par spectrophotométrie

Le dosage des ARN est réalisé à l'aide d'un spectrophotomètre UV. Il permet d'une part de vérifier la pureté des ARN obtenus et d'autre part de connaître leur concentration. Il

sera préférable de ramener tous les échantillons à une concentration en ARN identique. Le dosage est effectué avec l'ARN dilué 100 fois.

La densité optique est mesurée à deux longueurs d'onde différentes : $\lambda = 260$ nm (maximum d'absorption des acides nucléiques) et $\lambda = 280$ nm (maximum d'absorption des protéines). Le rapport $R = DO_{260} / DO_{280}$ permet de déterminer le niveau de contamination protéique des ARN : $R \geq 1,8$ correspond à une bonne déprotéinisation.

La relation : $DO (260 \text{ nm}) = 1 \longleftrightarrow [ARN] = 40 \mu\text{g} / \text{ml}$ permet de déterminer la concentration en ARN de chaque échantillon ($[ARN] = (40 \cdot 100 \cdot DO_{260}) / 1000$). En déterminant le volume exact de chaque échantillon, ils sont ramenés à une concentration identique pour plus d'homogénéité.

3. Electrophorèse des ARN sur gel d'agarose

Cette étape est un contrôle permettant de vérifier l'intégrité des ARN. On fait migrer $1 \mu\text{g}$ d'ARN en présence de $5 \mu\text{L}$ de tampon de charge sur un gel d'agarose 1% (**Annexe II**).

Les ARN sont visualisés sur une table UV grâce au BET ajouté lors de la préparation du gel. Le BET est un agent intercalant qui s'insère entre les bases des acides nucléiques et qui présente, lorsqu'il est intercalé, une fluorescence orange sous UV courts (environ 300 nm).

La visualisation nette des sous unités ribosomiques 28S, 18S et 5S témoigne d'une bonne intégrité des ARN.

4. Synthèse des ADN complémentaires

La synthèse d'ADNc se fait par transcription inverse des ARNm à partir de 800ng d'ARN (**Annexe III**).

Une première étape de dénaturation des ARN est réalisée (2 min à 70°C). Celle-ci est indispensable pour déplier les éventuelles structures secondaires. En effet, il est possible que l'ARN (simple brin) se soit hybridé sur lui-même en formant une boucle. Dans ce cas, la reverse transcriptase ne peut pas synthétiser l'ADNc en entier sans dénaturation.

Après dénaturation des échantillons d'ARN, un milieu réactionnel est ajouté. Il contient du tampon pour le maintien du pH optimal (8-9) de l'enzyme RT (MMLV), du MgCl_2 indispensable à l'activité de l'enzyme RT, des dNTP (nucléotides), des amorces oligonucléotidiques constituées d'une série de thymines qui s'hybrident sur la queue poly (A) des ARNm, un inhibiteur de RNases et l'enzyme RT catalysant la synthèse des ADNc (à ajouter extemporanément).

La synthèse de l'ADNc est réalisée pendant 30 min à 48°C. La réaction est stoppée en inactivant l'enzyme à 95°C pendant 5 min.

5. Polymerase Chain Reaction: PCR

La PCR correspond à une amplification d'un fragment d'ADN matrice délimité par des amorces spécifiques. La PCR comporte 3 étapes :

- La dénaturation des ADN permettant de séparer les deux brins complémentaires;
- L'hybridation des amorces sens et anti-sens aux ADN matrices grâce à une température qui leur est thermodynamiquement favorable : le Tm ("Melting Temperature") déterminé selon la formule prenant en compte le pourcentage en GC : $T_m = 2(A+T) + 4(G+C)$.
- L'élongation permet à l'ADN polymérase thermostable de synthétiser le brin complémentaire de leur ADN matrice à une température qui lui est optimale. Ce brin est fabriqué à partir des dNTPs libres présents dans le milieu réactionnel.

5.1. Choix des amorces

Les amorces utilisées sont sélectionnées de deux façons : soit elles sont directement sélectionnées sur la séquence des gènes spécifiques de *Vicia faba* dans les banques de données NCBI (cas de *Actine*, *MT1* et *MT2*), soit il est nécessaire d'effectuer un alignement de séquences de gènes d'espèces différentes (*Pisum sativum* et autres espèces) pour localiser les séquences conservées. Dans ces séquences conservées, les amorces "sens" et "anti-sens" (25 pb) sont désignées à partir de gènes de *Pisum sativum*, l'espèce la plus proche génétiquement de *Vicia faba* (Famille des Fabacées) (*hsp70.1*, *PCs*, *cat*, *CuZnSODcy*, *Mn SOD* et *GR*). Un exemple d'alignement est montré en **Annexe IV**. Ces différentes séquences sont alignées grâce au logiciel ClustalW (logiciel d'alignements multiples de séquences: <http://align.genome.jp/>).

Plusieurs conditions sont à respecter pour permettre une bonne hybridation des amorces sur la séquence cible: le pourcentage en G + C des amorces choisies doit être compris entre 50 à 60%, leur extrémité 3' doit être riche en G ou C, la température de fusion doit être comprise entre 55 et 68°C et les Tm des deux amorces doivent être similaires.

5.2. PCR de contrôle

Les amorces désignées sont testées dans une PCR de contrôle afin de s'assurer de l'amplification spécifique de la matrice cible.

La PCR de contrôle est donc réalisée à partir de 0.2 à 1ng d'ADNc (**Annexe V**) et en présence des amorces désignées. Les produits PCR sont ensuite séparés sur un gel d'agarose à 1.2 %.

5.3. Séquençage

Les produits de PCR sont séparés sur gel d'agarose (0.9%), les bandes sont coupées et purifiées en utilisant le kit GFXTM PCR DNA (**Annexe VI**). La taille des fragments est vérifiée à nouveau par électrophorèse sur gel d'agarose (1.2%) avant le séquençage (MWG/OPERON).

La détermination de l'homologie de nos séquences avec celles de *Pisum sativum* est réalisée en faisant des BLAST dans la banque de données NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

5.4. PCR quantitative en temps réel

La PCR quantitative en temps réel permet de mesurer une quantité de transcrits accumulés dans une condition expérimentale donnée. La quantité d'ADN issue de l'amplification est enregistrée en temps réel par un enregistreur de fluorescence. L'évolution de cette amplification peut être représentée par une courbe d'allure sigmoïdale en 3 phases. Une première phase où la fluorescence du puits contenant de l'ADN ne se démarque pas du bruit de fond, une phase exponentielle et une phase plateau. Les quantités d'ADN sont comparées dans la partie exponentielle, moment pendant lequel l'augmentation de la quantité d'ADN est proportionnelle à la quantité initiale de matrice (**Higuchi et al., 1993; Heid et al., 1996**).

Le dispositif expérimental est composé d'un thermocycleur classique associé à un système d'enregistrement de la fluorescence, interfacé sur un ordinateur PC qui contrôle le fonctionnement de l'ensemble.

Une lampe halogène produit, grâce à un filtre, une lumière monochromatique centrée à 485 nm qui est transmise optiquement jusqu'à la plaque de PCR. Le SYBR Green®, fluorophore présent dans le mélange réactionnel, est excité à cette longueur d'onde et émet une fluorescence verte à 520 nm. Le rayonnement émis est capté par un système de détection vidéo et les images de la plaque sont stockées dans la mémoire de l'ordinateur.

Le SYBR-Green® est une molécule qui se fixe dans le petit sillon de l'hélice de l'ADN. Son rendement quantique de fluorescence (intensité du rayonnement émis) augmente significativement lorsqu'il est fixé à l'ADN double-brin. Ainsi, grâce à cette molécule et au système d'enregistrement de la fluorescence, la progression de l'amplification est suivie à chaque cycle et en temps réel.

Le logiciel Bio-Rad iQ5 permet d'une part de programmer et de contrôler le déroulement des expériences de PCR quantitative et d'autre part, d'en stocker et exploiter les données. L'interface graphique est divisée en trois parties: la première pour saisir les conditions de PCR, la seconde pour saisir les données concernant les puits (position, couple d'amorces, type d'échantillon) et la troisième pour afficher l'analyse des résultats.

5.5. Quantification de l'ADN par la détection de fluorescence

5.5.1. Cycle-seuil et nombre de copies initiales

A la fin de la PCR, le logiciel représente graphiquement l'augmentation de la fluorescence de chaque puits au cours des cycles successifs. Le nombre de cycles étant placé en abscisse et le logarithme de l'intensité de la fluorescence en ordonnée, les amplifications suivent une courbe sigmoïde en 3 phases. Pendant la première phase (pouvant durer 15 à 25 cycles), la fluorescence du puits contenant de l'ADN ne se démarque pas du bruit de fond. Puis l'augmentation de la fluorescence passe par une phase exponentielle visuelle (deuxième phase, 5 cycles environ) avant de ralentir et atteindre un plateau (dernière phase).

Le cycle-seuil ou C_t (*threshold cycle*) correspond au cycle au cours duquel la fluorescence d'un échantillon devient significativement différente du bruit de fond. Ce seuil permet de comparer toutes les amplifications pendant la phase exponentielle. Si toutes les conditions de PCR sont respectées, il existe une relation linéaire entre le nombre de copies d'un gène présent initialement dans le puit et le cycle-seuil.

Si N est le nombre de copies du gène au cycle C_n de la PCR et N_0 le nombre de copies présentes au départ dans le tube, le nombre de copies du gène au cycle C_n peut être exprimé par la formule :

$$N = N_0 \cdot (1 + E)^{C_n} \quad (1) \quad \text{où } E \text{ est l'efficacité de la PCR (avec } E \leq 1).$$

Le nombre de molécules accumulées au cycle-seuil C_t quelque soit N_0 est donc:

$$N = N_0 \cdot (1 + E)^{C_t} \quad (2)$$

Au cycle-seuil, l'intensité de la fluorescence est la même pour tous les puits. Donc, au cycle-seuil, le nombre de copies est identique quelle que soit la quantité initiale de matrice. Ainsi, pour deux nombres de molécules initiaux différents, N_1 et N_2 , on peut écrire :

$$N_1 \cdot (1 + E)^{Ct1} = N_2 \cdot (1 + E)^{Ct2}$$

soit :

$$N_1/N_2 = (1 + E)^{Ct2} / (1 + E)^{Ct1}$$

ou encore:

$$N_1/N_2 = (1+E)^{Ct2-Ct1}$$

Les réactions de qPCR sont réalisées à partir d'ADNc déposé dans les puits auxquels est rajouté un mix contenant les amorces à tester et le SYBRGreen (**Annexe VII**).

5.5.2. Quantification relative

Elle consiste en la comparaison directe de deux conditions données. Cette approche nécessite la quantification en parallèle pour chaque condition de la quantité d'un gène de référence. Cette référence est parfois délicate à choisir. Il faut en effet que cela soit un gène dont l'expression ne varie pas entre les deux conditions comparées. Dans notre cas, on a choisi l'actine de *Vicia faba* comme référence (*Actine*). Le gène de l'actine est un gène domestique non régulé par les métaux lourds.

Les quantités relatives obtenues peuvent ensuite être graphiquement interprétées en réalisant un histogramme de la quantité relative en fonction du temps.

Les résultats sont accompagnés d'une courbe de fusion permettant de vérifier qu'un gène unique est amplifié ainsi que d'une courbe d'amplification représentant la fluorescence et donc indirectement l'évolution de la quantité de transcrits en fonction du nombre de cycles.

5.5.3. Techniques des $2^{-\Delta(\Delta Ct)}$

$$R = N'_1/N'_2 = 2^{-[(Ct_{\text{gène1}} - Ct_{\text{ref1}}) - (Ct_{\text{gène2}} - Ct_{\text{ref2}})]}$$

Où

- * R est la quantité relative de transcrits
- * N'_1 est la quantité normalisée d'ADNc du gène d'intérêt dans la condition 1
- * N'_2 est la quantité normalisée d'ADNc du gène d'intérêt dans la condition 2
- * $Ct_{\text{gène1}}$ est le Ct obtenu lors de l'amplification du gène d'intérêt dans la condition 1
- * $Ct_{\text{gène2}}$ est le Ct obtenu lors de l'amplification du gène d'intérêt dans la condition 2
- * Ct_{ref1} est le Ct obtenu lors de l'amplification du gène de référence dans la condition 1
- * Ct_{ref2} est le Ct obtenu lors de l'amplification du gène de référence dans la condition 2

XIII. Indice mitotique et numérisation des micronoyaux

Les graines de *Vicia faba* sont germées, repiquées puis traitées par 50, 100 et 200 μ M de CdCl₂ pendant 12, 24 et 48 h. Lors de la récolte, 2 à 3 cm des zones méristématiques sont récupérées et fixées dans une solution d'acide acétique et d'éthanol (v/v : 1/3) durant une nuit, à l'obscurité et à 4°C.

Les racines sont conservées dans l'éthanol 70%. Lors de l'utilisation, elles sont rincées à l'eau distillée pendant 10 min puis hydrolysées par HCl (1N) qui permet la dissociation des structures cellulaires.

La coiffe racinaire doit être éliminée et les deux premiers millimètres de la partie méristématique sont écrasés sur une lame microscopique et colorés avec l'orcéine.

L'indice mitotique réfère au nombre des cellules en division comptées sur 100 cellules (grossissement x400).

Le test de micronoyaux vise à mettre en évidence la présence d'un nombre accru d'altérations chromosomiques au niveau des noyaux des cellules racinaires de *Vicia faba* suite à l'application du stress métallique par le cadmium. La préparation est observée à l'objectif à immersion (grossissement x1000). Au moins 3 étalements sont réalisés pour chaque échantillon afin de décompter 1000 cellules par lame.

Résultats et Discussion

**Chapitre I : Effets du cadmium sur la croissance
et accumulation intracellulaire du cadmium
chez la fève**

I. Introduction

Dans le premier chapitre de notre travail, nous avons essayé de mettre en évidence la modification de la morphologie de jeunes plantes de fève traitées par 50, 100 et 200 μ M de CdCl₂ pendant 12, 24 et 48 h. Notre étude a porté sur la caractérisation des symptômes d'intoxication, l'effet du stress cadmique sur l'expansion foliaire, sur la croissance longitudinale de la racine, sur la production des matières fraîche et sèche et sur la teneur en eau.

Nous nous sommes intéressés aussi à l'étude de l'effet de Cd sur les pigments photorécepteurs.

L'étude de la nutrition minérale et de l'accumulation du cadmium au niveau des différentes parties des plantules de fève constituent aussi une partie de ce chapitre.

II. Résultats

1. Effets du Cd sur certains paramètres de la croissance et l'hydratation des tissus chez la fève

1.1. Symptômes de toxicité de Cd

Les plantules de fèves traitées par 50, 100 et 200 μ M de Cd montrent un retard dans le développement des feuilles (**Figure 8a**). En effet, une diminution significative de l'expansion foliaire a été observée dès 24 h de traitement par les trois concentrations de CdCl₂. Après 48 h de traitement, cette réduction est d'environ 40% en présence de 100 et 200 μ M de CdCl₂ et elle n'est que de 17% à 50 μ M de ce métal.

De même, les trois concentrations de CdCl₂ provoquent une inhibition de la croissance racinaire dès 24 h de traitement (**Figure 8b**).

Au niveau phénotypique, on observe un brunissement du système racinaire (**figure 9**) et une diminution de la taille des racines secondaires à 48 h de traitement observés aussi sous l'effet des trois traitements.

1.2. Effets de Cd sur les biomasses fraîche et sèche et sur la teneur en eau

Le Cd induit une réduction d'environ 30% de la biomasse fraîche des feuilles de *Vicia*

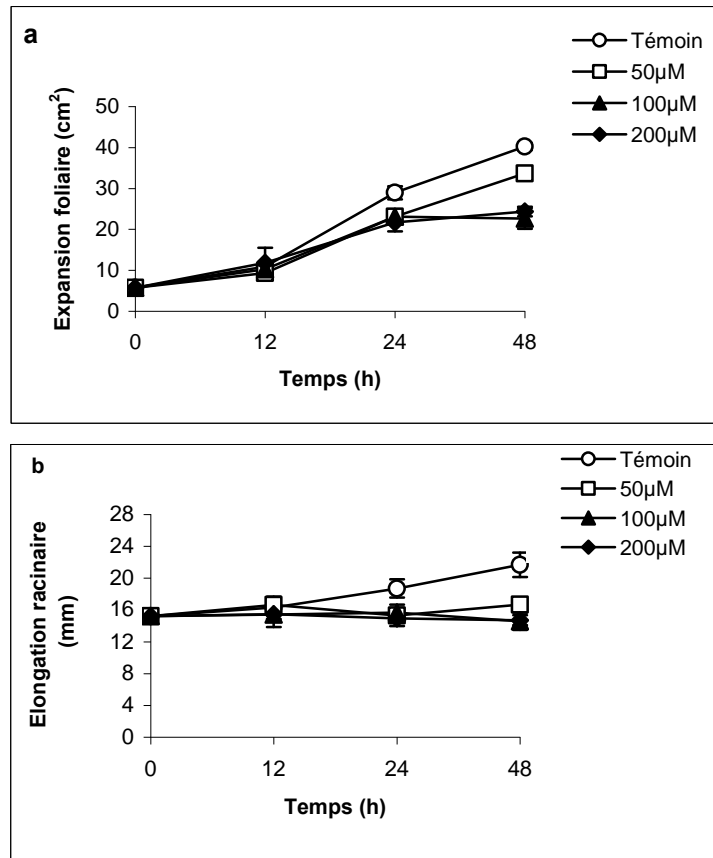


Figure 8: Effets du cadmium sur l'expansion foliaire (a) et l'élongation racinaire (b) chez les plantules de fève. Les valeurs moyennes et les erreurs standards ont été déterminées à partir de 6 mesures individuelles.

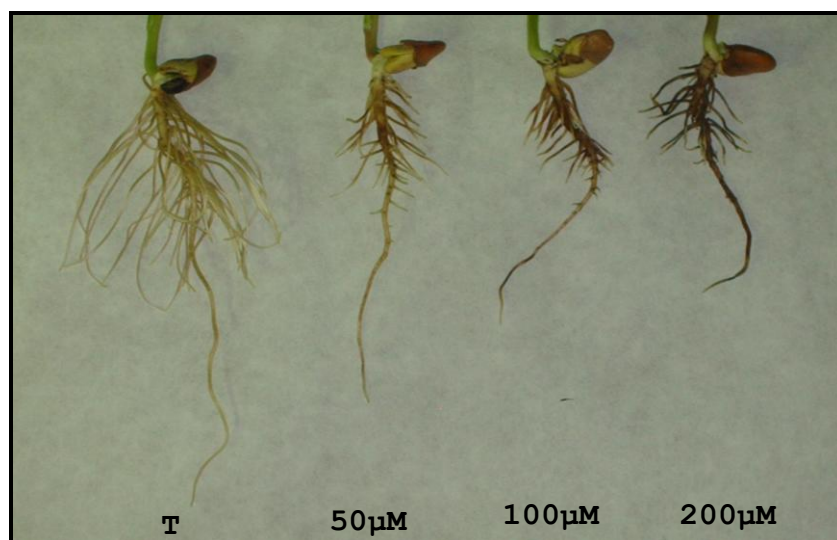


Figure 9: Aspects morphologiques de plantules de fève après 48 h de traitement par différentes concentrations de CdCl_2 . Brunissement racinaire et diminution de la taille des racines secondaires.

faba à la fin des traitements par 50, 100 et 200 μ M de Cd (**Figure 10a**). Au niveau racinaire (**Figure 11a**), cette réduction est plus précoce sous l'effet des traitements avec 100 et 200 μ M de Cd. A 48 h d'exposition, la diminution de la biomasse fraîche est d'environ 40% à 50 μ M et 100 μ M de Cd et atteint 53% de réduction au traitement 200 μ M de Cd.

Les feuilles de fève traitées par 50, 100 et 200 μ M de Cd ne montrent une diminution significative de leur biomasse sèche qu'à la fin du traitement (**Figure 10b**), alors que la réduction de matière sèche racinaire (**Figure 11b**) est importante dès 24 h du traitement à des concentrations de 100 et 200 μ M de Cd. Plus tard, cette réduction est plus prononcée sous l'effet des trois traitements.

Toutefois, les racines semblent être plus affectées que les feuilles. En effet, une réduction d'environ 40% de la biomasse sèche a été notée au niveau racinaire à 48 h de traitement alors que cette réduction n'atteint qu'environ 20% au niveau foliaire à 50, 100 et 200 μ M de CdCl₂.

Les résultats concernant l'hydratation tissulaire montrent :

- une teneur en eau non affectée par les différentes concentrations métalliques au niveau de la partie aérienne (**Figure 10c**).
- une réduction notable de la teneur en eau après 48 h de traitement pour les différentes concentrations utilisées au niveau des racines de fève (environ 20% de réduction par rapport au témoin) (**Figure 11c**).

2. Effets de Cd sur les pigments photorécepteurs

La **figure 12** représente l'évolution de différents pigments photorécepteurs: chlorophylle totale, chlorophylle a, chlorophylle b et caroténoïdes des feuilles de plantules de *Vicia faba* témoins et traitées par le Cd durant 12, 24 et 48 h.

Nous avons noté une réduction significative de la chlorophylle totale (**Figure 12a**) qui atteint 30% au terme du traitement avec 100 et 200 μ M de Cd. Cette diminution touche exclusivement la chlorophylle b (**Figure 12c**) alors qu'une insensibilité de la chlorophylle a (**Figure 12b**) a été remarquée.

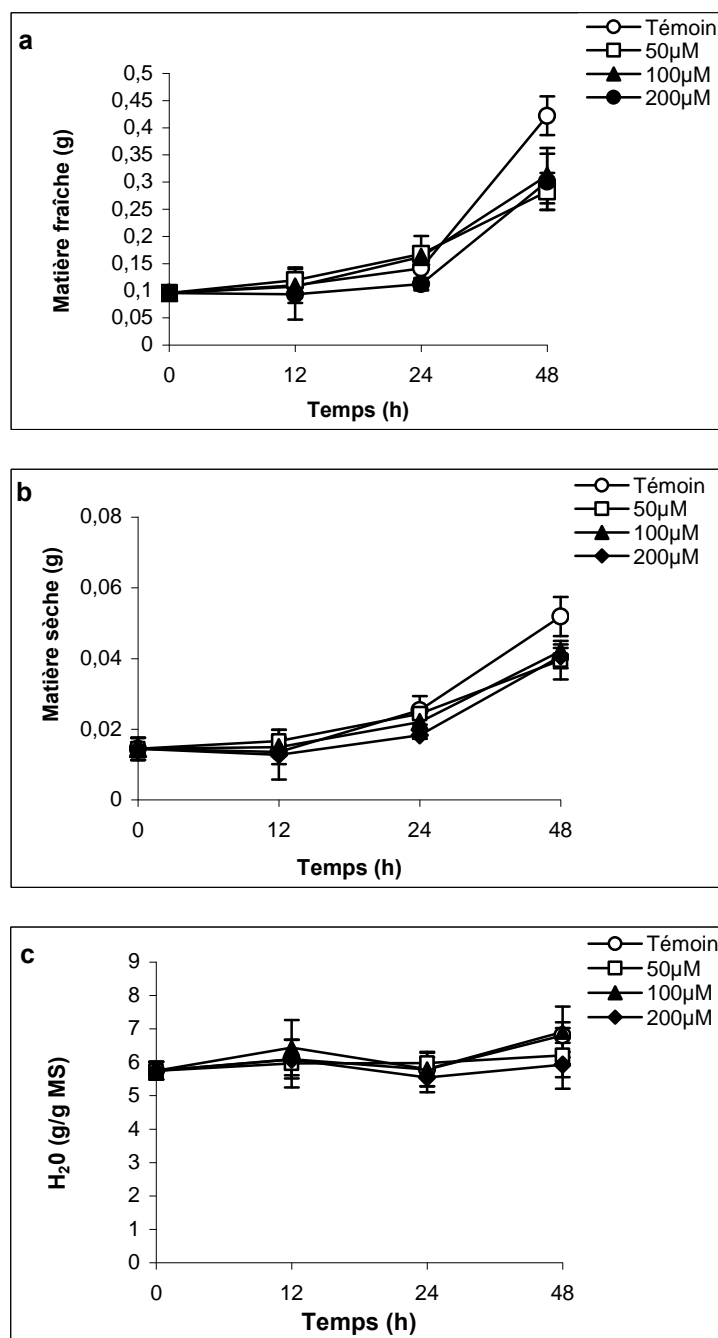


Figure 10: Effets de différentes concentrations de Cd sur la matière fraîche (a), la matière sèche (b) et la teneur en eau (c) au niveau des feuilles de *Vicia faba*. Les valeurs moyennes et les erreurs standards ont été déterminées à partir de 6 mesures individuelles.

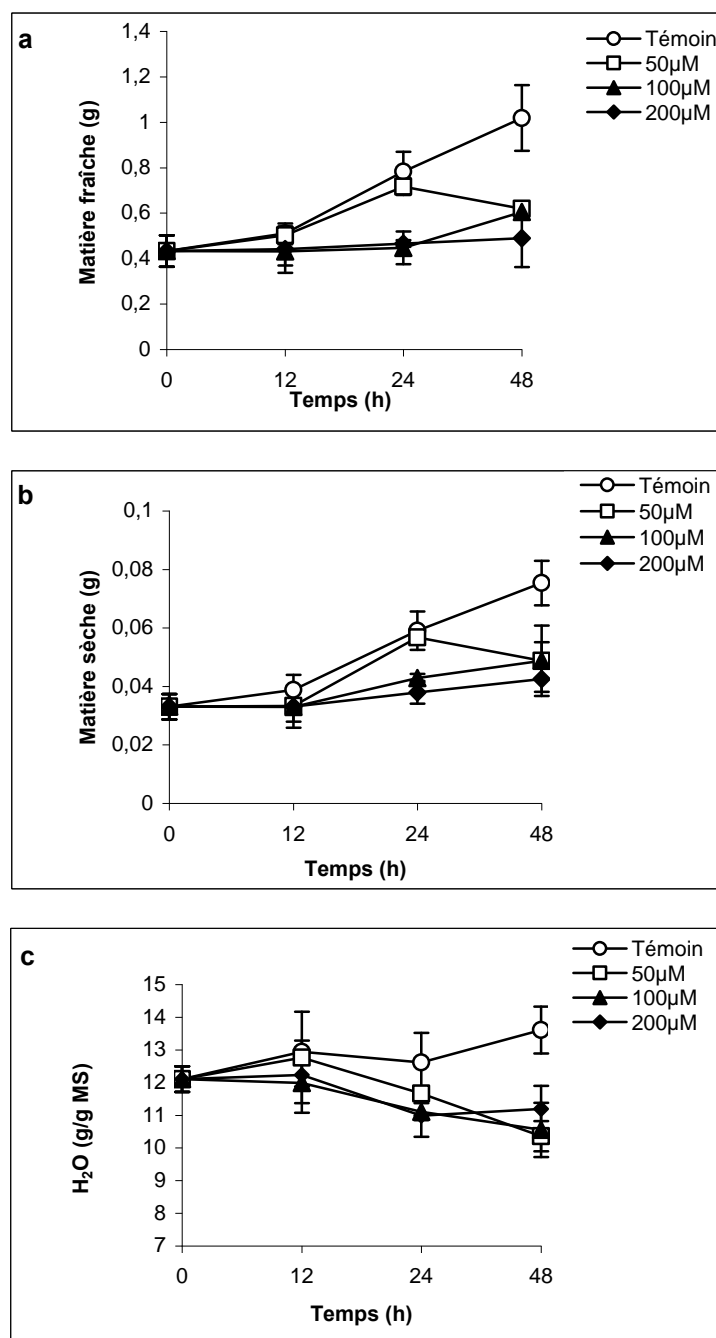


Figure 11: Effets de différentes concentrations de Cd sur la matière fraîche (a), matière sèche (b) et la teneur en eau (c) au niveau des racines de *Vicia faba*. Les valeurs moyennes et les erreurs standards ont été déterminées à partir de 6 mesures individuelles.

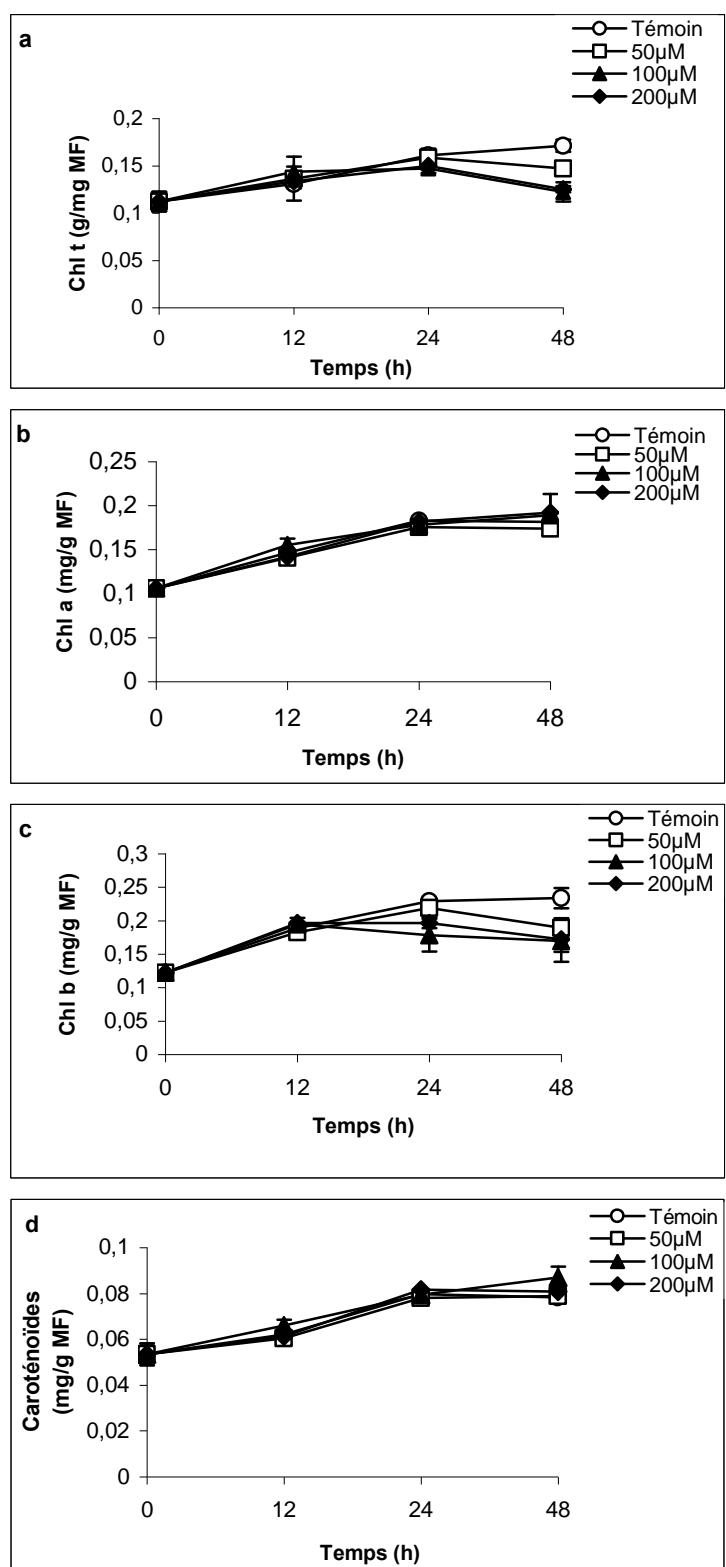


Figure 12: Effets du cadmium sur la teneur en pigments photorécepteurs au niveau des feuilles de *Vicia faba*. Les valeurs moyennes et les erreurs standards ont été déterminées à partir de 6 mesures individuelles. (Chl: chlorophylle).

Les différentes concentrations de Cd utilisées n'ont aucun effet sur la teneur en caroténoïdes (**Figure 12d**) pendant la période du traitement.

3. Effets de Cd sur la nutrition minérale

* **Le Zinc** : les teneurs en Zn des feuilles semblent significativement diminuées chez les plantules traitées par rapport à celles des témoins dès 24 h du traitement (**Figure 13a**). Au niveau de cet organe, cette diminution atteint 30% par rapport au témoin en présence de 50µM de Cd dans la solution nutritive, 40% en présence de 100µM et n'atteint que 20% pour la plus forte concentration du métal (200µM). Au niveau des racines, cependant, la variation de la concentration de Cd ne conduit pas à une modification de la teneur en zinc (**Figure 13b**).

* **Le Fer** : Les variations de la teneur en fer, observées avec les différents traitements, sont représentées dans la **figure 14**. Au niveau des feuilles, le cadmium entraîne une réduction de la teneur de cet élément. Cette réduction est d'environ 55% à 48 h d'exposition quelque soit la dose de Cd dans les solutions nutritives (**Figure 14a**). Contrairement aux feuilles, les racines (**Figure 14b**) montrent une accumulation importante de cet oligo-élément dès 12 h d'application de Cd dans la solution nutritive. Cette augmentation atteint 30% en présence de 50µM de Cd, 60% pour une concentration de 100µM et 75% pour une dose de 200µM de Cd.

* **Le calcium** : le cadmium provoque une diminution de la teneur en calcium au niveau des feuilles de *Vicia faba*. En effet, à la fin du traitement (48 h), une dose de 50µM de Cd réduit de 34% la teneur en calcium alors que des concentrations de 100 et 200µM provoquent une réduction d'environ 60% de la teneur en calcium (**Figure 15a**).

En ce qui concerne les racines (**Figure 15b**), une diminution de 26% de l'accumulation de cet élément est observée suite à des traitements par 100 et 200µM de Cd pendant 48 h.

4. Accumulation de Cd

Au niveau des feuilles (**Figure 16a**), la teneur en Cd augmente significativement dès 24 h de traitement.

Au niveau racinaire (**Figure 16b**), l'augmentation de la teneur en Cd varie selon la dose et la durée du traitement. Cette augmentation est notée dès le début du traitement avec les 3 concentrations du métal. Après 48 h d'exposition, en présence de 50µM

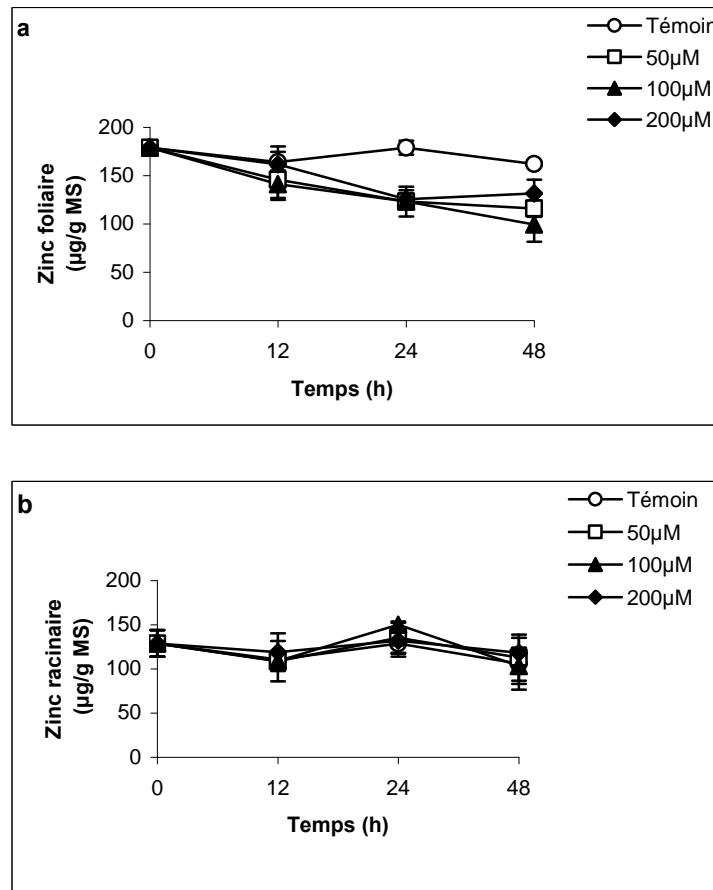


Figure 13: Teneur en zinc au niveau des feuilles (a) et des racines (b) des plantules de *Vicia faba*. Les valeurs moyennes et les erreurs standards ont été déterminées à partir de 6 mesures individuelles.

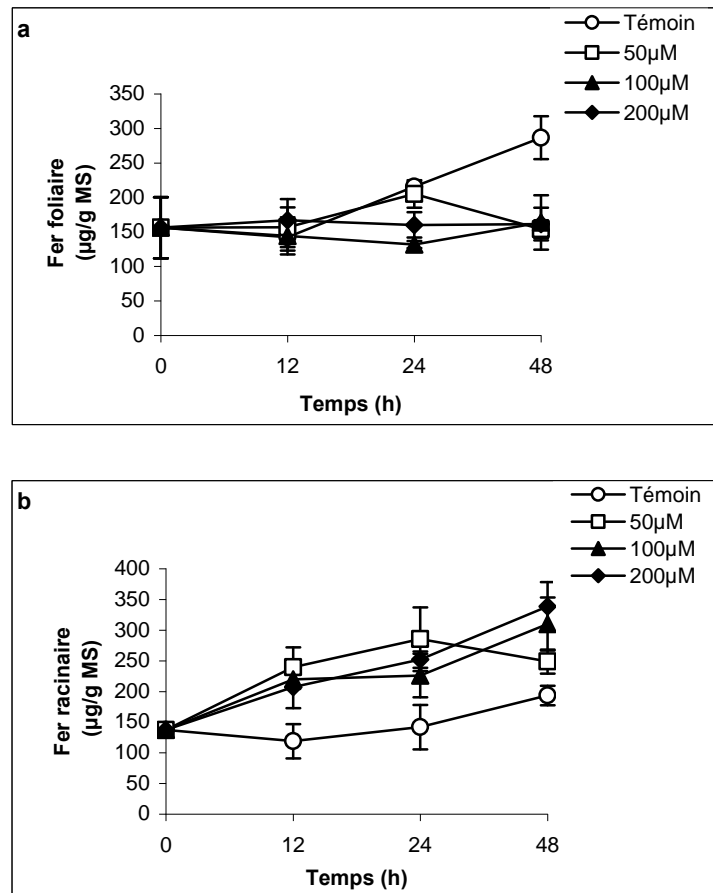


Figure 14: Teneur en fer au niveau des feuilles (a) et des racines (b) des plantules de *Vicia faba*. Les valeurs moyennes et les erreurs standards ont été déterminées à partir de 6 mesures individuelles.

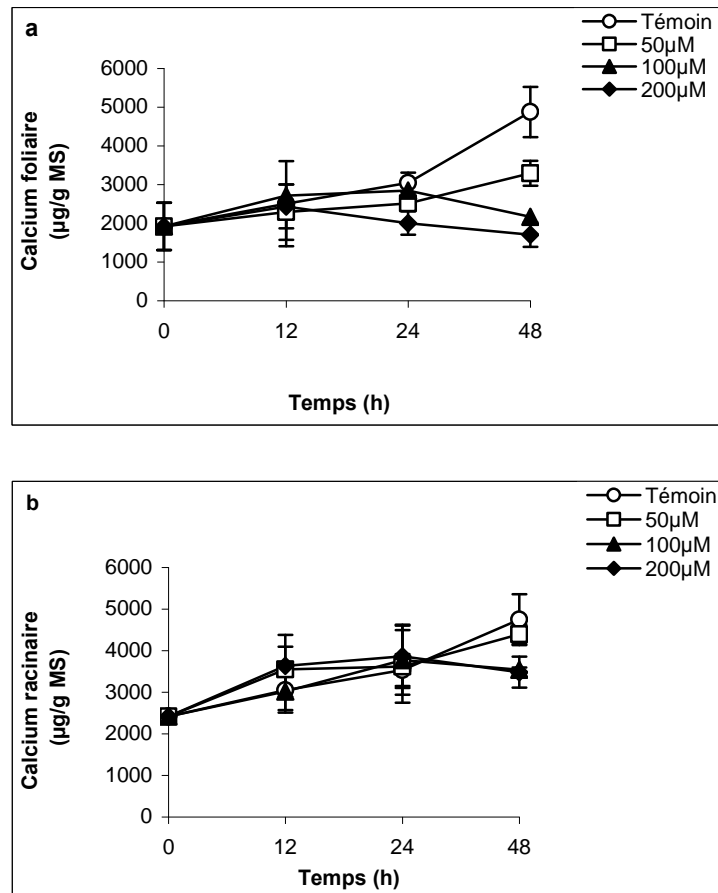


Figure 15: Teneur en calcium au niveau des feuilles (a) et des racines (b) des plantules de *Vicia faba*. Les valeurs moyennes et les erreurs standards ont été déterminées à partir de 6 mesures individuelles.

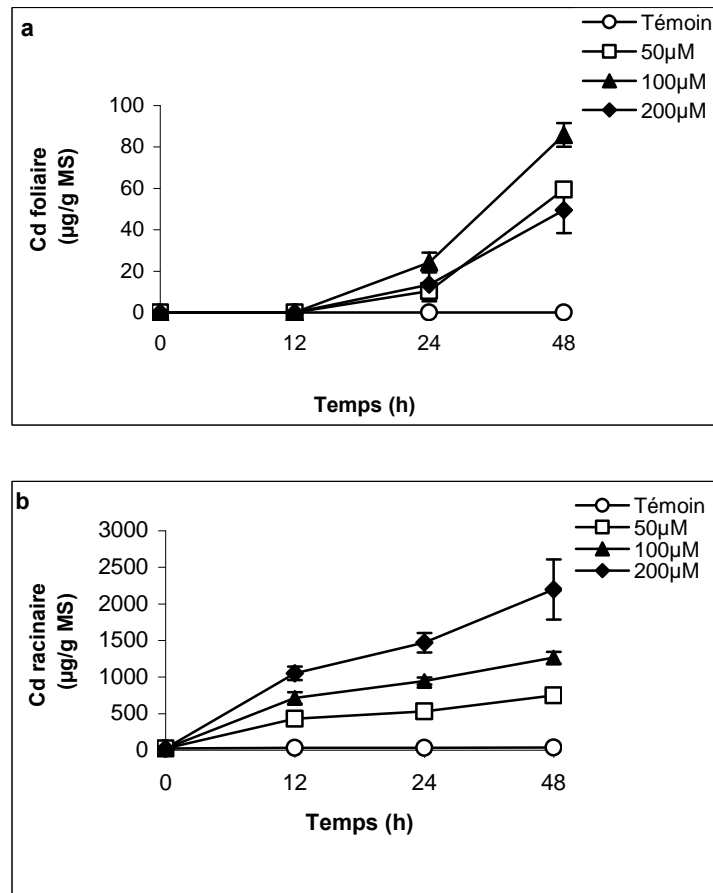


Figure 16 : Teneur en cadmium au niveau des feuilles (a) et des racines (b) des plantules de *Vicia faba*. Les valeurs moyennes et les erreurs standards ont été déterminées à partir de 6 mesures individuelles.

de Cd dans la solution nutritive, la teneur en Cd est 22 fois celle du témoin. Cette augmentation est 37 fois celle du témoin dans le cas d'une concentration de 100 μ M et 64 fois celle du témoin pour la plus forte concentration (200 μ M).

Le niveau d'accumulation du métal n'est pas le même dans les deux organes de la plante. En effet, le système racinaire accumule beaucoup plus de Cd que la partie foliaire. Pour une dose de 50 μ M présente dans la solution nutritive par exemple, la teneur en Cd au niveau foliaire est de 59.28 μ g/g MS alors qu'elle est de 745.70 μ g/g MS au niveau racinaire. Pour la concentration la plus forte (200 μ M), cette accumulation est de 49.48 μ g/g MS au niveau de la partie foliaire alors qu'elle est de 2194,52 μ g/g MS au niveau racinaire.

III. Discussion

Dans ce chapitre, nous avons étudié l'incidence de trois doses de cadmium (50, 100 et 200 μ M), durant une cinétique de 0, 12, 24 et 48 heures sur des plantules de *Vicia faba*. La cinétique ainsi que les concentrations ont été choisies à partir des essais préliminaires relatifs à l'effet du cadmium sur la division cellulaire et l'induction des micronoyaux. Différents paramètres ont été étudiés au niveau des racines et de deux premiers étages foliaires qui apparaissent sur des plantules de fève âgées de 12 jours.

L'incidence de ce stress métallique a porté, en particulier, sur les aspects morphologiques, sur certains paramètres de la croissance et sur la teneur en pigments photorécepteurs. L'accumulation de Cd et son effet sur la nutrition minérale ont été analysés aussi dans ce chapitre.

Chez la fève, les premiers signes d'intoxication métallique que nous avons observés, concernent un retard dans le développement des feuilles. Ceci pourrait être dû à la diminution de l'élasticité de la paroi cellulaire qui est un effet indirect du Cd (**Poschenrieder et al., 1989**) ou à la diminution de la photosynthèse (**Skórzyńska et Baszyński, 1998**).

Plusieurs travaux ont montré précédemment, d'autres manifestations phénotypiques tels qu'un jaunissement foliaire ou chlorose dans le cas d'un traitement par le cadmium chez la tomate (**El Alami, 1997**), le blé (**Ouzounidou et al., 1997**) et le Colza (**Ben Youssef et al., 2005**), et des nécroses foliaires au niveau des feuilles de Colza traitées par le Cd (**Ben Youssef et al., 2005**). Dans nos expériences, nous n'avons observé aucun de ces symptômes phénotypiques au niveau des feuilles de fève durant le traitement. **Lin et al. (2007)** ont signalé que, seules les fortes concentrations de Cd sont à l'origine des symptômes visuels et des

modifications morphologiques des plantes. Dans ce cas, cela suggère que la plus forte concentration de Cd utilisée dans nos expériences (200 μ M) est une dose insuffisante pour provoquer en 48 h des symptômes de toxicité au niveau des feuilles outre la diminution de la croissance.

Au niveau du système racinaire, nous avons observé un brunissement des racines des plantules traitées avec les 3 doses (50, 100 et 200 μ M de CdCl₂). Ce résultat est en accord avec les travaux de **Mishra et al. (2006)** qui ont aussi montré un brunissement des racines de *Bacopa monnieri* suite à un traitement équivalent de Cd (50 et 100 μ M) pendant 4 et 7 jours. De même, **Eloumi et al. (2007)** ont signalé un brunissement des racines de *Prunus dulcis* exposés au Cd pendant 14 jours. Ce symptôme de toxicité de Cd au niveau racinaire semble donc être un phénomène général.

Le brunissement des racines et l'absence de développement des racines latérales courtes pourrait être la conséquence d'une déficience en approvisionnement calcique comme l'ont suggéré **Greger et Lindberg (1987)**. Selon d'autres auteurs, cela pourrait être la conséquence d'une subérisation poussée au niveau de ces organes (**Barcelo et Poschenrieder, 1990**) qui limiterait l'absorption en eau (**Breckle, 1991**).

L'allongement et la ramification racinaire sont fortement affectés chez la fève dans nos conditions expérimentales. La racine primaire ainsi que les racines secondaires des plantules traitées montrent une réduction de leur croissance après 24 h du traitement et deviennent de plus en plus rigides par rapport à celles des témoins en présence des 3 traitements. La diminution de la croissance racinaire ainsi que la réduction du nombre et de la longueur des racines latérales sont des caractères phénotypiques observés précédemment chez *Pisum sativum* par **Rodriguez-Serrano et al. (2006)** suite à un traitement par une concentration de 50 μ M de Cd pendant 14 jours. **Lima et al. (2006)** ont également montré une réduction de l'élongation racinaire chez la même espèce en présence de 30, 60 et 90 μ M de Cd. Cette réduction atteint 50% chez *Hordeum vulgare* mis à germer sur papier filtre et traité par 1mM de Cd pendant 24 h (**Tamás et al., 2008**).

Nous avons également montré que la diminution de matière fraîche et sèche est plus précoce et plus importante dans les racines comparées aux feuilles. Par exemple, nous avons montré une réduction d'environ 40% de la matière sèche chez les racines de fève et d'environ 20% chez les feuilles après 48 h de traitement par 50, 100 et 200 μ M de Cd. Cependant, **Ben**

Youssef et al. (2005) ont montré que 50µM de Cd provoque une chute plus importante de la biomasse sèche au niveau des feuilles (67.2%) comparé aux racines (55.4%) chez des plantules de colza après 14 jours de traitement. Ce résultat suggère que les modifications morphologiques observées au niveau de différents organes de la plante dépendent de l'espèce végétale et de la durée du traitement.

Nous avons observé aussi que la teneur en eau diminue au niveau des racines de fève; elle est inaffectée au niveau des feuilles. La diminution de l'hydratation tissulaire au niveau racinaire pourrait résulter de la baisse de croissance des racines et par conséquent une diminution de la surface d'absorption racinaire.

Nos résultats montrent la vulnérabilité du système racinaire vis-à-vis du stress métallique comparé à celui des feuilles. Ceci a été démontré par divers travaux (**Chaiffi, 2003; Mishra et al., 2006**). La racine est l'organe directement en contact avec le métal. Le contact direct avec les ions cadmiques engendre de nombreuses perturbations métaboliques qui seront à l'origine des faits observés, à savoir les perturbations métaboliques qui touchent le métabolisme antioxydant, l'intégrité cellulaire, l'activité mitotique et la structure des chromosomes. Ces perturbations feront l'objet des chapitres suivants.

La baisse de la croissance peut être attribuée à l'activité NADPH oxydase. L'augmentation de l'activité de cette enzyme induit une accumulation de peroxyde d'hydrogène qui est à l'origine de la diminution de la plasticité de la paroi cellulaire (**Foraman et al., 2003**). Elle peut être liée aussi à l'activité des peroxydases apoplasmiques. Ces enzymes peuvent contribuer à une augmentation de la rigidité de la paroi cellulaire et par conséquent un blocage de la croissance (**Zhou et al., 2007**).

Notre étude concernant l'effet du Cd sur les différents pigments photorécepteurs a montré, dans notre cas, une réduction de la chlorophylle totale après un traitement de 48 h. Cette réduction est plus prononcée (environ 27%) à fortes concentrations (100 et 200µM) de Cd. Cette réduction touche seulement la chlorophylle b alors que la chlorophylle a et les caroténoïdes n'ont pas présenté une modification de leur teneur par rapport au témoin.

La diminution de la chlorophylle totale a été observée aussi chez *Bechmeria nivea*, *Bacopa monnieri* et *Pisum sativum* exposées au Cd (**Sandalio et al., 200; Mishra et al., 2006; Liu et al., 2007**).

Dans notre cas, la chlorophylle totale ne montre une diminution qu'à la fin du traitement, cela peut être dû au faible passage de l'ion métallique vers les parties aériennes pendant les premiers jours de traitement.

La dégradation de la chlorophylle ou l'inhibition de sa biosynthèse qui engendre une réduction de la photosynthèse est un facteur qui limite la croissance induite des parties aériennes en présence de Cd (**Bazzaz et al., 1992; Somashekaraiah et al., 1992; Dixit et al., 2001**).

L'analyse de la composition ionique des plantules traitées a mis en évidence un désordre nutritionnel chez la fève qui est variable selon l'organe. En effet, des carences en zinc, en fer et en calcium sont observées au niveau des feuilles de plantules de fève traitées par le Cd, alors qu'aucune variation de la composition en zinc n'est observée au niveau racinaire. Dans cet organe, une suraccumulation de la teneur en fer a été signalée ainsi qu'une diminution de l'élément calcium.

- Le zinc est un élément essentiel à la croissance des plantes et joue un rôle essentiel dans la biosynthèse des enzymes, des auxines et plusieurs protéines. La diminution du zinc au niveau des feuilles de fève peut engendrer une substitution de cet élément par le Cd et par la suite une inhibition de l'activité d'une enzyme clé du métabolisme antioxydant qui est la Cu-Zn SOD (**Van Assche et Clijesters, 1990; Aravind et Prasad, 2003**).
- Pour le fer, la diminution de sa teneur dans les feuilles de fève et son augmentation dans les racines ont déjà été montrées chez d'autres espèces (**Sandalio et al., 2001; Elloumi et al., 2007**).
- La réduction de la teneur en calcium au niveau des feuilles et des racines traitées par le Cd a été observée par d'autres auteurs (**Sandalio et al., 2001**). La diminution racinaire en calcium pourrait expliquer en partie le brunissement racinaire décrit précédemment (**Greger et Lindberg, 1987**).

Concernant la répartition du Cd entre les feuilles et les racines de fève, nos résultats montrent un faible passage des ions métalliques vers les feuilles et une localisation préférentielle de ces ions dans les racines. Par exemple, ces dernières montrent des teneurs 44 fois plus élevées que celles des feuilles suite à un traitement de 48 h en présence de 200µM de Cd. Ceci confirme l'importance de la racine en tant que site d'accumulation privilégiée de Cd comparativement aux autres parties de la plante (**Dixit et al., 2001; Sandalio et al., 2001; Mishra et al., 2006; Yannarelli et al., 2006; Lin et al., 2007; Liu et al., 2007**). Ceci

constitue un moyen permettant à la plante de limiter au maximum l'exportation des polluants métalliques vers les organes aériens.

L'accumulation de Cd au niveau racinaire peut s'expliquer, soit par une forte précipitation du métal dans les espaces intercellulaires (**Van Balen, 1980**) ou dans les vaisseaux du xylème (**Barcelo et al., 1989; Sela et al., 1988**), soit par une importante rétention pariétale du polluant (**Nishizono et al., 1989; Vecchia et al., 2005**), ou par sa séquestration endocellulaire par des peptides soufrés (**Mehra et Tripathi, 2000; Clemens, 2001; Bruns et al., 2001**).

Bien que le système pariétal des cellules racinaires puisse être un lieu privilégié de piégeage d'éléments métalliques, certains travaux ont, cependant montré que l'accumulation des métaux lourds dans les racines de certaines plantes, correspond en grande partie à une séquestration vacuolaire (**Boussama et al., 1996; Djebali et al., 2002**). Ceci suggère que les mécanismes qui régissent l'homéostasie des métaux lourds se manifestent préférentiellement à l'échelle endocellulaire.

Chapitre II : Effets du cadmium sur le métabolisme oxydant chez la fève

Partie 1

Etude du stress oxydant chez la fève

I. Introduction

Dans le chapitre précédent, nous avons montré que l'inhibition de la croissance constitue l'une des manifestations du stress métallique causé par le Cd chez la fève. L'inhibition de la croissance observée sur notre modèle végétal est certainement la résultante de plusieurs effets sur le métabolisme de la plante et parmi eux l'établissement d'un déséquilibre des processus d'oxydo-réduction cellulaire qualifié de stress oxydant. Les ions métalliques peuvent être toxiques en activant les formes réduites de l'oxygène pour aboutir à la formation d'espèces radicalaires. Ces espèces réagissent avec les molécules essentielles de l'architecture de la plante telles que les lipides, les protéines et les acides nucléiques.

Dans la première partie de ce chapitre, nous nous sommes intéressés à la recherche de l'ensemble des manifestations biochimiques qui régissent le stress oxydant induit par le Cd. Nous avons essayé alors de déterminer la teneur en malondialdéhyde, les teneurs en anion superoxyde d'oxygène ($O_2^{\cdot-}$) et peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et d'étudier l'activité de la lipoxigénase ainsi que l'effet de ce métal sur l'intégrité membranaire.

II. Résultats

1. Effet de Cd sur l'accumulation des lipoperoxydes

La teneur en malondialdéhyde (MDA) issu de la dégradation des acides gras polyinsaturés de la membrane plasmique est déterminée en utilisant l'acide thiobarbiturique. L'accumulation du malondialdéhyde a été suivie durant la période de traitement par le Cd au niveau des racines et des feuilles de *Vicia faba*.

La **figure 17a** montre qu'au niveau foliaire, la quantité de MDA ne montre pas de variations par rapport au témoin tout au long du traitement pour les trois traitements métalliques (50, 100 et 200 μ M de Cd).

Au niveau racinaire (**Figure 17b**), l'accumulation de MDA varie selon la dose et le temps de traitement. En effet, des concentrations de 50 et 100 μ M de Cd sont capables d'augmenter la production de MDA d'environ 40% par rapport au témoin après 24 h de traitement, alors qu'une concentration de 200 μ M augmente cette production de 67%. Pour une exposition plus longue (48 h), la lipoperoxydation membranaire demeure plus prononcée en présence de 100 et 200 μ M du métal. En effet, cette stimulation est de 78% par rapport au

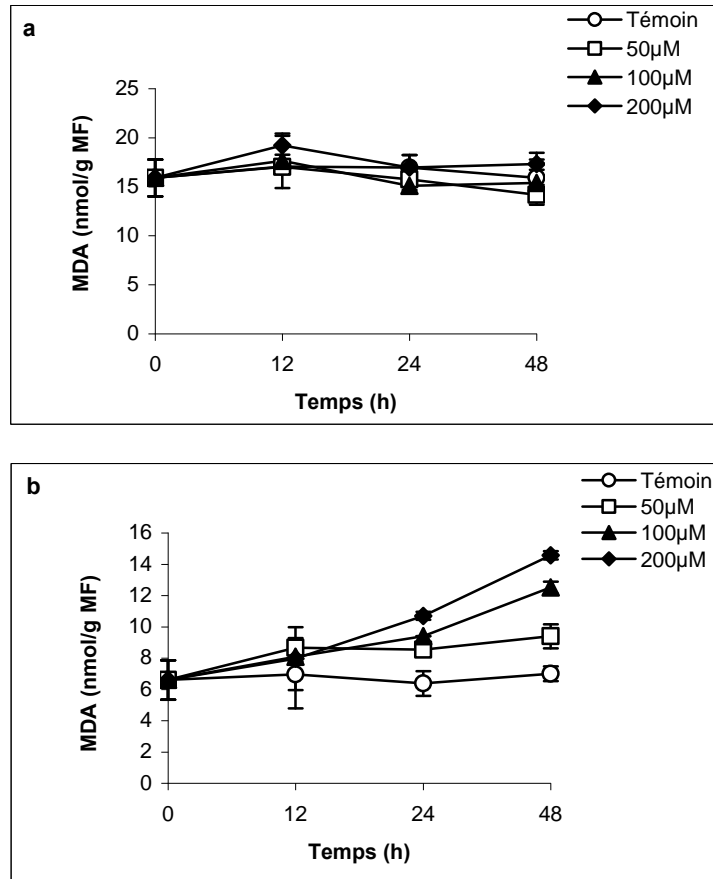


Figure 17: Teneurs en malondialdéhyde (MDA) dans les feuilles **(a)** et les racines **(b)** de fève cultivée sur solution nutritive enrichie en Cd. Les valeurs moyennes et les erreurs standards ont été déterminées à partir de 6 mesures individuelles.

témoin au niveau des racines traitées par 100 μ M de Cd et atteint 108% pour un traitement à 200 μ M de Cd.

En conclusion : la présence des concentrations de 50, 100 et 200 μ M de Cd dans la solution nutritive ne modifient pas la teneur en MDA au niveau des feuilles de fève alors qu'une augmentation importante de la teneur en ce métabolite a été notée au niveau des racines quelque soit la concentration de Cd.

2. Effet de Cd sur la production de l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$)

L'estimation de la quantité de l'anion superoxyde est déterminée au niveau des parties foliaires et racinaires de *Vicia faba* en utilisant le XTT.

Au niveau de la partie aérienne, nous avons trouvé une production importante de l'anion superoxyde après une exposition de 24 h des plantules de fève au Cd (à l'exception de 50 μ M après 12 h du traitement). L'augmentation est d'environ 70% par rapport au témoin en présence de 50 μ M et 100 μ M de Cd et 30% en présence de 200 μ M de Cd dans la solution nutritive (**Figure 18a**). Elle diminue au delà de 24 h pour rejoindre celle du témoin.

Les racines montrent une augmentation de la production de cet anion sur 48 h du traitement et aux diverses concentrations cadmiques utilisées (**Figure 18b**). Après 24 h du traitement, cette augmentation dépasse 30% par rapport au témoin pour des traitements à 50 μ M et 100 μ M de Cd et elle atteint 88% pour un traitement à 200 μ M de Cd. A 48 h de traitement, la teneur en anion superoxyde continue à augmenter pour des concentrations de 50 et 100 μ M de Cd dans la solution nutritive (140% et 213% d'augmentation respectivement). Cette augmentation est moins importante à 200 μ M de Cd (limité à 134%).

On peut conclure que les trois doses de Cd présentes dans la solution nutritive (50, 100 et 200 μ M) augmentent la teneur en anion superoxyde uniquement à 24 h de traitement dans les feuilles de fève. Dans les racines, cette augmentation est importante durant le traitement quelque soit la dose utilisée.

3. Effet de Cd sur la production du peroxyde d'hydrogène

La teneur en peroxyde d'hydrogène a été mesurée par spectrophotométrie à partir des extraits de feuilles et de racines de fève traitées par 50, 100 et 200 μ M de Cd et récoltées après 12, 24 et 48 heures d'exposition (**Figure 19**).

-Au niveau foliaire (**Figure 19a**), nous avons noté une augmentation de la production de peroxyde d'hydrogène qui devient significative après 24 h de traitement en présence des plus fortes concentrations de Cd (100 et 200 μ M). Cette augmentation est d'environ 45% par

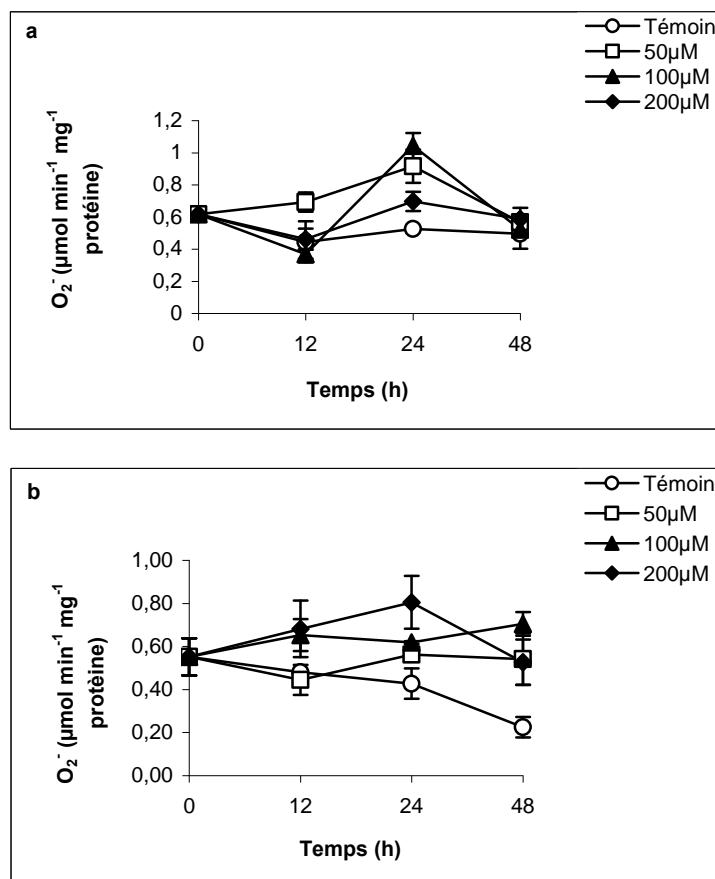


Figure 18: Effets de différentes concentrations de Cd sur la production de l'anion superoxyde dans les feuilles **(a)** et les racines **(b)** de fève cultivée sur solution nutritive enrichie en Cd. Les valeurs moyennes et les erreurs standards ont été déterminées à partir de 6 mesures individuelles.

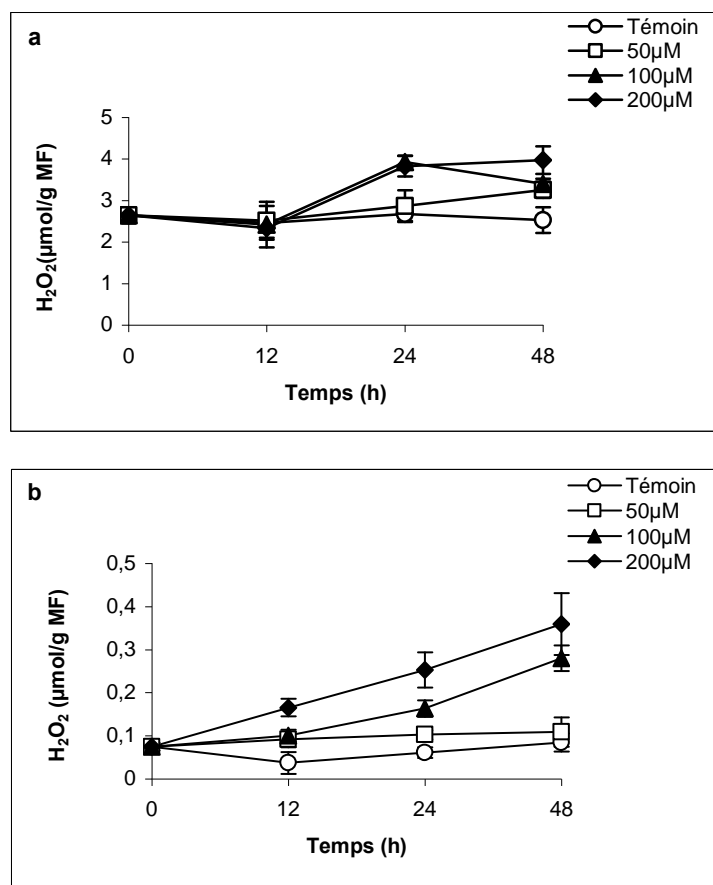


Figure 19: Effets de différentes concentrations de Cd sur la production de peroxyde d'hydrogène dans les feuilles (a) et les racines (b) de fève cultivée sur solution nutritive enrichie en Cd. Les valeurs moyennes et les erreurs standards ont été déterminées à partir de 6 mesures individuelles.

rapport au témoin pour ces deux concentrations du métal. Au bout de 48 h de traitement, la production de peroxyde d'hydrogène atteint une augmentation d'environ 30% chez les plantules traitées par 50 et 100 μ M de Cd par rapport aux témoins et 57% chez celles traitées par 200 μ M de Cd.

-Au niveau des racines (**Figure 19b**), la stimulation de la production de peroxyde d'hydrogène est plus précoce que celle observée chez les feuilles (12 h après le début de traitement métallique) et plus importante en présence de fortes concentrations de Cd. La production de peroxyde d'hydrogène s'accroît au cours du temps d'exposition pour atteindre respectivement 233% et 328% par rapport au témoin pour les traitements 100 et 200 μ M après 48 h.

On peut conclure que la teneur en peroxyde d'hydrogène augmente par rapport au témoin au cours du traitement. Dans les feuilles, cette augmentation est significative dès 24 h en présence des fortes concentrations de Cd dans la solution nutritive alors qu'elle est plus précoce (12 h) quelque soit le traitement au niveau des racines

4. Effet de Cd sur l'activité lipoxgénasique

L'accumulation des lipoperoxydes membranaires montrée précédemment dans les racines de fève traitées par le Cd (**Figure 17**) nous a amené à étudier l'activité de la lipoxgénase dans cette partie de la plantule (**Figure 20**).

Les traitements de 100 et 200 μ M de métal dans la solution nutritive engendrent une augmentation très significative de l'activité LOX dès 12 h avec 51%, 76% et 84% par rapport au témoin pour des doses respectives de 50, 100 et 200 μ M de Cd dans la solution nutritive. A 24 h, l'activité de cette enzyme diminue mais reste toujours plus importante comparée à celle du témoin. A 48 h, l'activité LOX rejoint celle du témoin quelque soit le traitement.

5. Effet de Cd sur l'intégrité cellulaire

L'intégrité cellulaire est déterminée par la mesure de l'absorbance de la solution de bleu Evans à 600nm. En effet, les cellules mortes absorbent le colorant du fait de la modification de leur perméabilité membranaire.

La **figure 21** montre l'effet de différentes concentrations de Cd sur l'intégrité cellulaire au niveau des extrémités racinaires de fève. Les résultats obtenus montrent que l'absorption de la solution du bleu d'Evans commence à être significative 24 h après le traitement par une dose de 200 μ M de Cd dans la solution nutritive avec une augmentation de l'absorption de 40% par rapport au témoin. Elle atteint une élévation de 100% par rapport

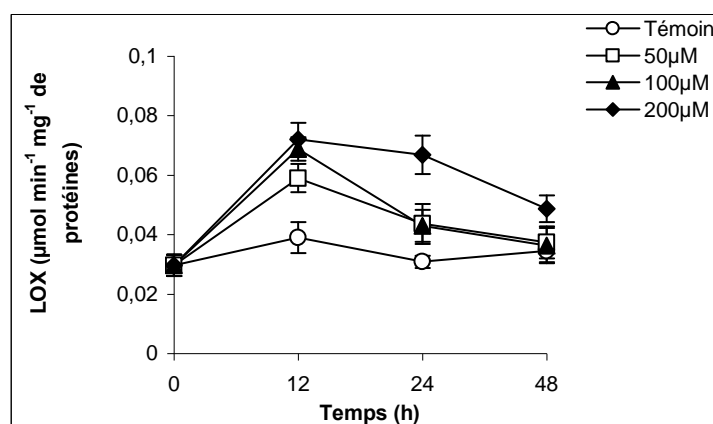


Figure 20: Activité de la lipoxygénase dans les racines de fève cultivée sur solution nutritive enrichie en Cd. Les valeurs moyennes et les erreurs standards ont été déterminées à partir de 6 mesures individuelles.

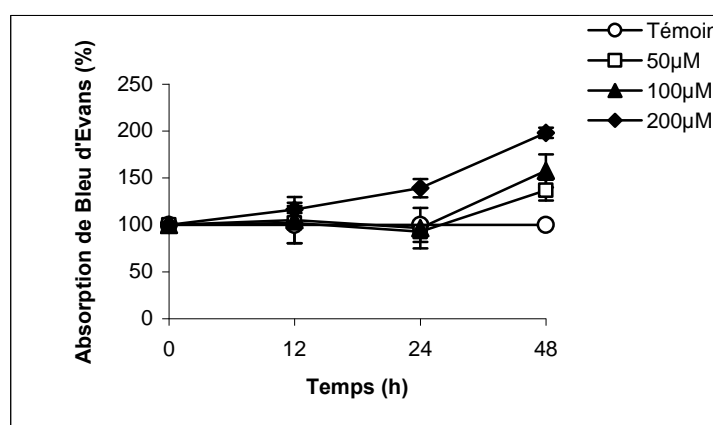


Figure 21: Effets de différentes concentrations de Cd sur l'intégrité cellulaire dans les extrémités racinaires de fève cultivée sur solution nutritive enrichie en Cd. Les valeurs moyennes et les erreurs standards ont été déterminées à partir de 6 mesures individuelles.

au témoin après 48 h d'exposition au stress métallique (200 μ M). Des concentrations de 50 et 100 μ M de Cd dans la solution nutritive entraînent une hausse significative de l'absorption de la solution de bleu Evans de 40% et 60% respectivement par rapport au témoin.

Partie 2 :
***Effets de Cd sur les activités enzymatiques
antioxydantes***

I. Introduction

Face au stress oxydant causé par la présence des ions métalliques, les végétaux vont mobiliser différents systèmes de défense qui leur permettent d'éliminer les radicaux libres. Certains sont de nature enzymatique, les autres de nature chimique.

La deuxième partie de ce chapitre est donc consacrée à l'étude de l'activité des enzymes antioxydantes au niveau des feuilles et des racines de plantules de fève exposées en hydroponie à 50, 100 et 200 μM de Cd pendant 12, 24 et 48 h.

II. Résultats

1. Les superoxydes dismutases

Pour la détermination des activités superoxydes dismutases, nous avons procédé à la détermination de l'activité totale de ces enzymes.

Dans les feuilles, le cadmium engendre des perturbations de l'activité totale des superoxydes dismutases (**Figure 22**). En effet, nous observons une augmentation significative de l'activité de cette enzyme dès 12 h de traitement (**Figure 22a**). A 48 h, cette augmentation atteint 136% en présence de 50 μM de Cd dans la solution nutritive et environ 100% en présence de 100 et 200 μM de Cd dans la solution nutritive.

L'analyse de l'activité des différentes isoformes montre que les Cu-Zn SOD sont stimulées dès 12 h de traitement (**Figure 22b**). Cette stimulation atteint son maximum à 24 h puis elle rejoint celle du témoin à 48 h quelque soit la concentration de Cd utilisée dans la solution nutritive.

En ce qui concerne les isoformes Fe/Mn SOD, leurs activités ne montrent aucune modification jusqu'à 24 h de traitement (**Figure 22c**). L'activité de ces isoformes augmente de façon très importante à 50 μM (250%), 100 μM et 200 μM de Cd (environ 400%) à 48 h de traitement.

Dans les racines, l'effet du cadmium est plus modéré (**Figure 23a**). Nos résultats montrent un niveau d'activité totale des superoxydes dismutases élevé chez les plantules de fève traitée par 50, 100 et 200 μM de Cd à 12 h de traitement. La stimulation la plus importante est notée à 50 μM où elle représente 3 fois l'activité du témoin. Cependant, l'activité totale des SOD diminue très vite pour rejoindre celle du témoin dès 24 h de traitement. L'addition de KCN dans le milieu réactionnel montre l'absence d'une activité

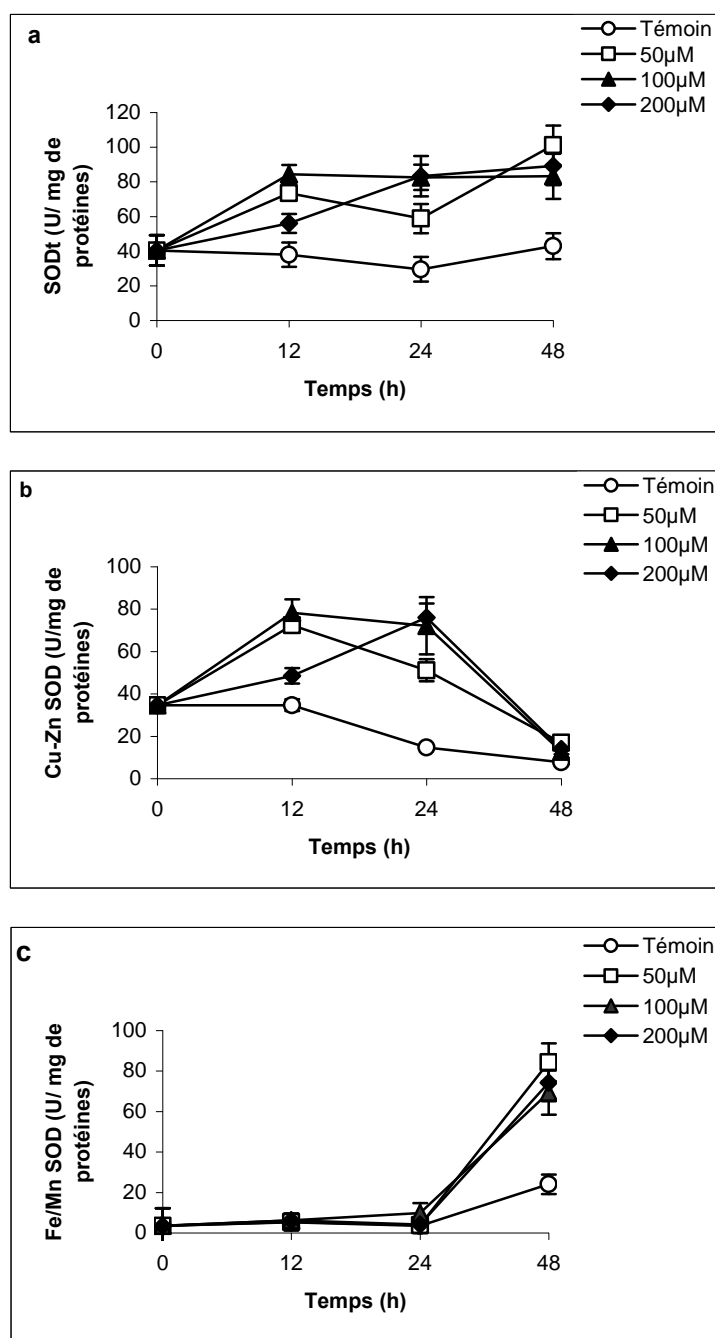


Figure 22: Activités des superoxydes dismutases totales (SODt) (a), des Cu-Zn SOD (b) et des Fe/Mn SOD (c) dans les feuilles de fève cultivée sur solution nutritive enrichie en Cd. Les valeurs moyennes et les erreurs standards ont été déterminées à partir de 6 mesures individuelles.

Fe/Mn SOD. De ce fait, l'activité totale des superoxydes dismutases dans les racines correspond à celle des Cu-Zn SOD (**Figure 23b**).

De ce fait, un ajout de 50, 100 et 200 μ M de Cd dans la solution nutritive entraîne une augmentation de l'activité totale de la superoxyde dismutase au niveau des feuilles de fève. Dans cet organe, l'augmentation est due à la stimulation de l'activité des isoformes Cu-Zn SOD et Fe/Mn SOD. Au niveau des racines, nous avons observé une augmentation significative à 12 h due à la stimulation de l'isoforme Cu-Zn SOD. Les isoformes Fe/Mn SOD sont absents au niveau racinaire

2. La catalase

L'analyse en cinétique des effets de différentes doses de Cd sur le niveau d'activité de cette enzyme chez la fève montre le maintien d'une activité équivalente à celle de témoin dans la partie aérienne de la plante. (**Figure 24a**). Dans la partie racinaire, nous avons noté une élévation de l'activité de cette enzyme après 12 h de traitement quelque soit la dose de Cd (**Figure 24b**).

3. La gaïacol peroxydase

La gaïacol peroxydase permet l'élimination du peroxyde d'hydrogène qui induit la polymérisation du gaïacol en tétragaïacol.

Cette enzyme montre un niveau d'activité inchangé par rapport au témoin au niveau du système foliaire (**Figure 25a**). Cependant, au niveau de la partie racinaire (**Figure 25b**), nous avons noté une stimulation significative quelque soit la dose utilisée dans la solution nutritive à 48 h de traitement.

4. Cycle ascorbate-glutathion

Le cycle ascorbate-glutathion fait intervenir quatre enzymes : l'ascorbate peroxydase (APX), la monodéhydroascorbate réductase (MDHAR), la déhydroascorbate réductase (DHAR) et la glutathion réductase (GR).

Dans les feuilles :

Nous avons noté les modifications métaboliques suivantes :

- ❖ Une activité inchangée par rapport au témoin de l'ascorbate peroxydase à 24h et 48h de traitement quelque soit la dose de Cd dans la solution nutritive (**Figure 26a**).
- ❖ Des concentrations de 50 et 100 μ M de Cd dans la solution nutritive n'entraînent pas une variation de l'activité de la monodéhydroascorbate au cours du traitement (**Figure 26b**).

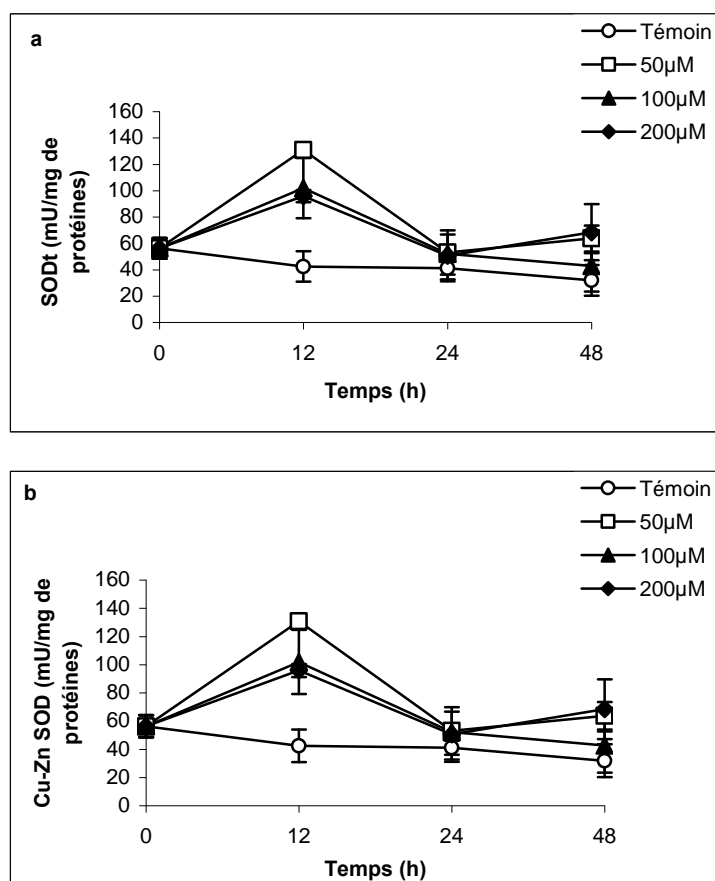


Figure 23: Activités des superoxydes dismutases totales (SODt) (a) et des Cu-Zn SOD (b) dans les racines de fève cultivée sur solution nutritive enrichie en Cd. Les valeurs moyennes et les erreurs standards ont été déterminées à partir de 6 mesures individuelles.

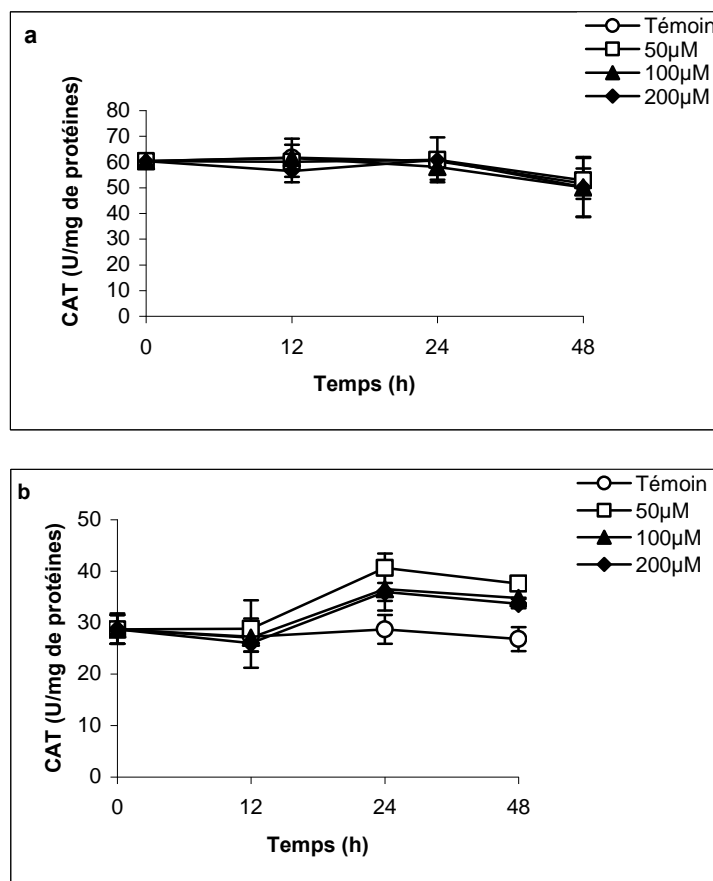


Figure 24: Activités de la catalase (CAT) dans les feuilles (**a**) et les racines (**b**) de fève cultivée sur solution nutritive enrichie en Cd. Les valeurs moyennes et les erreurs standards ont été déterminées à partir de 6 mesures individuelles.

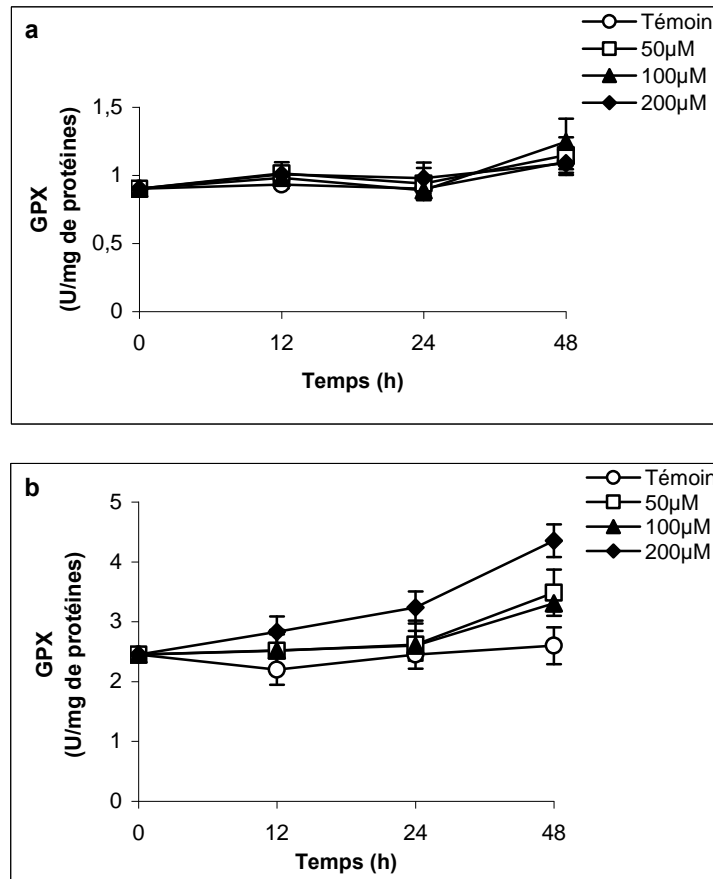


Figure 25: Activités de la gâicol peroxydase (GPX) dans les feuilles (a) et les racines (b) de fève cultivée sur solution nutritive enrichie en Cd. Les valeurs moyennes et les erreurs standards ont été déterminées à partir de 6 mesures individuelles.

Cependant, une plus forte concentration (200 μ M) entraîne une augmentation de son activité dès 24 h de traitement.

- ❖ L'activité de la déhydroascorbate réductase ne présente aucune variation durant le traitement par diverses concentrations de métal utilisées (**Figure 27a**).
- ❖ La glutathion réductase catalysant la réduction du glutathion oxydée (GSSG) en GSH (glutathion réduit), présente une augmentation de son activité seulement à 24 h de traitement par les trois concentrations testées (50,100 et 200 μ M) (**Figure 27b**).

Dans les racines :

La réponse des enzymes du cycle ascorbate-glutathion au stress causé par le Cd chez la fève montre les régulations suivantes :

- ❖ Une diminution de 40% par rapport au témoin de l'activité de l'ascorbate peroxydase à 24 h du traitement. A 48 h, l'activité de cette enzyme rejoint celle du témoin (**Figure 28a**).
- ❖ Une stimulation significative de l'activité de la monodéhydroascorbate réductase 48 h après le début du traitement (**Figure 28b**).
- ❖ Pour toutes les concentrations de Cd testées, l'activité de la déhydroascorbate réductase présente une stimulation importante dès 24 h de traitement où un maximum a été noté avec 50 μ M de Cd dans la solution nutritive (70% par rapport au témoin) et une stimulation plus modérée avec 100 et 200 μ M de Cd (38% par rapport au témoin) (**Figure 29a**).
- ❖ La glutathion réductase montre une augmentation de son activité qui devient significative après 24 h de traitement. Cette augmentation atteint 120% par rapport au témoin pour les diverses concentrations du métal testées après 48 h de traitement (**Figure 29b**).

La **figure 30** récapitule l'ensemble des variations métaboliques survenues au niveau des activités des différentes enzymes du cycle ascorbate-glutathion exprimées en pourcentage par rapport au témoin après 24 h et 48 h de traitement.

24 h de traitement cadmique induit (**Figure 30a**):

- ❖ Une diminution significative de l'activité de l'APX
- ❖ Une absence de réponse de la monodéhydroascorbate réductase
- ❖ Une stimulation de l'activité de la déhydroascorbate réductase
- ❖ Une augmentation de l'activité de la glutathion réductase.

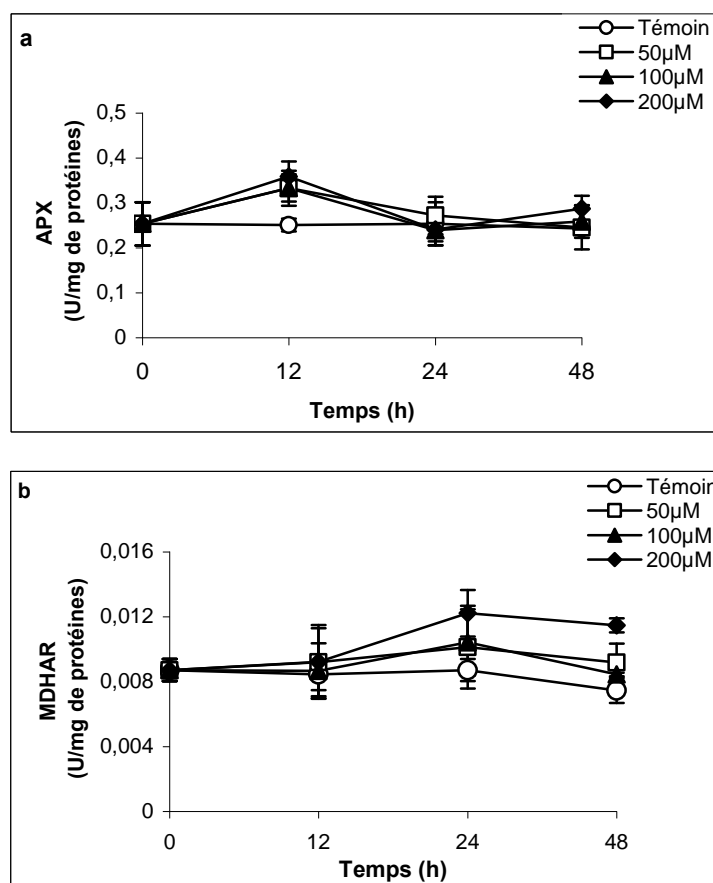


Figure 26: Activités de l'ascorbate peroxydase (APX) **(a)**, la monodéhydroascorbate réductase (MDHAR) **(b)** dans les feuilles de fève cultivée sur solution nutritive enrichie en Cd. Les valeurs moyennes et les erreurs standards ont été déterminées à partir de 6 mesures individuelles.

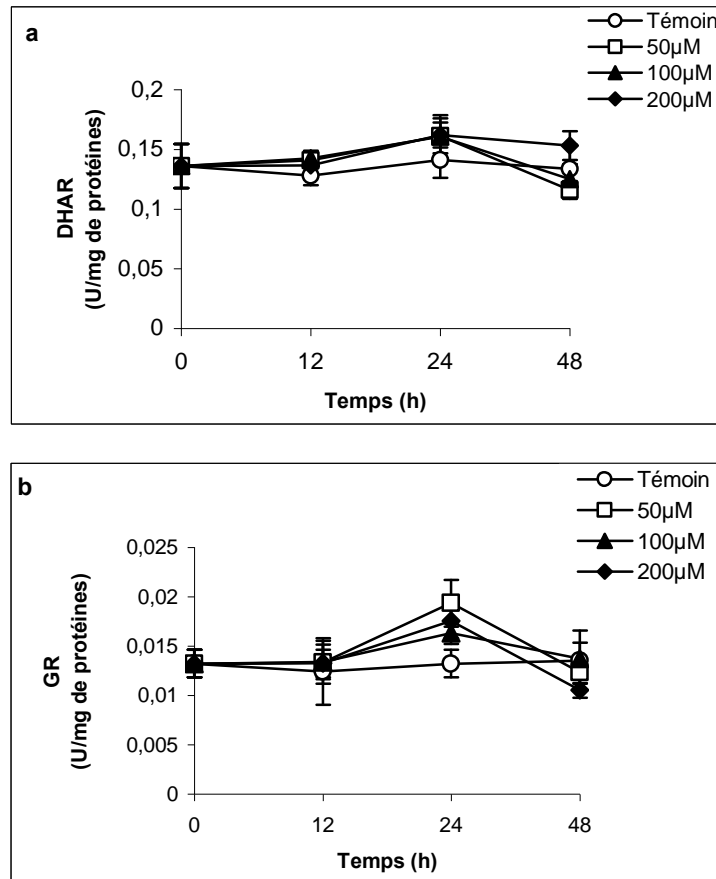


Figure 27: Activités de la déhydroascorbate réductase (DHAR) **(a)** et la glutathion réductase (GR) **(b)** dans les feuilles de fève cultivée sur solution nutritive enrichie en Cd. Les valeurs moyennes et les erreurs standards ont été déterminées à partir de 6 mesures individuelles.

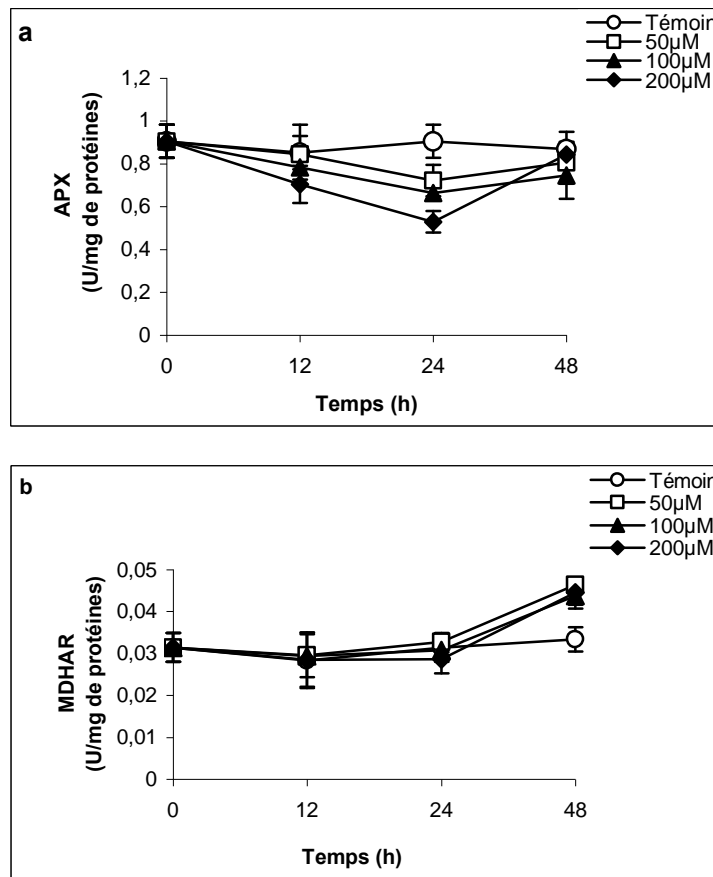


Figure 28: Activités de l'ascorbate peroxydase (APX) **(a)**, la monodéhydroascorbate réductase (MDHAR) **(b)**, dans les racines de fève cultivée sur solution nutritive enrichie en Cd. Les valeurs moyennes et les erreurs standards ont été déterminées à partir de 6 mesures individuelles.

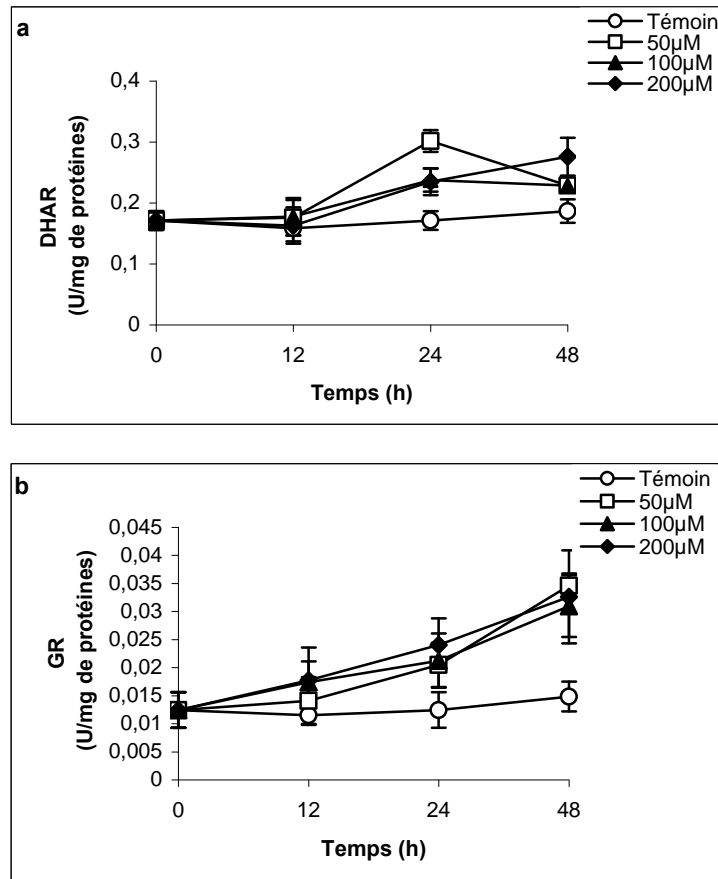


Figure 29: Activités de la déhydroascorbate réductase (DHAR) **(a)** et la glutathion réductase (GR) **(b)** dans les racines de fève cultivée sur solution nutritive enrichie en Cd. Les valeurs moyennes et les erreurs standards ont été déterminées à partir de 6 mesures individuelles.

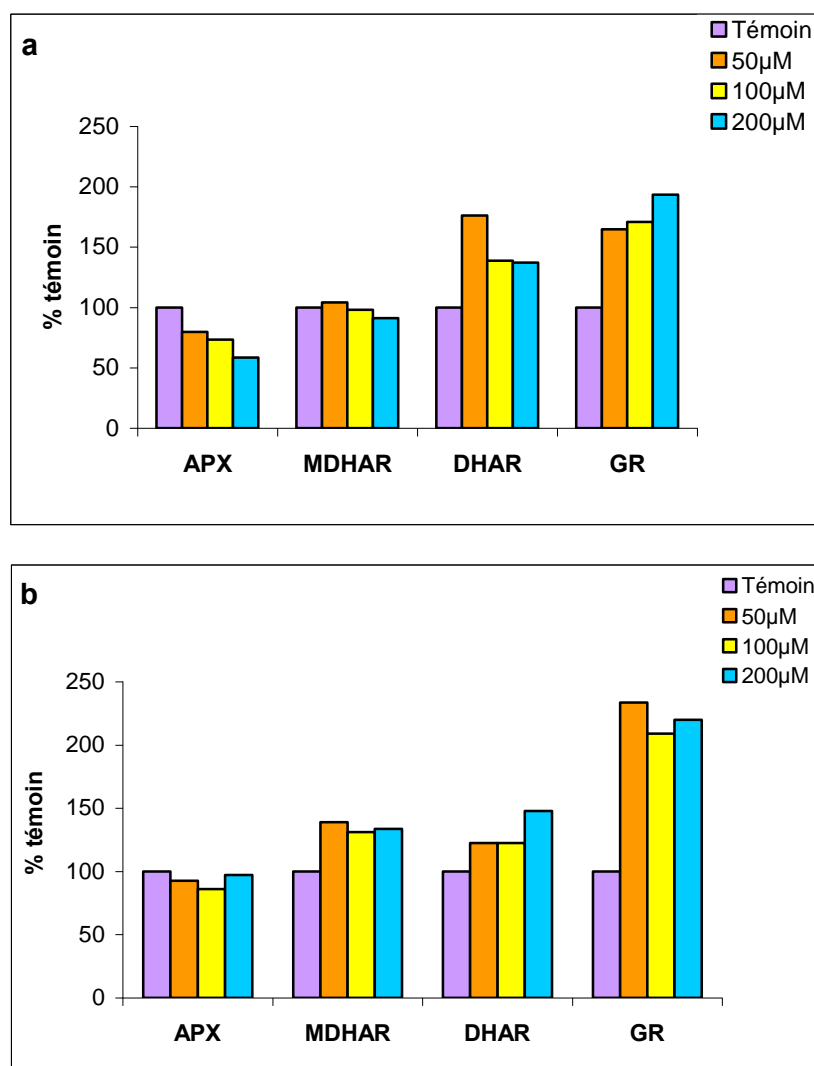


Figure 30: Récapitulatif des activités relatives des enzymes du cycle ascorbate-glutathion: l'ascorbate peroxydase (APX), la monodéhydroascorbate réductase (MDHAR), la déhydroascorbate réductase (DHAR) et la glutathion réductase (GR) exprimées en % des témoins dans les racines de fève cultivée sur solution nutritive enrichie en Cd pendant 24 h (a) et 48 h (b).

48 h de traitement cadmique induit (**Figure 30b**):

- ❖ Aucun effet sur l'activité ascorbate peroxydase
- ❖ Une stimulation de l'activité de la monodéhydroascorbate réductase
- ❖ Une stimulation de l'activité de la déhydroascorbate réductase
- ❖ Une forte augmentation de l'activité de la glutathion réductase qui dépasse 120% celle du témoin pour les diverses concentrations du métal testées.

Partie 3 :
Effets de Cd sur les systèmes antioxydants non-enzymatiques

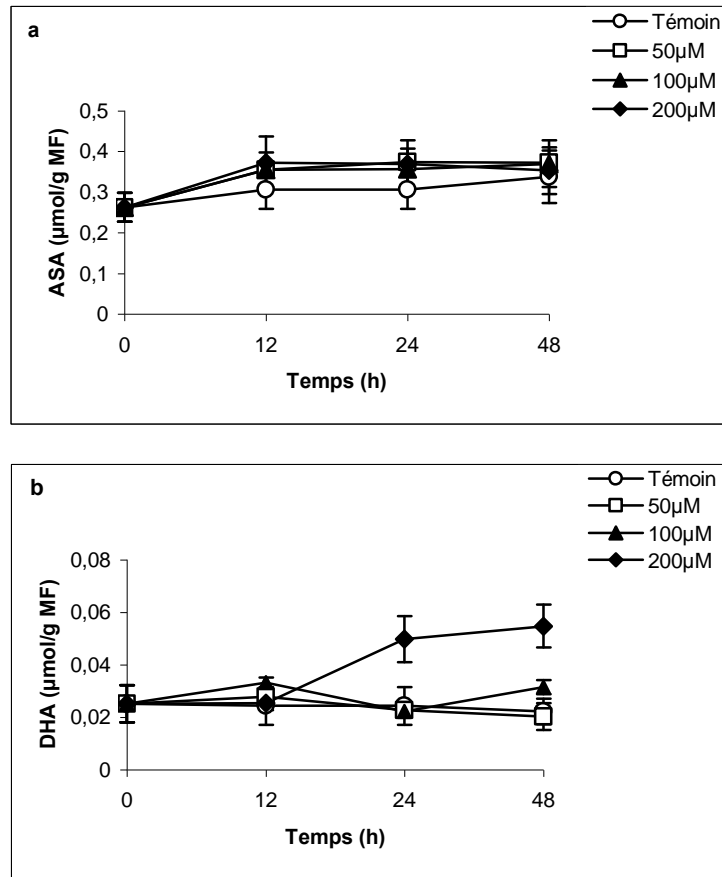


Figure 31: Effets des différentes concentrations de Cd sur la quantité de l'ascorbate réduit (ASA) (a) et oxydé (DHA) (b) au niveau des feuilles de fève cultivée sur solution nutritive enrichie en Cd. Les valeurs moyennes et les erreurs standards ont été déterminées à partir de 6 mesures individuelles.

I. Introduction

L'effet du stress cadmique sur le système de défense non-enzymatique fait l'objet de la dernière partie de ce chapitre. Nous avons dosé la teneur en ascorbate, en glutathion, ainsi que la teneur en phénols au niveau des parties racinaires et foliaires de plantules de *Vicia faba*.

Une fois dans la plante, les ions métalliques sont pris en charge par diverses molécules pour être stockés sous des formes non toxiques. Parmi ces molécules, les phytochélatines qui sont des peptides synthétisés à partir du glutathion et qui permettent le stockage vacuolaire des ions métalliques. Une estimation de la teneur des phytochélatines a été déterminée dans les racines des plantules de fève traitées par 50, 100 et 200 μ M de Cd pendant 12, 24 et 48 h.

II. Résultats

1. Teneur en ascorbate

Nous avons représenté ci-dessous les résultats relatifs à la teneur en ascorbate réduit (ASA) et en déhydroascorbate (DHA) au niveau des feuilles et des racines de fève traitée par 50, 100 et 200 μ M de Cd pendant 12, 24 et 48 h, sachant que $DHA = ASA \text{ total} - ASA \text{ réduit}$.

Dans les feuilles

La **figure 31** illustre les variations de la production de l'ascorbate réduit et oxydé au niveau des feuilles de fève cultivée dans une solution nutritive enrichie en CdCl₂ (50, 100 et 200 μ M).

Nous avons observé que la production d'ascorbate réduit (**Figure 31a**) au cours de toute la période de traitement ne montre aucun changement significatif par rapport au témoin quelque soit la dose de Cd utilisée.

En ce qui concerne l'ascorbate oxydé (**Figure 31b**), nous avons montré une production importante dès 24 h de traitement avec la plus forte dose de Cd dans la solution nutritive (200 μ M) et qui continue à augmenter avec le temps d'exposition pour atteindre de 147% celle du témoin après 48 h de traitement.

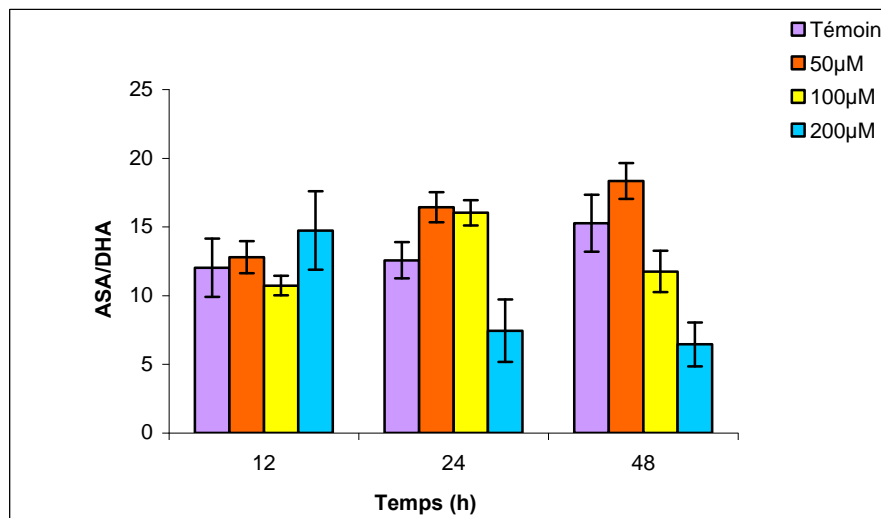


Figure 32: Effets des différentes concentrations de Cd sur le rapport Ascorbate réduit/Ascorbate oxydé (ASA/DHA) dans les feuilles de fève cultivée sur solution nutritive enrichie en Cd. Les valeurs moyennes et les erreurs standards ont été déterminées à partir de 6 mesures individuelles.

Ainsi, le rapport ASA/DHA (**Figure 32**) calculé au niveau foliaire à 24 h de traitement montre une augmentation significative lorsque les plantes sont traitées avec 50 et 100 μ M de Cd (environ 30% d'augmentation par rapport au témoin) et une diminution significative pour 200 μ M de Cd (environ 40%). A 48 h de traitement, des doses de 100 et 200 μ M provoquent une diminution de ce rapport. Cette diminution n'est significative qu'en présence de 200 μ M de Cd. Cet effet est donc dépendant de la concentration en cadmium, qui entraîne ainsi une plus grande oxydation de l'ascorbate dans les feuilles, après un temps de latence de quelques heures.

Dans les racines

Sous l'effet du traitement cadmique, les racines montrent une augmentation de la production d'ascorbate réduit dès le début du traitement (**Figure 33a**). Cette augmentation est environ 3 fois plus importante par rapport à celle du témoin pendant toute la durée du traitement.

Concernant l'ascorbate oxydé (**Figure 33b**), nous avons noté un effet similaire qui se traduit par une production importante dès le début du traitement. Elle atteint son maximum à la fin de la période d'exposition où elle est 4.7 à 5 fois plus importante par rapport à celle du témoin pour des doses respectives de 100 et 200 μ M du métal dans la solution nutritive.

Ainsi, le rapport ASA/DHA (**Figure 34**) montre une légère augmentation après 24 h de traitement quelque soit la dose de Cd utilisée. Après 48 h, ce rapport baisse pour atteindre 33% de diminution par rapport au témoin dans le cas d'une dose de 100 μ M en Cd et 55% dans le cas d'une dose de 200 μ M en Cd. En revanche, une dose plus faible en Cd (50 μ M) ne semble pas entraîner de variation du rapport ASA/DHA après 2 jours d'exposition. Cette observation rejoint celle faite dans les feuilles.

2. Teneur en glutathion

Dans le but de déterminer les teneurs en glutathion chez les plantules de fève traitées par le Cd, nous avons eu recours à la méthode de "recyclage par DTNB-GR" qui permet de doser séparément le glutathion total (GSH_T) et oxydé (GSSG). Dans notre travail, nous avons représenté les résultats relatifs aux teneurs en glutathion oxydé et réduit (GSH), sachant que $GSH = GSH_T - GSSG$.

Dans les feuilles, la **figure 35** montre que le stress cadmique n'induit pas une modification significative de la quantité du glutathion oxydé chez la fève. Le glutathion réduit, présent sous forme de GSH, montre une augmentation significative après 48 h

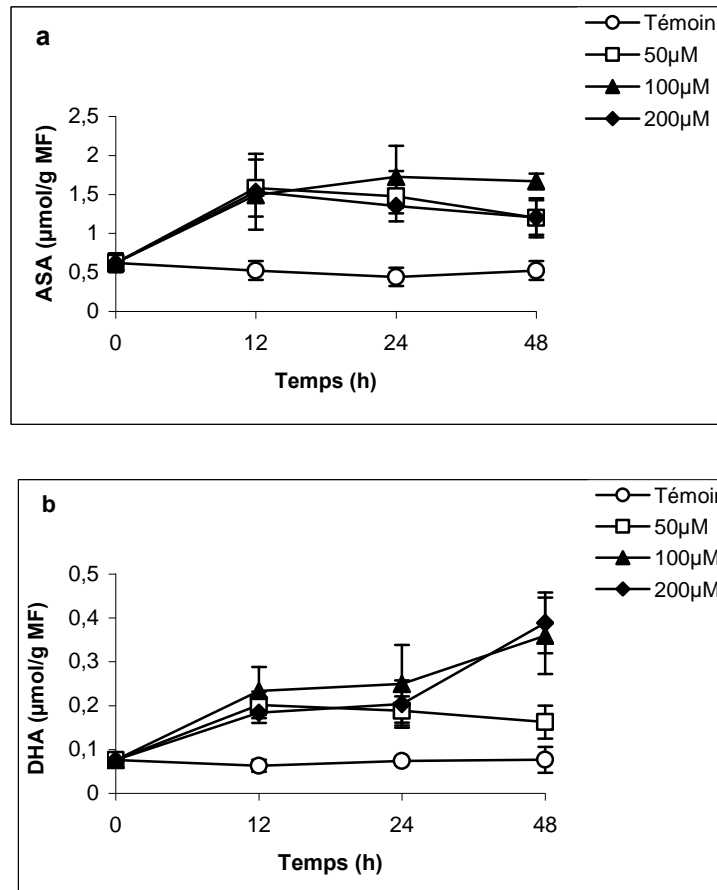


Figure 33: Effets des différentes concentrations de Cd sur la quantité de l'ascorbate réduit (ASA) (a) et oxydé (DHA) (b) dans les racines de fève cultivée sur solution nutritive enrichie en Cd. Les valeurs moyennes et les erreurs standards ont été déterminées à partir de 6 mesures individuelles.

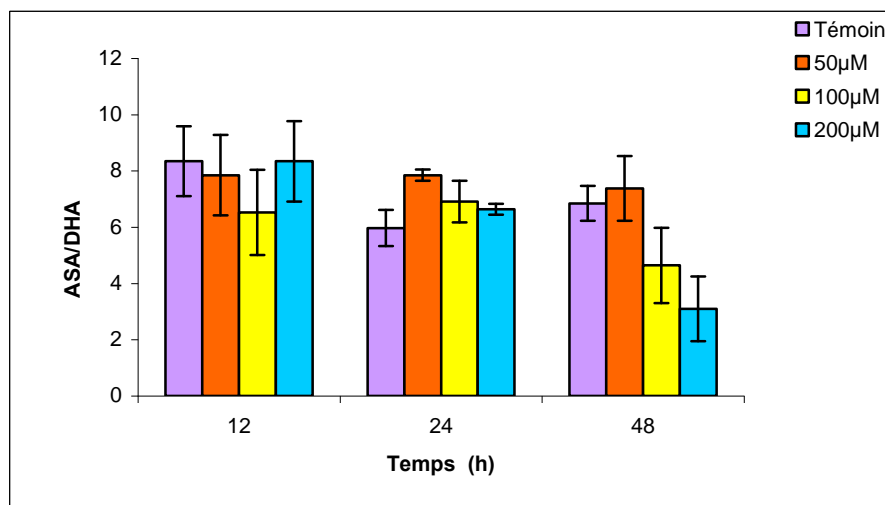


Figure 34: Effets des différentes concentrations de Cd sur le rapport Ascorbate réduit/Ascorbate oxydé (ASA/DHA) dans les racines de fève cultivée sur solution nutritive enrichie en Cd. Les valeurs moyennes et les erreurs standards ont été déterminées à partir de 6 mesures individuelles.

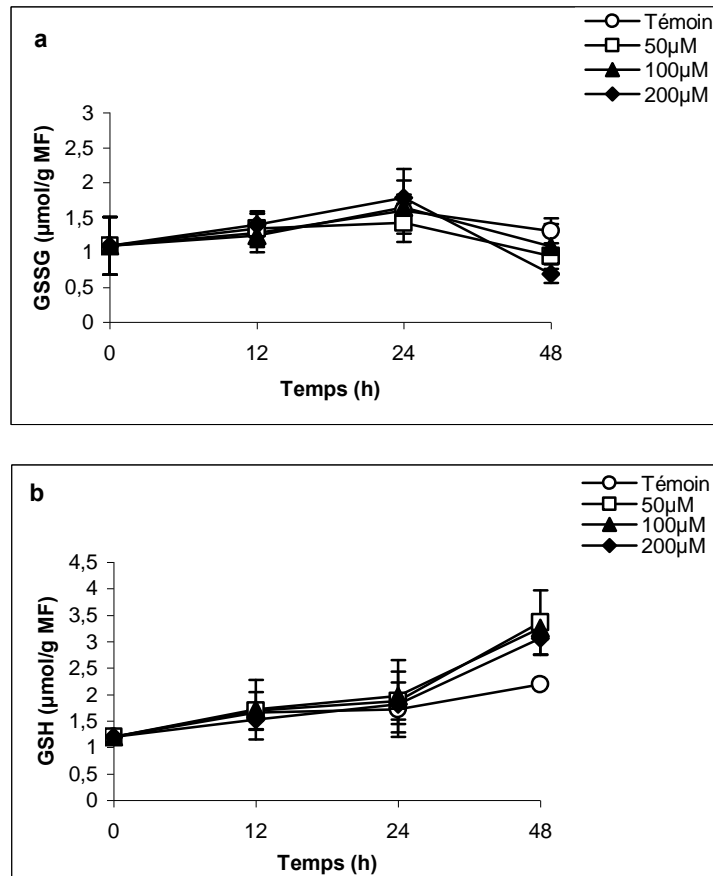


Figure 35: Effets des différentes concentrations de Cd sur les pools de Glutathion oxydé (GSSG) (a) et réduit (GSH) (b) dans les feuilles de fève cultivée sur solution nutritive enrichie en Cd. Les valeurs moyennes et les erreurs standards ont été déterminées à partir de 6 mesures individuelles.

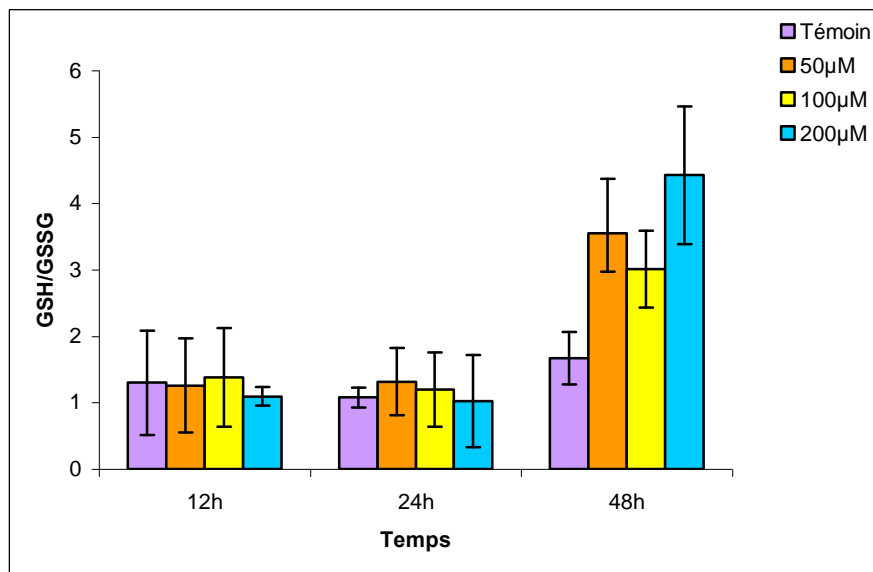


Figure 36: Effets des différentes concentrations de Cd sur le rapport Glutathion réduit/Glutathion oxydé (GSH/GSSG) dans les feuilles de fève cultivée sur solution nutritive enrichie en Cd. Les valeurs moyennes et les erreurs standards ont été déterminées à partir de 6 mesures individuelles.

d'exposition des plantules de fève aux différentes concentrations de Cd.

L'augmentation du rapport GSH/GSSG est importante à 48 h de traitement quel que soit la dose de Cd. En effet, cette augmentation est de 170% par rapport au témoin en présence de 50 μ M de Cd, 130% en présence de 100 μ M et 240% en présence de 200 μ M (**Figure 36**).

Dans les racines, les concentrations de 100 et 200 μ M de Cd dans la solution nutritive provoquent une stimulation de la production du glutathion oxydé 48 h après le début du traitement (**Figure 37a**). Cette stimulation est d'environ 1,8 fois plus importante par rapport à celle du témoin.

Pour la production du glutathion réduit (GSH), les 3 traitements cadmiques (50, 100 et 200 μ M) provoquent une production significative précoce de ce métabolite (à 24 h de traitement) et plus importante (x3) par rapport à celle du témoin pour les doses les plus élevées de Cd (100 et 200 μ M) (à 48 h de traitement) (**Figure 37b**).

Le rapport GSH/GSSG (**Figure 38**) montre une diminution significative 12 h après le début de traitement en présence de 100 μ M de Cd. Ce rapport augmente ensuite au cours de traitement pour atteindre 132% pour la faible dose, 67% pour une dose de 100 μ M et 82% pour la plus forte dose après 48 h d'exposition.

3. Teneur des groupements thiols non-protéiques et estimation de la teneur en phytochélatines

L'accumulation importante des ions cadmiques (**Figure 16b**) et de glutathion réduit (**Figure 37b**) au niveau des racines de fève traitée par 50, 100 et 200 μ M de Cd nous a amené à déterminer la quantité de groupements thiols non-protéiques acido-solubles au niveau de cet organe. L'étude de ce paramètre nous permettra d'estimer la quantité racinaire des phytochélatines en présence du stress cadmique.

Teneur des groupements thiols non-protéiques acido-solubles:

Les variations du contenu total en groupements thiols (-SH_T) acido-solubles dans les racines de plantes témoins et traitées au Cd sont présentées par la **figure 39a**. Une forte production des thiols non-protéiques a été enregistrée à 24 h en présence de 200 μ M de Cd dans la solution nutritive. A 48 h, cette augmentation touche les racines exposées aux plus fortes concentrations de métal. En effet, une dose de 100 μ M de Cd engendre une nette augmentation de ces métabolites (x2.8) par rapport au témoin et une dose de 200 μ M provoque une accumulation encore plus accentuée (environ 3.5 fois celle du témoin).

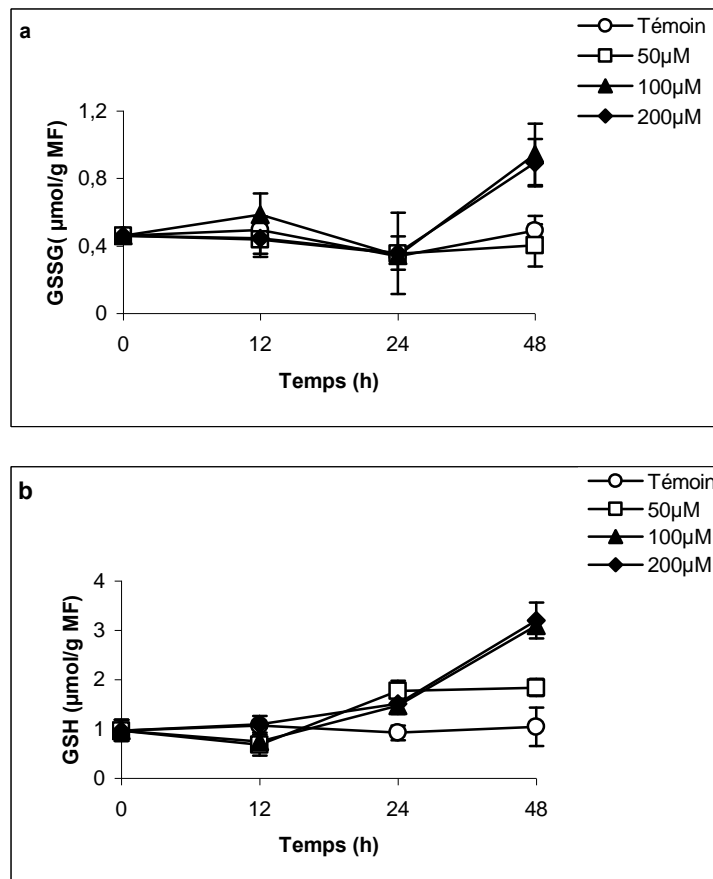


Figure 37: Effets des différentes concentrations de Cd sur les pools de Glutathion oxydé (GSSG) (a) et réduit (GSH) (b) dans les racines de fève cultivée sur solution nutritive enrichie en Cd. Les valeurs moyennes et les erreurs standards ont été déterminées à partir de 6 mesures individuelles.

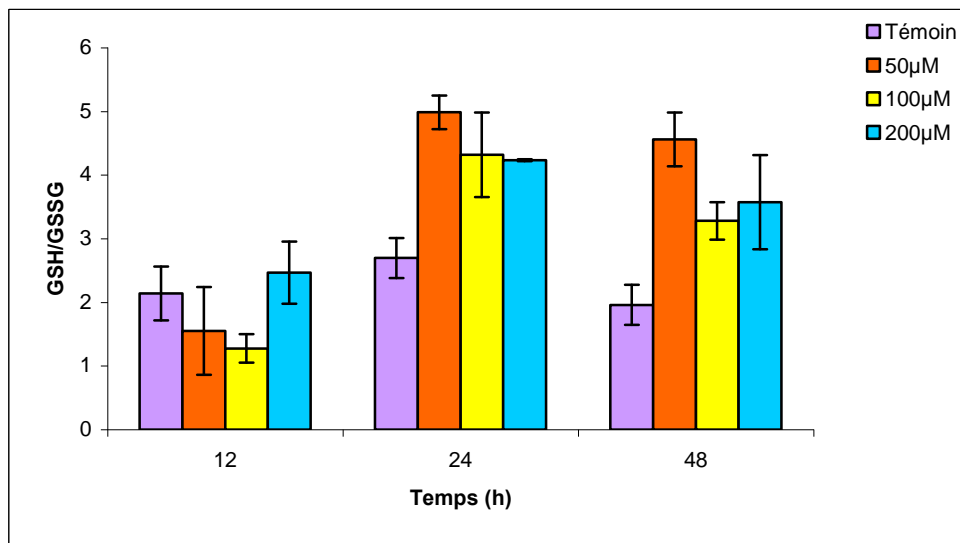


Figure 38: Effets des différentes concentrations de Cd sur le rapport Glutathion réduit/Glutathion oxydé (GSH/GSSG) dans les racines de fève cultivée sur solution nutritive enrichie en Cd. Les valeurs moyennes et les erreurs standards ont été déterminées à partir de 6 mesures individuelles.

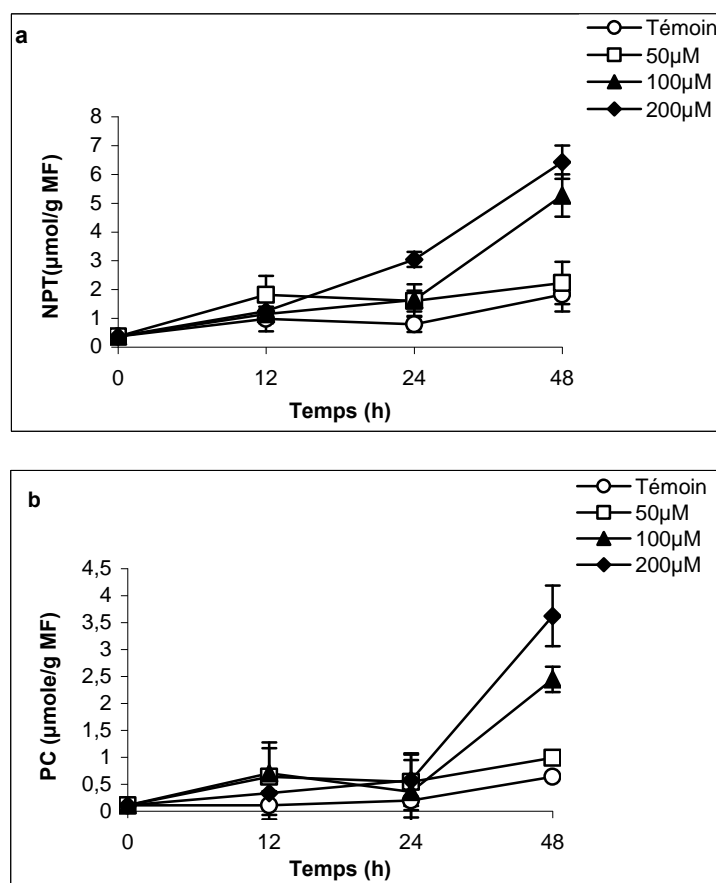


Figure 39: Estimation de la quantité de phytochélatines dans les racines de fève cultivée sur solution nutritive enrichie en Cd pendant 48 h de traitement. **a** :Quantité de thiol non-protéique, **b** : Quantité approximative de phytochélatines. Les valeurs moyennes et les erreurs standards ont été déterminées à partir de 6 mesures individuelles.

Estimation de la teneur en phytochélatine:

La teneur approximative des phytochélatines (PC), composés non-protéiques riches en (-SH), est déterminée par la soustraction de la concentration de glutathion réduit de celle des thiols totaux ($PC = SH_T - GSH \text{ réduit}$).

Sous le stress causé par 100 et 200 μM de Cd, les racines de fève augmentent de façon nette leur teneur en PC (3.8 et 5.8 fois respectivement) par rapport aux plantes témoins après une durée d'exposition de 48 h.

4. Teneur en phénols

L'apport de Cd (50, 100 et 200 μM) dans la solution nutritive entraîne une augmentation nette des teneurs en phénols au niveau des feuilles (**Figure 40a**) et des racines (**Figure 40b**) de fève.

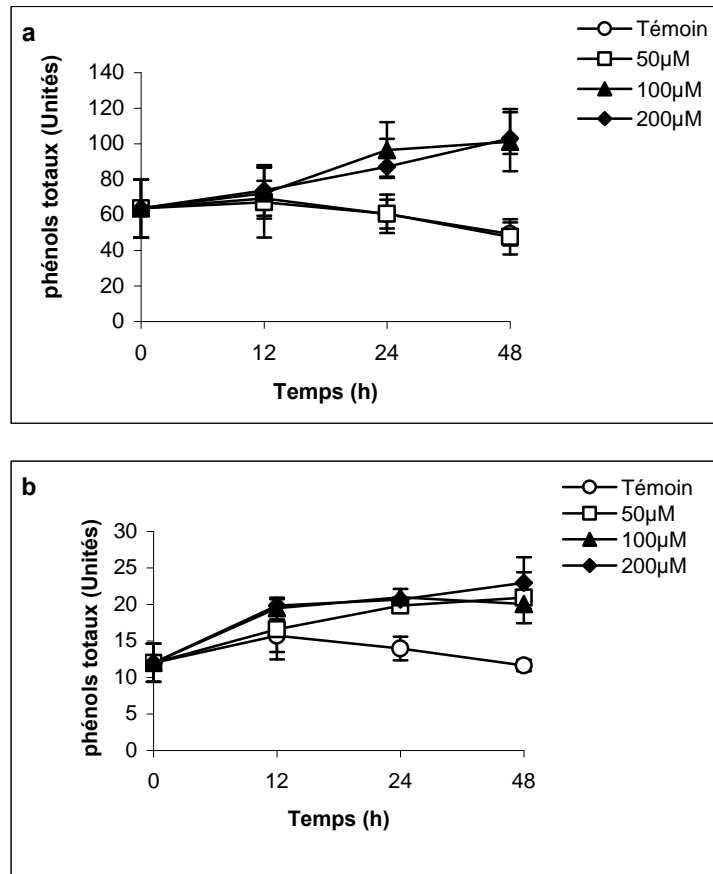


Figure 40: Induction des phénols dans les feuilles (a) et les racines (b) de fève cultivée sur solution nutritive enrichie en Cd. Les valeurs moyennes et les erreurs standards ont été déterminées à partir de 6 mesures individuelles.

Partie 4 : Discussion

Les résultats obtenus dans ce chapitre indiquent que le Cd est un agent inducteur de stress oxydant provoquant des perturbations importantes du métabolisme cellulaire. Nous avons commencé par la détermination du niveau des lipoperoxydes membranaires représentés majoritairement par le malondialdéhyde. Nos résultats ont montré que le Cd provoque une accumulation de MDA seulement dans les racines de *Vicia faba* traitées par 50, 100 et 200 μ M du métal (**Figure 17b**) alors que les feuilles ne montrent aucune modification de leur teneur en MDA par rapport aux plantules témoins (**Figure 17a**). Ceci peut témoigner de l'installation d'un stress oxydant au niveau de la partie racinaire des plantules. L'ampleur de la lipoperoxydation semble être en relation avec l'accumulation préférentielle des ions métalliques dans cet organe. Une importante peroxydation lipidique dans les organes qui accumulent plus de métal a été démontrée par plusieurs auteurs suite à un stress par le Cd. Cette accumulation de MDA est racinaire pour certains auteurs (**Dixit et al., 2001; Mishra et al., 2006**) alors que pour d'autres, elle serait foliaire (**Yannarelli et al., 2006; Liu et al., 2007**).

La production de MDA suite à un stress cadmique a été mise en évidence chez de nombreuses espèces tels que *Oryza sativa* (**Shah et al., 2001**), *Brassica napus* (**BenYoussef et al., 2005**), *Bacopa monnieri* (**Mishra et al., 2006; Singh et al., 2006**), *Bechmeria nivea* (**Liu et al., 2007**), *Triticum aestivum* (**Yannarelli et al., 2006; Lin et al., 2007**), *Triticum durum* (**Paradiso et al., 2008**), *Pisum sativum* (**Sandalio et al., 2001; Dixit et al., 2001**), *Phaseolus vulgaris* (**Smeets et al., 2005**), *Hordeum vulgare* (**Hegedüs et al., 2001; Tamás et al., 2008**), *Prunus dulcis* (**Elloumi et al., 2007**), *Lemna polyrrhiza* (**John et al., 2007**), dans des cultures cellulaires de *Coffea arabica* (**Gomes-Junior et al., 2006**) et chez *Vicia faba* (**Ünyayar et al., 2006**). D'autres métaux sont capables de provoquer une lipoperoxydation membranaire tels que le cuivre (**Ali et al., 2006; Bouazizi et al., 2008**), le nickel (**Baccouche et al., 1998**) et le mercure (**Zhou et al., 2007**).

Dans ce travail, nous avons montré une production de ROS qui varie selon la dose de Cd présente dans la solution nutritive, le temps de traitement et l'organe étudié. Dans les feuilles, la production de l'anion superoxyde est importante à 24 h de traitement en présence de 50, 100 et 200 μ M de Cd dans la solution nutritive (**Figure 18a**). Dans ces organes, nous avons montré aussi que la production de H₂O₂ augmente significativement à 24 h du traitement en présence de 100 et 200 μ M. En prolongeant le temps de traitement, le Cd stimule la production de peroxyde d'hydrogène quelque soit la dose du métal (**Figure 19a**). Dans les

racines, nos résultats ont montré une accumulation de l'anion superoxyde (**Figure 18b**) et du peroxyde d'hydrogène (**Figure 19b**) durant le traitement avec les différentes doses de Cd utilisées.

Le H₂O₂ joue le rôle d'une molécule signal qui alerte la cellule de la présence d'un stress environnemental (**Rentel et Knight, 2004; Maksymiec, 2007**). Selon **Dat et al. (2000)**, H₂O₂ peut fonctionner comme un messenger secondaire à des faibles concentrations mais il devient toxique à fortes concentrations. Le H₂O₂ peut provenir de la réaction de dismutation de l'anion superoxyde par la SOD (**Cakmak, 2000; Mishra et al., 2006**). Il peut provenir aussi de l'altération du transport d'électrons dans les chaînes photosynthétique et respiratoire (**Dixit et al., 2001; Gomes-Junior et al., 2006**).

Le Cd ne participe pas à la production des ROS à travers la réaction de Fenton. Il agit indirectement en activant la NADPH oxydase au niveau des membranes plasmiques (**Romero-Puertas et al., 2004; Maksymiec et Krupa, 2006**). Selon **Mithöfer et al. (2004)**, le produit de l'activité de la NADPH oxydase est l'O₂^{•-} qui est converti spontanément ou par la superoxyde dismutase en H₂O₂. Outre l'activité de la NADPH oxydase, **Rodriguez-Serrano et al. (2006)** ont signalé que la production accrue des espèces réactives de l'oxygène dépend du changement de la concentration intracellulaire de Ca²⁺ et de l'activité des peroxydases.

Nous avons montré précédemment une peroxydation lipidique importante dans les racines de fève traitée par 50, 100 et 200µM. Les radicaux libres accumulés dans cet organe semblent être, en partie, à l'origine de l'augmentation de cette lipoperoxydation membranaire observée durant le traitement. La production moins importante des ROS ne provoque pas de modifications de l'intégrité membranaire dans les feuilles des plantules de fève traitées par rapport à celles des témoins. On peut suggérer que la quantité de ROS accumulée dans les feuilles n'est pas suffisante pour provoquer la lipoperoxydation membranaire.

Outre les espèces réactives de l'oxygène, la lipoperoxydation peut être initiée par la lipoxygénase. Tenant compte du fait que cette lipoperoxydation est produite seulement au niveau des racines de fève traitée par 50, 100 et 200µM de Cd, nous avons essayé d'étudier l'activité de la lipoxygénase dans cet organe. Dans les racines de *Vicia faba*, la LOX se trouve stimulée dès 12 h de traitement quelque soit les doses de Cd utilisées (**Figure 20**). A 48 h, l'activité de cette enzyme rejoint celle du témoin. De ce fait, nous pouvons suggérer, qu'en plus des espèces réactives de l'oxygène, la LOX peut être, en partie, responsable de la lipoperoxydation des membranes.

L'augmentation de l'activité LOX ne semble pas être spécifique de ce métal. D'autres métaux lourds tels que le cuivre et le zinc sont aussi à l'origine de la stimulation de l'activité de cette enzyme (Somashékaraiah et al., 1992; Spitteller, 2003; Ali et Hahn, 2006; Yurekli et Porgali, 2006; Skórzynska-Polit et al., 2006).

La lipoperoxydation membranaire induite par le Cd dans les racines de fève semble être accompagnée par une perte de l'intégrité cellulaire. Ce phénomène est observé dans les racines des plantules de fève dès 24 h de traitement en présence de 200µM de Cd (**Figure 21**). Pour des doses inférieures, ce métal agit dès 48 h de traitement. Ce type de phénomène a été mis en évidence par Schützendübel et al. (2001) dans les racines de *Pinus sylvestris*. De même, Rodriguez-Serrano et al. (2006) ont montré l'existence d'une mort cellulaire possible dans les racines de *Pisum sativum*. Le concept de la mort cellulaire a également été suggéré par Garnier et al. (2006) dans des cellules de tabac suite à une exposition de plus de 2 h à de fortes concentrations de Cd, ou encore par Tamás et al. (2008) dans des racines de *Hordeum vulgare* qui ont montré une corrélation positive entre l'inhibition de l'élongation racinaire et la mort cellulaire évaluée par l'absorption du Bleu Evans. L'augmentation de la mort cellulaire semble être liée à une élévation de la teneur en H₂O₂ (Garnier et al., 2006). L'intervention des ROS dans l'induction de la mort cellulaire a été, en effet, démontrée par Pan et al. (2001) chez *Hordeum vulgare* en présence d'ions aluminium. Dans ce cas, nous pouvons donc suggérer que l'augmentation de la production des ROS, observée dans nos conditions expérimentales chez la fève, peut être à l'origine d'une perte de l'intégrité cellulaire dans les racines à la fin de la période du traitement. D'autres métaux peuvent induire ce phénomène, c'est le cas par exemple de mercure qui est capable de perturber l'intégrité cellulaire chez *Medicago sativa* (Zhou et al., 2007; Ortega-Villasante et al., 2007).

Les plantules de fève traitées par le Cd montrent une perte de leur intégrité membranaire et cellulaire ainsi qu'une accumulation des ROS. Pour faire face au stress cadmique, ces plantules vont mobiliser des systèmes antioxydants. Ceux-ci peuvent être enzymatique et/ou non-enzymatique et la coopération entre ces antioxydants joue un rôle important dans l'élimination des ROS et le maintien du statut redox de la plante (Cho et Seo, 2005).

La réponse enzymatique assure l'élimination des formes toxiques de l'oxygène: l'anion superoxyde par la superoxyde dismutase, le peroxyde d'hydrogène par la catalase, les peroxydases et les enzymes du cycle ascorbate-glutathion.

Dans nos expérimentations, nous avons montré que dans les feuilles de fève, le Cd provoque une stimulation de l'activité des isoformes Cu-Zn SOD dès 12 h de traitement quelque soit la dose de Cd utilisée. A 48 h de traitement, les isoformes Fe/Mn SOD décrivent une augmentation de leurs activités alors que celles des Cu-Zn SOD rejoignent l'activité du témoin (**Figure 22**). Dans les racines des plantules de fève (**Figure 23**), nous avons montré que seul l'isoforme Cu-Zn SOD montre une activité à 12 h de traitement puis cette activité diminue en prolongeant le temps de traitement. La stimulation de l'activité de la SOD puis son inhibition a été montrée aussi par **Schützendübel et al. (2001)** suite à un traitement des racines de *Pinus sylvestris* par 50µM de Cd pendant une durée de traitement plus courte (6 h). En présence de Cd, l'activité de la SOD varie selon l'espèce végétale (**Somashekaraiah et al., 1992; Gallego et al., 1996; Sandalio et al., 2001; Mishra et al., 2006; Singh et al., 2006**). Dans notre cas, l'activité de différents isoformes de cette enzyme varie selon l'organe étudié. Cela laisse suggérer une sensibilité différentielle des isoformes de la même enzyme au stress causé par le Cd chez les plantules de fève. L'inhibition de l'activité Cu-Zn SOD observée au niveau des feuilles et des racines, suite à une stimulation préalable, peut être le résultat d'un désordre métabolique causé par l'accumulation de peroxyde d'hydrogène qui joue le rôle d'inhibiteur de l'activité de cet isoforme (**Asada et al., 1974; Sandalio et al., 2001; Dixit et al., 2001**).

L'inhibition de l'activité Cu-Zn SOD peut être attribuée aussi à la sensibilité de cet isoforme à la déficience en zinc induite par le Cd et à la possibilité de substitution du zinc par le Cd (**Van Assche et Clijesters, 1990; Aravind et Prasad, 2003**). En effet, **Bauer et al. (1980)** ont mentionné que le ¹¹¹Cd est capable d'occuper la place de Zn dans la molécule de Cu-Zn SOD formant par la suite une enzyme Cu¹¹¹Cd SOD inactive. Ceci pourrait être le cas, puisque nous avons montré, dans le chapitre précédent, une diminution de la teneur en zinc dans les feuilles de fève, quelque soit la dose de Cd utilisée. De ce fait, une accumulation des ROS et une déficience en zinc semblent être à l'origine de la diminution de l'activité Cu-Zn SOD observée dans les feuilles de plantules de fève traitées par 50, 100 et 200µM de Cd. Dans ces organes, nous avons montré aussi une stimulation de l'activité Fe/Mn SOD. Cependant, aucune activité de ces isoformes n'a été notée dans les racines des plantules de fève témoins et traitées. Cela pourrait être expliqué par la faible activité de divers isoformes de la SOD dans les racines de fève.

En présence de Cd, l'activité de la SOD va engendrer une accumulation de peroxyde d'hydrogène suite à la dismutation de l'anion superoxyde. La détoxification de cette molécule

peut être envisagée par plusieurs enzymes : La catalase (CAT) localisée au niveau des peroxysomes et des mitochondries, la gaïacol peroxydase ou GPX localisée au niveau du cytoplasme et des parois cellulaires et les enzymes du cycle ascorbate-glutathion (APX, MDHAR, DHAR et GR). Ce cycle est localisé dans plusieurs compartiments cellulaires tels que les chloroplastes, le cytosol, les peroxysomes et les membranes plasmiques (**Jiménez et al., 1997; Noctor et Foyer, 1998**).

Dans la fève, le Cd n'a aucun effet sur l'activité de la catalase foliaire (**Figure 24a**). L'absence de réponse de cette enzyme dans les feuilles peut être due à une non-implication de la catalase dans la réponse au stress causé par le Cd et que l'élimination du peroxyde d'hydrogène se fait alors par l'intermédiaire d'autres voies enzymatiques ou non-enzymatiques. Dans les racines (**Figure 24b**), nous avons noté une sensibilité de la catalase au stress causé par le Cd qui se présente sous forme d'une stimulation de son activité surtout à 48 h de traitement.

Plusieurs auteurs ont montré une augmentation de l'activité de la catalase sous l'effet de Cd (**Vitória et al., 2001; Schützendübel et al., 2001; Fornazier et al., 2002; Wu et al., 2003; Gomes-Junior et al., 2006**). **Yang et Poovaiah (2002)** suggèrent que l'augmentation de l'activité de la catalase est étroitement liée à l'augmentation de la concentration intracellulaire du peroxyde d'hydrogène et du Ca^{2+} . En situation de stress, une augmentation de la teneur en calcium entraîne une stimulation de l'activité de cette enzyme suite à la fixation de l'ion calcique à une protéine cytosolique appelée calmoduline formant un complexe Ca^{2+} calmoduline. Ce dernier joue le rôle d'une molécule signal stimulant l'activité de la catalase (**Yang et Poovaiah, 2002**). Dans nos expérimentations, nous avons montré, précédemment, que la teneur racinaire en H_2O_2 augmente et celle du calcium diminue à la fin du traitement par le Cd. De ce fait, l'augmentation de l'activité catalase semble avoir comme origine une production accrue de H_2O_2 .

La production racinaire de H_2O_2 pourrait être aussi à l'origine de la stimulation de l'activité de la gaïacol peroxydase observée dans les racines des plantules de fève traitées par le Cd (**Figure 24b**). Dans les feuilles de ces plantules, l'activité de la GPX est inchangée durant le traitement quelque soit la dose du métal (**Figure 24a**).

La réponse de cette enzyme diffère selon l'espèce végétale (**Sandalio et al., 2001; Mishra et al., 2006; Singh et al., 2006; Lin et al., 2007**). D'autres métaux sont capables de modifier son activité tels que le cuivre (**Jouili et El Ferjani, 2004; Bouazizi et al., 2007**) et le nickel (**Baccouche et al., 1998**).

Outre la catalase et la gaïacol peroxydase, l'élimination du peroxyde d'hydrogène est renforcée par un autre système faisant intervenir le cycle ascorbate-glutathion. Dans ce système de détoxication, la transformation de H₂O₂ en eau et en oxygène se fait en présence de l'ascorbate qui joue le rôle de donneur d'électrons. Au cours de la première réaction catalysée par l'ascorbate peroxydase, l'ascorbate est transformé en monodéhydroascorbate et/ou déhydroascorbate. Ces derniers constituent respectivement les substrats de la monodéhydroascorbate réductase (MDHAR) et la déhydroascorbate réductase (DHAR). Ces enzymes catalysent la réaction qui produit de l'ascorbate. Ce recyclage fait intervenir du glutathion réduit qui subit une oxydation. La régénération de sa forme réduite se fait via une réaction catalysée par la glutathion réductase (GR). Chacune de ces enzymes a été étudiée dans les feuilles et les racines de plantules de fève.

Dans les feuilles, nos résultats ont montré la non-implication des enzymes du cycle ascorbate-glutathion dans les processus de détoxication de H₂O₂. De ce fait, l'absence d'une activité catalase, gaïacol peroxydase et des enzymes du cycle ascorbate-glutathion dans les feuilles de fève traitées par le Cd laisse suggérer (i) que la quantité de peroxyde d'hydrogène mesurée dans les feuilles n'est pas suffisante pour provoquer une modification des activités antioxydantes, (ii) une réponse tardive de ces enzymes.

Dans les racines de fève traitée par le Cd, nous avons montré une activité significative de la MDHAR, DHAR et surtout de la GR à 48 h. L'augmentation de l'activité de la DHAR pourrait être due à la disponibilité du GSH produit de l'activité de la GR. Le rôle principal de la MDHAR est de limiter la transformation de MDHA en DHA. La stimulation de l'activité de cette enzyme à 48 h de traitement pourrait diminuer l'accumulation de DHA et son effet inhibiteur du métabolisme cellulaire. Dans notre cas d'étude, la stimulation de la MDHAR et de la DHAR est à l'origine d'une forte accumulation de l'ascorbate qui n'est pas utilisé, dans notre cas, par l'ascorbate peroxydase. De ce fait, la non-contribution de l'APX dans cette voie antioxydante serait à l'origine d'une disponibilité de l'ascorbate réduit pour une détoxication par voie non-enzymatique.

Quant à la GR, la stimulation de son activité, observée dans les racines de fève traitée par le Cd, pourrait être à l'origine d'une augmentation de la production de glutathion réduit. Ce métabolite permet un bon fonctionnement du cycle ascorbate-glutathion. Il joue le rôle d'un antioxydant non-enzymatique et intervient dans la synthèse des phytochélatines (**Gomes-Junior et al., 2006**). L'augmentation de l'activité de cette enzyme, en présence de Cd, a été beaucoup étudiée (**Qadir et al., 2004; Aravind et Prasad., 2005; Smeets et al., 2005;**

Gomes-Junior et al., 2006; Mishra et al., 2006 ; Yannarelli et al., 2006; Lin et al., 2007; Liu et al., 2007).

L'ascorbate et le glutathion sont deux métabolites de base du système non-enzymatique mis en place par la plante pour une détoxification en présence d'un stress. En tant qu'antioxydant, l'ascorbate réagit directement avec les radicaux libres (ions superoxydes, peroxyde d'hydrogène, radical tocophéroxyl,...) pour former du monodehydroascorbate (instable) et/ou du dehydroascorbate, sans catalyse enzymatique.

Dans les feuilles de fève, nos résultats ont montré que la production de l'ascorbate réduit (ASA) au cours du traitement ne présente aucun changement significatif par rapport au témoin (**Figure 31a**) bien que l'activité de la MDHAR montre une augmentation à 48 h de traitement. L'ascorbate oxydé (DHA) (**Figure 31b**) décrit une augmentation importante dès 24 h de traitement sous l'effet d'une concentration de 200µM de Cd.

Dans les racines, nous avons noté une forte production de la forme réduite et oxydée de l'ascorbate dès le début du traitement (**Figure 33 a, b**). A 24 h, l'augmentation de l'ascorbate réduit est accompagnée d'une augmentation de l'activité de la DHAR et de la GR. A 48 h de traitement, l'activité de la MDHAR s'ajoute pour empêcher, d'une part, une transformation accrue de MDHA en DHA et pour renforcer, d'autre part, le cycle ascorbate-glutathion dans l'élimination du peroxyde d'hydrogène à travers la production de l'ascorbate réduit. La réduction du peroxyde d'hydrogène par l'ascorbate peut s'effectuer directement ou être catalysée par l'ascorbate peroxydase (**Smeets et al., 2005**). Dans notre cas d'étude, nous avons montré une absence de l'activité de l'APX ce qui laisse suggérer que l'élimination de H₂O₂ provient d'une action directe de l'ascorbate.

Bien que l'augmentation de l'activité MDHAR et DHAR permettant la transformation respective de MDHA et DHA en ASA semble être une stratégie adoptée par les cellules racinaires des plantules de fève pour faire face au stress induit par le Cd, la diminution du rapport ASA/DHA à la fin du traitement aussi bien au niveau racinaire que foliaire semble témoigner d'une incapacité des cellules à empêcher l'accumulation de DHA généralement considéré comme un événement néfaste pour le métabolisme cellulaire.

Le glutathion agit comme un tampon antioxydant régissant l'homéostasie intracellulaire. Sous sa forme oxydée, le glutathion ne présente aucune variation de sa teneur par rapport au témoin durant toute la période de traitement des feuilles de fève. Alors que sa forme réduite (GSH) montre une augmentation significative seulement à 48 h du début du traitement (**Figure 35a, b**).

Le GSH est le produit de la réaction catalysée par la glutathion réductase en présence de NADPH. Dans les feuilles, cette enzyme n'est pas active à 48 h d'exposition (**Figure 27b**). Ceci laisse suggérer d'autres voies de synthèse de GSH telles que la glutathion synthétase et la γ -glutamylcystéine synthétase. Il a été précédemment démontré que cette dernière enzyme stimule la production de GSH en présence d'un stress cadmique (**Haag-Kerwer et al., 1999**); ce qui pourrait expliquer l'augmentation du rapport GSH/GSSG dans les feuilles à 48 h de traitement (**Figure 36**).

La production de GSSG est importante dans les racines, à 48 h en présence de 100 et 200 μ M de Cd. Celle du glutathion réduit est plus précoce (24 h) (**Figure 37a, b**). La production de GSH coïncide bien avec la stimulation de l'activité de la glutathion réductase (**Figure 29b**). De ce fait, Il semble que le GSH est utilisé directement par la cellule pour la protéger contre les espèces réactives de l'oxygène. L'augmentation de la production de GSH, en présence de Cd, pourrait résulter de la stimulation de la transcription des gènes codant pour la synthèse de ce métabolite tels que les gènes codant pour la γ -glutamylcystéine synthétase, la glutathion synthétase et la glutathion réductase (**Xiang et Olivier, 1998; Lin et al., 2007**).

Lin et al. (2007) ont proposé que le GSH joue un rôle crucial dans la détoxification des ions cadmiques et qu'il est plus sensible que certaines enzymes antioxydantes dans la réponse au stress causé par ce métal. Le changement de la teneur en GSH et GSSG dans la cellule joue un rôle de signal qui stimule l'expression des gènes et la synthèse des protéines en réponse au stress (**Foyer et al., 1997**).

Le GSH intervient aussi dans la synthèse des phytochélatines (**Grill et al., 1989; Sharma et al., 2004**). Ces dernières jouent un rôle essentiel dans l'homéostasie des ions métalliques chez les plantes en chélatant le Cd dans le cytoplasme. Les complexes PC-Cd sont véhiculés vers la vacuole. A l'arrivée, le complexe est attaqué par l'acidité de la vacuole et les PC libèrent les ions métalliques. Le métal ainsi libéré peut se lier à des acides organiques. Dans notre travail, nous avons estimé la teneur en PC dans les racines de fève, organes qui accumulent plus les ions cadmiques que les feuilles.

La validité de la technique que nous avons utilisé lors de notre étude doit ses raisons aux faits suivants : (i) le GSH est le composé à -SH le plus abondant dans les cellules végétales et les concentrations de la cystéine et de dipeptide (γ -Glu-Cys) sont extrêmement faibles (**Neuwly et Rauser, 1992**). Malgré la critique de la méthode de calcul des PC par la différence de SH_T-GSH puisque, selon **Harmens et al. (1993)**, la cystéine et d'autres composés à radicaux thiols non identifiés par HPLC pourraient surestimer les teneurs réelles de PC, cette approche n'a pas été réfutée par ces auteurs parce qu'elle a donné des résultats

similaires à ceux obtenus par HPLC. (ii) **De Knecht et al. 1994** ont confirmé cette méthode de calcul des PC. Ils ont trouvé que le glutathion et la PC font ensemble au moins 85% des thiols totaux alors que la cystéine et le γ -Glu-Cys ne dépassent pas 1% des thiols cellulaires et que le reste est constitué par des thiols acido-solubles non identifiés même par échange ionique sur colonne de FPLC.

Nos résultats ont montré une augmentation de la teneur en groupements thiols non-protéiques après 48 h d'exposition des racines de *Vicia faba* au Cd (**Figure 39a**). A ce temps de traitement, nous avons assisté à une synthèse importante des PC en présence des fortes concentrations de Cd (100 et 200 μ M) (**Figure 39b**). La synthèse des PC en présence de Cd a été montrée précédemment par plusieurs auteurs (**Srivastava et al., 2004; Mishra et al., 2006; Béraud et al., 2007**). En 2002, **Djebali et al.** ont montré que dans le méristème apical des plantules de tomate, les cellules corticales et centrales, les plus exposées au Cd, présentent souvent une intense vacuolisation du cytoplasme. Chez cette plante, cette vacuolisation se trouve accompagnée des phénomènes de dépôt et de séquestration non décelables chez le témoin (**Djebali et al., 2002**). Ces dépôts observés dans les vacuoles pourraient correspondre, comme l'ont suggéré certains auteurs, à des précipitations du cadmium avec des éléments tels que le silicium, l'oxalate (**Van Balen et al., 1980**) ou même des peptides de la catégorie des phytochélatines (**Rausser et Ackerley, 1987**).

Outre l'ascorbate et le glutathion, les composés phénoliques jouent le rôle d'antioxydants lors du stress (**Ganeva et Zozikova, 2007**). Dans les parties foliaires et racinaires de la fève, nous avons montré une accumulation de ces composés (**Figure 40a, b**). Ceux-ci interviennent dans la biosynthèse de plusieurs produits comme la lignine, la subérine et les flavonoïdes (**Booker et al. 1996**). Ces produits augmentent la rigidité de la paroi cellulaire en présence du stress (**Van Tunen et Mol, 1991; Booker et al., 1996, Quiroga, 2000**). L'augmentation de la quantité des composés phénoliques totaux a été étudiée dans le cas d'un traitement par le cadmium (**Schützendübel et al., 2001**), le cuivre (**Sgherri et al., 2003; Ganeva et Zozikova, 2007**) et l'aluminium (**Yamamoto et al., 1998**).

Chapitre III : Effets du cadmium sur l'expression de gènes liés au stress métallique

I. Introduction

Pour faire face au stress métallique environnant, les cellules végétales modifient l'expression de certains gènes responsables de la synthèse des protéines de choc thermique ("Heat Shock Proteins" ou HSP), des métallothionéines et des protéines intervenant dans la détoxification des espèces radicalaires induites par le métal. L'étude de l'expression de certains de ces gènes au niveau des cellules racinaires de fève traitée par 50, 100 et 200 μ M de CdCl₂ durant 12, 24 et 48 h a fait l'objet de ce chapitre.

Seules les racines de fève sont étudiées pour l'ensemble de ce chapitre. En effet, ces organes montrent une forte sensibilité au cadmium (diminution de la croissance, accumulation des ions métalliques, production des ROS).

II. Résultats

1. Analyse électrophorétique des ARN

Le dosage des ARN totaux montre que notre méthode d'extraction permet de purifier des ARN de bonne qualité. Le rapport DO₂₆₀/DO₂₈₀ étant supérieur à 1.8 pour l'ensemble des échantillons, la déprotéinisation des ARN est estimée satisfaisante pour poursuivre l'expérimentation.

La concentration des ARN totaux extraits est ramenée à 1 μ g/ μ l pour tous les échantillons, ceci afin d'homogénéiser au maximum nos expérimentations. Le dosage précis des ARN est une étape cruciale dans nos expérimentations; la qPCR étant très sensible et basée sur la quantification des transcrits. L'intégrité des ARN totaux est analysée par électrophorèse sur gel d'agarose 1%.

Parmi les ARN totaux, seuls les ARN ribosomiaux sont détectables sur gel. Les ARN messagers (ARNm) et les ARN de transfert (ARNt) quant à eux sont en trop faible quantité pour apparaître sur le gel par fluorescence en présence de BET. De plus, les ARNm étant de tailles très variables, ils s'étalent sur l'ensemble du profil électrophorétique. Ainsi, l'électrophorèse en gel d'agarose 1% de différents échantillons révèle trois bandes distinctes pour chaque échantillon (**Figure 41**). Ces bandes correspondent aux sous unités ribosomiques 28S, 18S et 5S. Leur présence sans traînée témoigne d'une bonne intégrité des ARN, sans dégradation notable.

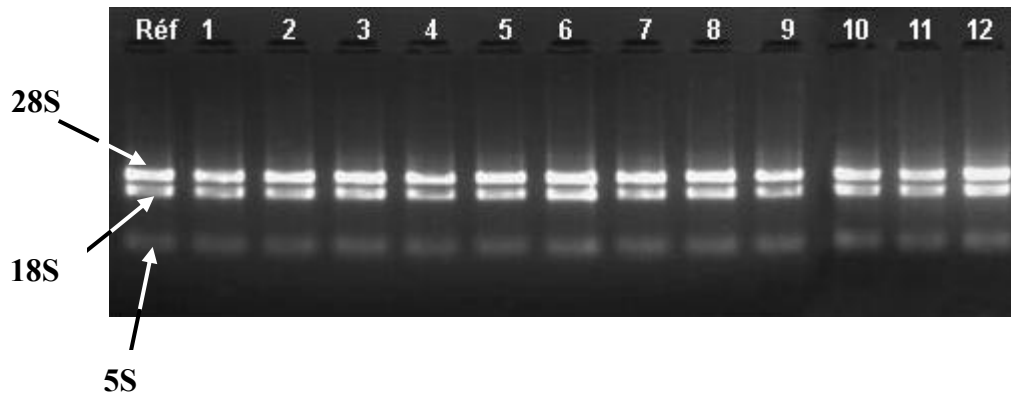


Figure 41: Electrophorèse en gel d'agarose 1% des ARN totaux d'extrait racinaire de *Vicia faba* mis en culture dans diverses conditions expérimentales.

Réf : Référence avant le traitement

1 : Témoin 12h

5 : Témoin 24h

9 : Témoin 48h

2 : 50µM de Cd 12h

6 : 50µM de Cd 24h

10 : 50µM de Cd 48h

3 : 100µM de Cd 12h

7 : 100µM de Cd 24h

11 : 100µM de Cd 48h

4 : 200µM de Cd 12h

8 : 200µM de Cd 24h

12 : 200µM de Cd 48h

Les flèches indiquent les trois sous unités ribosomiques: 28S, 18S et 5S.

L'analyse électrophorétique des ARN totaux extraits dans les diverses conditions expérimentales permet également de vérifier si les échantillons sont à des concentrations équivalentes. L'intensité des bandes doit être identique à l'œil nu. Si des différences d'intensité sont détectables après électrophorèse, les échantillons ARN sont redosés et leurs concentrations réajustées.

2. Contrôle de l'intégrité des ADNc: PCR de contrôle

Pour vérifier la qualité des ADNc, une PCR de contrôle à 40 cycles est effectuée en présence des amorces encadrant nos gènes d'intérêt. L'ensemble des amorces retenues pour nos expérimentations est rassemblé dans le tableau (Tableau 3).

Les gènes d'intérêt choisis sont:

- Un gène codant pour une protéine de stress (*Hsp70.1*).
- Des gènes codant pour des protéines métallothionéines intervenant dans la chélation des métaux intracellulaires (*MT1* et *MT2*).
- Un gène codant pour la phytochélatine synthase intervenant dans la synthèse des phytochélatines (*PCs*).
- Des gènes codant pour des protéines antioxydantes (*Cu-ZnSODcy*, *MnSOD*, *Cat* et *GR*).
- un gène domestique "house keeping gene" qui va nous servir de gène de référence (*Actine*).

Un seul produit d'amplification a été détecté avec les amorces *Actine*, *Hsp70.1*, *MT1*, *MT2*, *Cu-ZnSODcy*, *Cat* et *GR* par l'analyse électrophorétique des produits PCR. Ce qui suggère une bonne spécificité de ces amorces vis-à-vis des séquences cibles étudiées. Les PCR réalisées avec les amorces *Mn SOD* et *PCs* ne montrent aucune amplification, quelque soit la température d'hybridation et les échantillons d'ARN utilisés. L'absence d'amplification pour le gène *Mn SOD* pourrait être due à la non spécificité des amorces choisies ou à l'absence de transcrits *Mn SOD* chez la fève. Concernant les transcrits codant pour *PCs*, l'absence d'amplification pourrait être due à la non spécificité des amorces.

3. Quantification relative des ARN sur gel d'agarose

L'intensité des bandes révélées par électrophorèse ne traduit pas forcément l'abondance des transcrits dans les échantillons lorsque la PCR est réalisée avec 40 cycles. En effet, à 40 cycles, l'amplification par PCR se situe dans sa phase plateau donc dans une phase saturante dans laquelle la quantité d'amplificats n'est pas proportionnelle aux séquences cibles initiales. En effet, c'est dans la phase exponentielle que les amplificats sont produits en

Tableau 3: Amorces utilisées pour la quantification des transcrits par PCR

<i>Amorces</i>		<i>Séquences (5'...3')</i>	<i>Rôle des gènes cibles</i>
<i>Actine</i>	sens	CAGCAGAGCGGGAAATTGTGAGGG	'house keeping gene'
	anti-sens	AGGGCATCTGAATCTTTCAGCACCG	
<i>MT1</i>	sens	TGTGGAAGCAGTTGCAACTGTGGTG	Chélation des métaux intracellulaire
	anti-sens	ACCTTCAAACCTGGATCTTCGCCGG	
<i>MT2</i>	sens	GGAAGTAGCTGCAAGTGCGGCTC	Chélation des métaux intracellulaire
	anti-sens	CCATCTCAGCACTCTCATATTGAGC	
<i>Hsp70.1</i>	sens	TGTGCTTTGACATTGATGCCAACGG	Chaperonne moléculaire
	anti-sens	ATCCTCAGACTTGTACTTCTCAGCC	
<i>PCs</i>	sens	CTGARCCDGCNTATTGTGGTTTGGC	Synthèse des PC
	anti-sens	GATTCATCYAACCATCTCCAAGGCC	
<i>GR</i>	sens	CGGATGTTGTGCTATTTGCCACTGG	Cycle ascorbate- glutathion
	anti-sens	TCACCCACAGCCCATATGCTAGGG	
<i>Cu-ZnSODcy</i>	sens	TGGACCACATTTCAATCCTAATGG	Détoxification de O ₂ ^{•-}
	anti-sens	CTTCCCAAGATCATCAGGATCGG	
<i>Mn SOD</i>	sens	ATGCCATCAAATTCAACGGCGGAGG	Détoxification de O ₂ ^{•-}
	anti-sens	GGATTCCTTTGGTGGTTCACCACC	
<i>Cat</i>	sens	TGAACAGCTTGCATTTTGTCTGCC	Détoxification de H ₂ O ₂
	anti-sens	ATTGTTGTGGTGAGACCACTTGGG	

proportionnalité avec la quantité initiale des transcrits. En PCR semi-quantitative, cette phase exponentielle (nombre de cycle réduit) doit être recherchée en appliquant une gamme de cycles. Ainsi, le nombre de cycles nécessaires doit être suffisant pour que les amplifiats apparaissent détectables après coloration au BET dans le gel d'agarose et suffisamment réduit pour se situer dans la phase exponentielle d'amplification.

La **figure 42** donne les profils électrophorétiques des amplifications des transcrits codant pour *Actine*, *MT1*, *MT2*, *GR*, *Cu-ZnSODcy*, *Cat*, et *Hsp70.1*. L'électrophorèse est réalisée sur une gamme de cycles allant de 24 à 36 cycles. Les produits PCR de toutes ces amorces apparaissent bien détectables à 32 cycles. Les diverses amplifications réalisées en PCR semi-quantitative se font donc avec 32 cycles. Les amplifiats sont découpés, purifiés et séquencés pour leurs identifications dans les banques de données.

4. Séquençage des produits PCR

Les différents amplifiats purifiés et séparés sur gel d'agarose 1.2% sont représentés dans la **figure 43**. Une seule bande d'amplification correspond à un seul produit d'amplification ce qui indique que les amorces hybrident et encadrent un seul isoforme.

Les résultats de séquençage sont représentés dans le **tableau 4**. Les séquences choisies, dont les numéros d'accèsion sont fournis montrent une homologie avec des séquences de *Pisum sativum*.

5. Validation du gène de référence : l'Actine

Le messager de l'*Actine* est pris comme référence dans nos expériences. Le gène *Actine* est un gène codant une protéine du cytosquelette. C'est un gène domestique dont l'expression ne doit pas varier au cours de notre traitement cadmique.

Nous avons réalisé des PCR semi-quantitative en présence des amorces *Actine* désignées dans notre étude sur l'ADNc des échantillons issus de nos diverses conditions expérimentales.

L'analyse des gels après migration électrophorétique des produits d'amplification (**Figure 44**) nous renseigne sur divers point:

- on peut constater un seul produit PCR. L'obtention d'une seule bande indique que les amorces hybrident spécifiquement un seul isoforme de l'Actine.
- L'intensité des produits PCR est identique dans les divers échantillons, cela suggère que ce gène *Actine* présente vraisemblablement une expression constitutive avec une absence de régulation transcriptionnelle par le traitement cadmique. De ce fait, elle

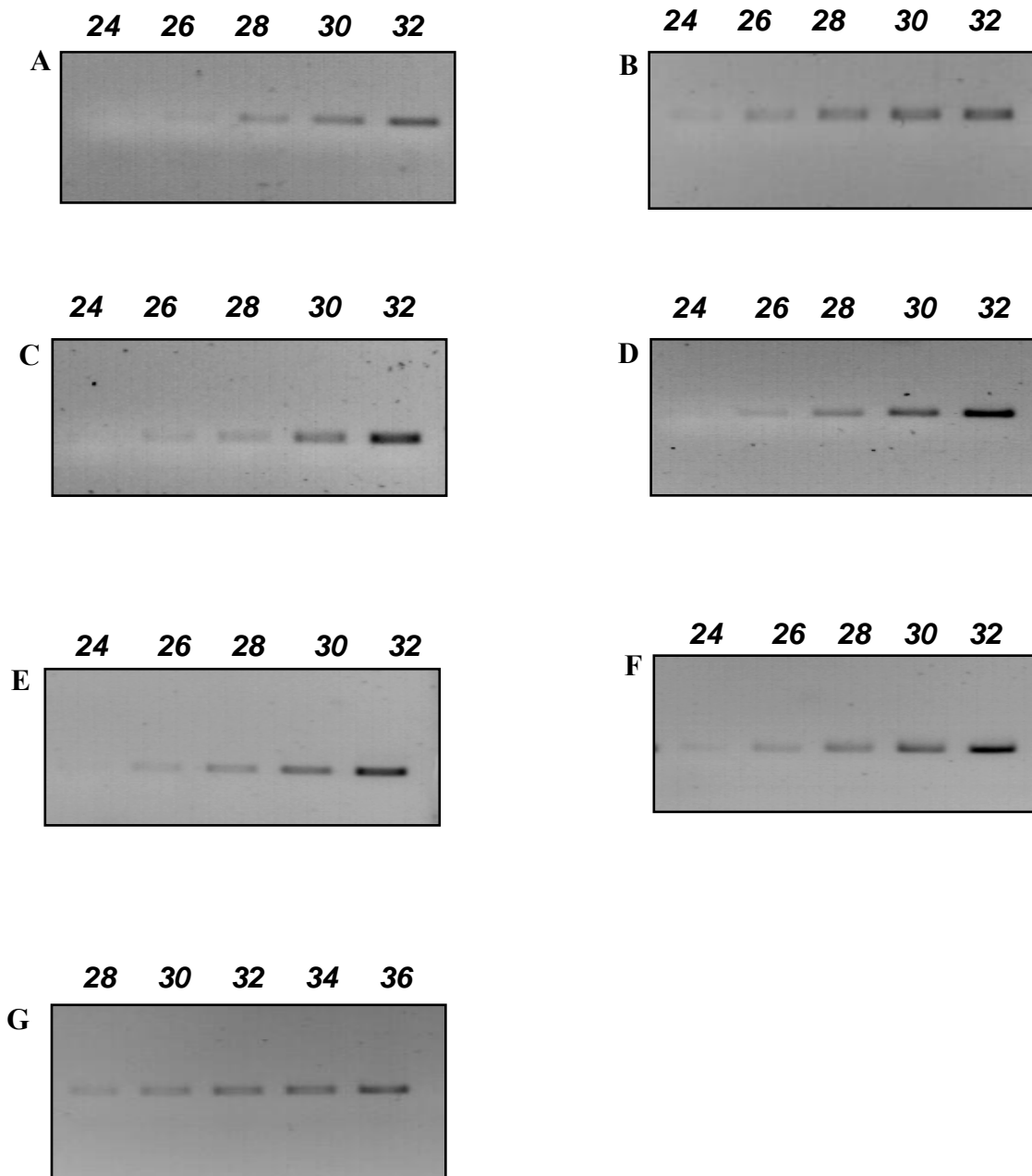


Figure 42 : Électrophorèse en gel d'agarose 1.2% des produits d'amplifications sur une gamme de cycles allant de 24 à 32 cycles pour l'Actine (**A**), MT1 (**B**), MT2 (**C**), GR (**D**), Cu-ZnSODcy (**E**), CAT (**F**) et de 28 à 36 cycles pour *Hsp70* (**G**). La température d'hybridation est de 56°C.

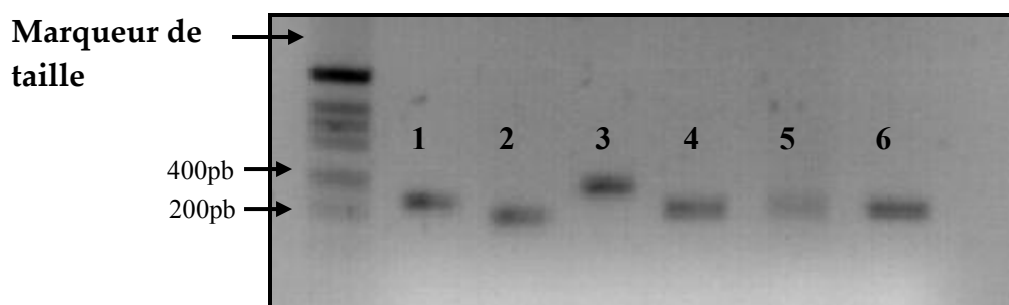


Figure 43: Electrophorèse en gel d'agarose 1.2% des amorces purifiées et prêtes pour séquençage (Amorces : **1**: *Cat*; **2** : *MT2*; **3** : *Cu-ZnSODcy*; **4** : *Hsp70.1*; **5** : *GR*; **6**: *Actine*)

Tableau 4: Homologies de séquences de fragments amplifiés par qPCR dans la banque de données.

PCR fragment	Length ^a (pb)	Accession number	Homology ^b	BLAST score
<i>Actine</i>	147	EU884301	<i>Vicia faba</i> cultivar long pod actin mRNA (AY338230.1)	3e-70
<i>Cat</i>	132	EU884302	<i>Pisum sativum</i> mRNA for catalase (X60169.1)	5e-62
<i>Cu-ZnSODcy</i>	177	EU884303	<i>Pisum sativum</i> mRNA for CuZn SOD (AB189165.1)	7e-8
<i>Hsp70.1</i>	136	EU884304	<i>Pisum sativum</i> (little marvel) HSC71.0 mRNA (Z32537.1)	3e-64
<i>MT2</i>	109	EU884305	<i>Vicia faba</i> clone 038 H06 metallothionein mRNA (EU920050.1)	2e-49
<i>GR</i>	105	EU884307	<i>Pisum sativum</i> mRNA for glutathione reductase(X98274.1)	4e-47

^a Sequence provided by MWG/OPERON

^b GenBank accession numbers of sequences homologous to qPCR fragments are in parentheses

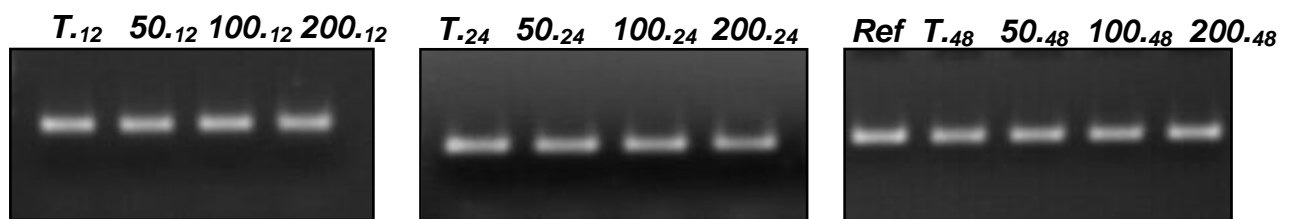


Figure 44: Electrophorèse sur gel d'agarose 1.2% des produits PCR issus de l'amplification des amorces *Actine*. (Nombre de cycles: 32; Température d'hybridation: 56°C)

pourra servir de gène de référence dans le calcul de la quantité relative de transcrits de la PCR quantitative en temps réel.

- Si l'intensité des produits PCR est identique pour les divers échantillons, cela nous renseigne aussi sur la bonne efficacité et homogénéité de la synthèse des ADNc avec l'utilisation du kit Eurogentec.

4. PCR semi-quantitative en temps réel (qPCR)

L'abondance des transcrits codant pour nos divers gènes d'intérêt est mesurée par PCR quantitative en temps réel (qPCR). Nous établissons des valeurs des QR (Quantité Relative) et non des quantités absolues de transcrits. Les qPCR sont donc utilisés en semi-quantitatives. Les amplifications de qPCR sont répétées au minimum trois fois afin de vérifier que les résultats obtenus sont reproductibles.

Les QR représentées sur les histogrammes ont été calculés selon la formule $QR = 2^{-\Delta\Delta Ct}$, ce qui suppose que l'efficacité de la PCR est de 100%. Les courbes d'amplification ainsi que les courbes de fusion seront présentées pour chaque couple d'amorces.

4.1. Analyse de la spécificité de la qPCR

Nous avons réalisé, dans un premier temps, une qPCR en présence des amorces *Actine*. Les profils d'amplification et les courbes de fusion obtenus sont donnés dans la **figure 45**. La courbe de fusion révèle la présence d'un seul pic correspondant à l'amplification d'un seul isoforme, ce qui est en adéquation avec les résultats de la **figure 44**.

Le même profil de courbe a été obtenu pour les trois répétitions de qPCR de l'*Actine*. La moyenne des valeurs de Ct obtenues avec l'*Actine* pourra être utilisée pour le calcul des accumulations relatives des transcrits des gènes à étudier.

Les courbes d'amplification de *Hsp70.1*, *MT2*, *Cu-ZnSODcy*, *Cat* et *GR* montrent que toutes nos amorces permettent une amplification efficace des matrices cibles. Les courbes de fusion ne présentant qu'un seul pic signifie que les amplifications sont uniques et spécifiques d'un seul type de transcrit (**Annexe VIII**). La qPCR est validée avec une amplification PCR suivie d'une électrophorèse en gel d'agarose 1.2%. Les produits PCR visualisés au BET sont séquencés pour être identifiés dans les banques de données.

Les courbes d'amplification de *MT1* montrent que les amorces ne sont pas spécifiques car on observe deux pics distincts dans la courbe de fusion. Ces amorces ne seront pas utilisées dans notre étude.

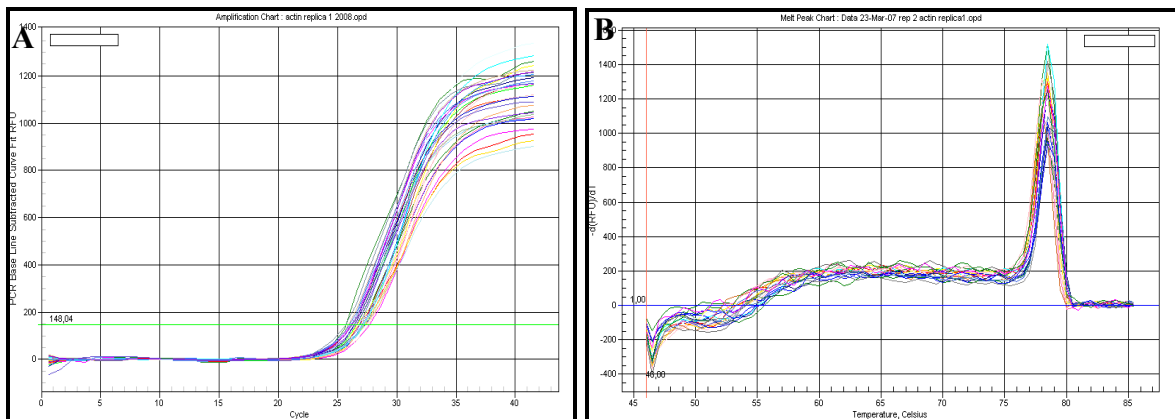


Figure 45: courbes d'amplification **(A)** et de fusion **(B)** de l'*Actine*

4.2. Dosage semi-quantitatif des séquences cibles

⇒ Protéines marqueurs de stress

Pour les protéines de choc thermique (**Figure 46**), on observe une accumulation importante des transcrits codant pour HSP 70 à 12 h du traitement en présence de 100 et 200 μ M de Cd dans la solution nutritive (QR de 3.63 et 4.6 fois celle du témoin). En prolongeant le temps d'exposition, l'accumulation des transcrits diminue jusqu'à rejoindre celle du témoin. Une concentration de 50 μ M ne provoque pas ou peu d'accumulation significative des transcrits durant l'exposition cadmique.

⇒ Protéines de chélation

Seule la plus forte concentration de Cd (200 μ M) semble entraîner une suraccumulation des transcrits *MT2* par rapport au témoin (**Figure 47**). Cette suraccumulation est très importante à 12 h où elle est 6,36 fois celle du témoin mais elle diminue progressivement en augmentant le temps d'exposition.

⇒ Protéines antioxydantes

On sait que l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) est le point de départ de la chaîne de production des radicaux libres. Or, dès ce stade précoce, la superoxyde dismutase inactive l'anion superoxyde en le transformant en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Celui-ci est ensuite rapidement catabolisé par la catalase et les peroxydases en dioxygène (O_2) et en molécules d'eau (H_2O).

- **SOD:** Nous nous sommes focalisés à étudier l'expression du gène codant pour l'isoforme Cu-Zn SOD localisé au niveau du cytosol. Le gène codant pour la protéine Cu-Zn SOD à localisation cytosolique (*Cu-ZnSODcy*) est exprimé au niveau des racines non traitées (**Figure 48**). A 12 h du traitement, l'accumulation des transcrits est 5 fois plus importante que celle du témoin avec la plus forte concentration cadmique (200 μ M) et diminue en prolongeant le temps du traitement.

- **CAT:** Les transcrits *Cat* montre une accumulation à 24 h du traitement quelque soit la dose de Cd utilisée dans la solution nutritive (50, 100 et 200 μ M du métal) (**Figure 49**). En prolongeant le temps de traitement cadmique (48 h), l'accumulation des transcrits est 4.8 fois celle du témoin à la plus faible concentration de Cd et 5.8 et 7.5 fois celle du témoin aux plus fortes concentrations de Cd (respectivement 100 et 200 μ M).

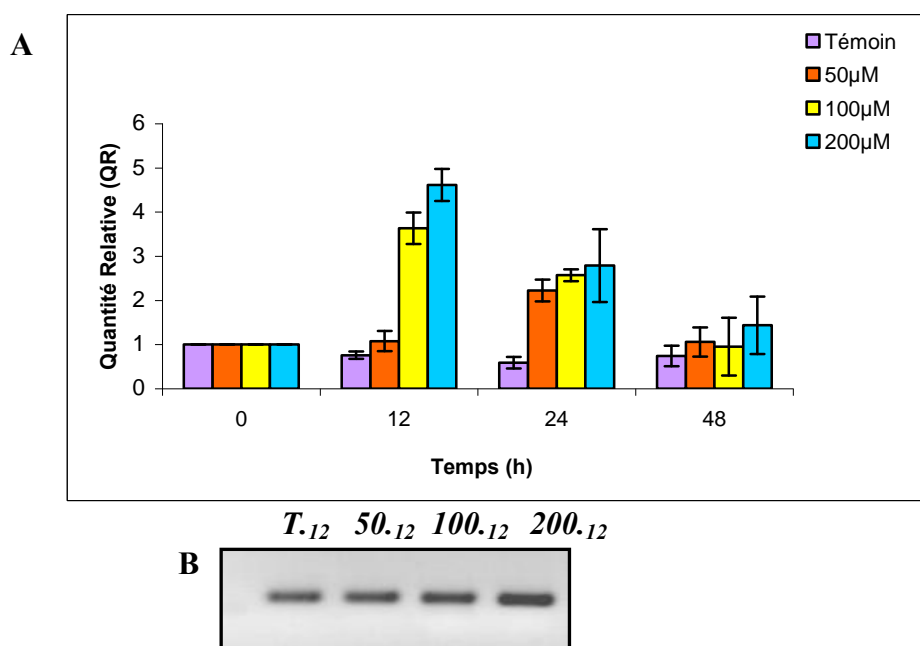


Figure 46: (A, B) Accumulation des transcrits *Hsp70.1* codant pour une protéine de choc thermique au niveau des racines de *Vicia faba* traitée par différentes concentrations de Cd. **A:** Représentation graphique des quantités relatives; **B:** Electrophorèse en gel d'agarose des produits de PCR.

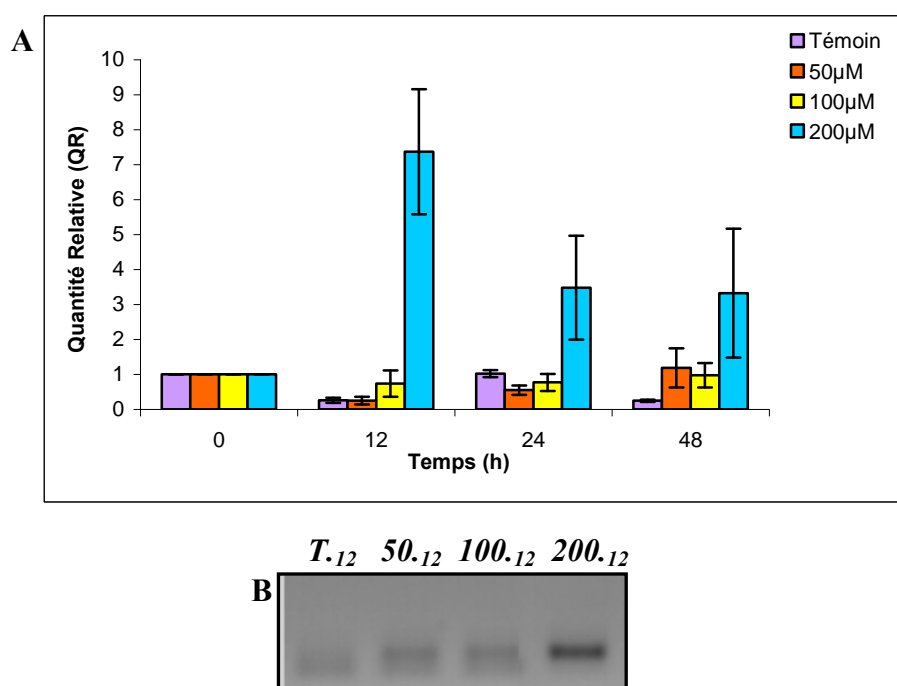


Figure 47: (A, B) Accumulation des transcrits *MT2* codant pour la métallothionéine type 2 au niveau des racines de *Vicia faba* traitée par différentes concentrations de Cd. **A:** Représentation graphique des quantités relatives; **B:** Electrophorèse en gel d'agarose des produits de PCR.

• **GR:** Le gène codant pour la GR (*GR*) montre une accumulation importante des transcrits en présence des concentrations de 100 μ M et 200 μ M à 12 h, 24 h et 48 h du traitement (**Figure 50**). L'abondance des transcrits est surtout importante à 12 h d'exposition à la plus forte concentration métallique (200 μ M) où elle est 8.6 fois celle du témoin. L'accumulation des transcrits à cette même concentration diminue en augmentant la durée du traitement tout en restant significative. Elle est environ 6 fois celle du témoin à la fin de l'exposition cadmique.

III. Discussion

Pour étudier la régulation transcriptionnelle d'un gène, trois étapes principales interviennent: tout d'abord, les ARN totaux sont extraits de la racine de fève traitée par trois concentrations de Cd (50, 100 et 200 μ M), puis ils sont convertis en ADNc par transcription inverse et enfin, l'abondance d'un transcrit dans un échantillon d'ADNc est estimée par PCR quantitative en temps réel.

Nous nous sommes intéressés dans un premier temps au gène codant pour une protéine de stress : HSP 70. Les protéines de stress HSP occupent la fonction de chaperonne moléculaire, liant transitoirement des protéines immatures ou dénaturées afin d'éviter que ces dernières n'interagissent de manière inappropriée et évitant alors une mauvaise conformation, une agrégation ou une perte de fonction (**Feige et Polla, 1994**). C'est un marqueur de stress largement utilisé dans l'étude de la réponse des végétaux aux stress abiotiques.

Dans nos expériences, nous avons montré l'abondance des transcrits *Hsp70.1* chez le témoin. Plusieurs études ont montré l'expression constitutive des protéines de choc thermique qui participent au maintien de l'homéostasie cellulaire (**Tanguay et al., 1993; Wickner et al., 1999**). Nous avons constaté que l'accumulation des transcrits est importante à 12 h de traitement en présence des plus fortes concentrations de Cd (100 et 200 μ M). On peut suggérer qu'elle varie selon la concentration du métal ajoutée dans la solution nutritive et la durée du traitement. Cette variation dans l'accumulation des transcrits des HSP 70 en présence de Cd a été montré aussi par plusieurs auteurs (**Neumann et al., 1994; Sanita di Toppi et Gabrielli, 1999**).

En absence de stress, le degré d'expression de *Hsp70* semble dépendre de l'activité métabolique. L'exposition d'une cellule à un traitement toxique induit trois étapes successives (**Burel et al., 1992**). La première étape dite d'altération se traduit, au niveau moléculaire, par

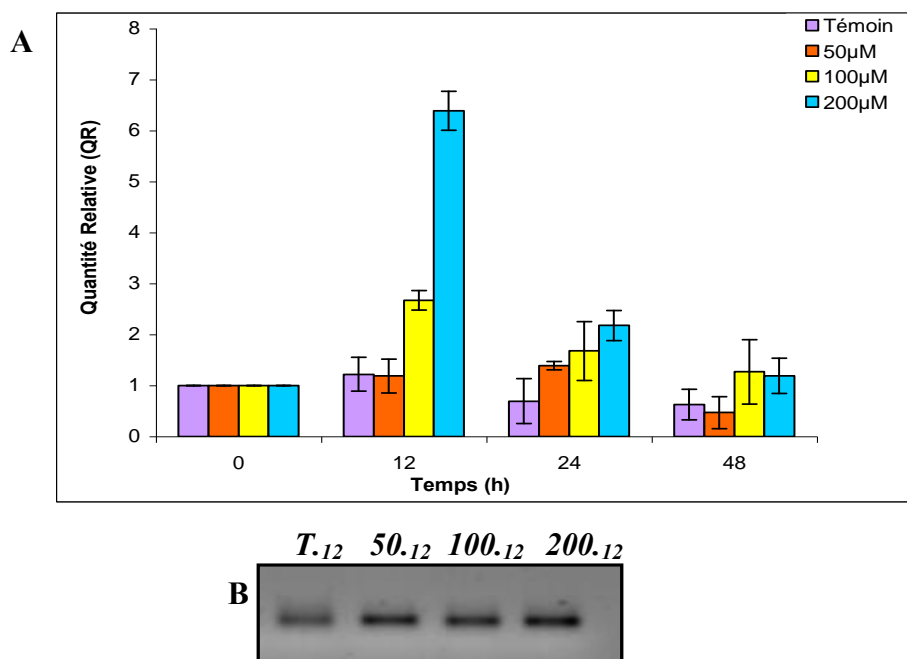


Figure 48: (A, B) Accumulation des transcrits *CuZnSODcy* codant pour la protéine Cu-Zn superoxyde dismutase cytosolique au niveau des racines de *Vicia faba* traitée par différentes concentrations de Cd. **A:** Représentation graphique des quantités relatives; **B:** Electrophorèse en gel d'agarose des produits de PCR.

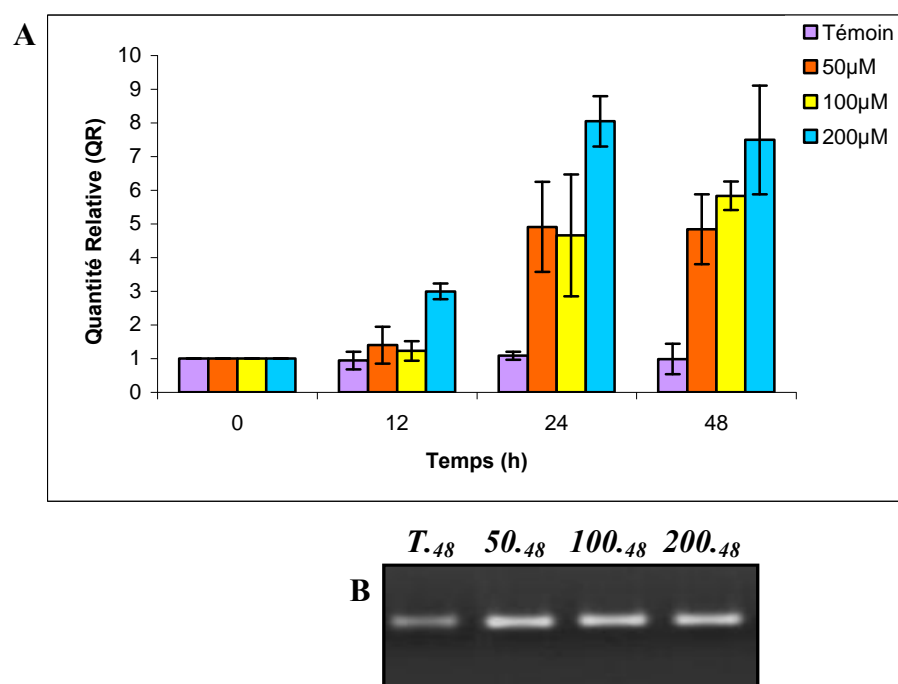


Figure 49: Accumulation des transcrits *Cat* codant pour la catalase au niveau des racines de *Vicia faba* traitée par différentes concentrations de Cd. **A:** Représentation graphique des quantités relatives; **B:** Electrophorèse en gel d'agarose des produits de PCR.

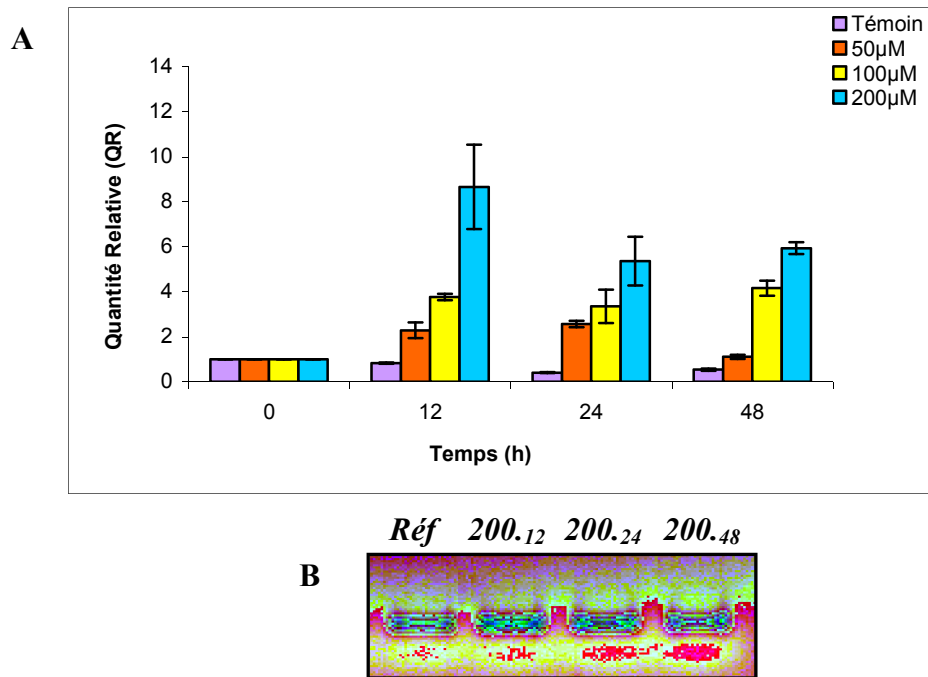


Figure 50: (A, B) Accumulation des transcrits *GR* codant pour la glutathion réductase au niveau des racines de *Vicia faba* traitée par différentes concentrations de Cd. **A:** Représentation graphique des quantités relatives; **B:** Electrophorèse en gel d'agarose des produits de PCR.

la dégradation de protéines ayant pour conséquence la perte de leur fonction et la formation d'agrégats protéiques insolubles (Nguyen et al., 1989). Dans un second temps, la "réponse au choc thermique" proprement dite se caractérise par l'activation transcriptionnelle des gènes *Hsps* aboutissant, notamment, à la synthèse de HSP 70 détectable à ce moment dans la cellule à des taux bien plus élevés que dans des conditions normales. Enfin, la phase de récupération, durant laquelle les altérations morphologiques sont corrigées, termine le processus. Les protéines retrouvent des activités enzymatiques similaires à leurs valeurs initiales (Nguyen et al., 1989). L'activation des gènes *Hsps* est alors interrompue. Ce qui pourrait expliquer la diminution de l'accumulation des transcrits *Hsp70.1* après 12 h du traitement des racines de fève par 100 et 200µM de Cd.

Une étude de Freeman et al. (1995), se focalisant sur le stress oxydant comme inducteur de HSP, indique que ce serait plus précisément l'oxydation des groupements thiols des protéines qui représente le signal initial, menant à la formation de ponts disulfures anormaux et ainsi à la déstabilisation et la dénaturation de ces protéines. Il a été alors suggéré que l'oxydation des groupements thiols protéiques et non-protéiques soit le signal commun responsable de l'activation de la "réponse au choc thermique" par ses inducteurs (Zou et al., 1998; Stevens et al., 2000).

La mise en évidence d'une accumulation des transcrits *Hsp70.1* nous indique que la plante a perçu, sans aucun doute, le stress cadmique dès 12h de traitement. Ce signal moléculaire est accompagné de la surexpression de *MT2*. En effet, la présence d'une concentration de 200µM de Cd dans la solution nutritive a entraîné une accumulation importante des transcrits *MT2* au niveau des racines de fève surtout à 12 h d'exposition. L'accumulation des transcrits codant pour les MT chez les plantes soumises à un stress métallique est un phénomène bien étudié. Celui du Cd a été décrit par Finkemeier et al. (2003) et Tamás et al. (2008) dans les racines de *Hordeum vulgare*. De même, Lee et al. (2004) ont montré une augmentation de l'expression des gènes *AtMT2a* et *AtMT3* chez *Arabidopsis* exposé au Cd. Chez cette espèce, les ARNm du gène codant pour MT1 sont exprimés d'une manière constitutive alors que ceux du gène codant pour MT2 sont induits par le métal et leur expression se limite à la région en croissance (Murphy et al., 1997).

Les MTs ont la capacité de fixer les métaux lourds par la formation de complexes stables afin d'empêcher leur circulation à l'état libre dans les tissus. Chez les végétaux, ces protéines permettent le transport des ions métalliques du cytoplasme jusque dans la vacuole. La compartimentation vacuolaire des ions métalliques permet ainsi la détoxification de la

plante vis à vis des ions métalliques. **Zimeri et al. (2005)** ont montré que les métallothionéines sont stabilisées par la fixation de Cd et qu'elles interviennent dans les processus de tolérance et d'accumulation de ce métal au niveau des plantes.

Les 12 premières heures de traitement cadmique induisent une accumulation des transcrits *Hsp70.1* et *MT2*. On rencontre le même type de régulation pour les *Cu-ZnSODcy* ou encore la *GR*. En effet, notre étude a révélé une augmentation de l'expression du gène *Cu-ZnSODcy* et du gène *GR* à 12 h du traitement en présence de fortes concentrations de Cd. Seule la *Cat* présente une régulation transcriptionnelle plus tardive. Les transcrits *Cat* sont, en effet, accumulés en grande quantité plus tard, après 24 de traitement et ce pour les trois concentrations de Cd (50, 100 et 200 μ M).

D'après cette étude moléculaire, nous avons montré que tous les marqueurs utilisés présentent une surexpression à 12 h du traitement surtout à la plus forte concentration de Cd (200 μ M) (à l'exception du gène *Cat*). Une concentration de 200 μ M de Cd semble être nécessaire pour une induction précoce de l'accumulation des transcrits codant pour nos gènes d'intérêt (dans les 12 premières heures). Cette surexpression coïncide avec une augmentation significative par rapport au témoin de H₂O₂ à 12 h du traitement (**Figure 19b**). Le H₂O₂, à des faibles teneurs, pourrait jouer le rôle d'une molécule signal (**Rentel et Knight, 2004; Maksymiec, 2007; Timperio et al., 2008; Singh et al., 2009**) qui alerte la plante du stress cadmique environnant dans le cas des gènes *Hsp70.1*, *MT2*, *Cu-ZnSODcy*, *GR*. Les transcrits *Cat* sont accumulés dès 24 h quelque soit la concentration de Cd utilisée (50, 100 et 200 μ M). Dans ce cas, on peut suggérer qu'une accumulation plus importante de H₂O₂, substrat de la catalase, est nécessaire à l'accumulation des transcrits *Cat* ce qui permettrait après leur traduction dans les cellules la détoxification de cette molécule nocive pour la structure cellulaire.

En tenant compte de nos travaux antérieurs relatifs aux activités des enzymes antioxydantes, nous avons montré que l'isoforme Cu-Zn SOD montre une activité importante à 12 h de traitement au niveau des racines de fève en présence de 50, 100 et 200 μ M de Cd (**Figure 23b**). L'activité la plus importante est notée en présence de 50 μ M de Cd. Ceci n'est pas en concordance avec notre étude moléculaire montrant une accumulation des transcrits codant pour cette enzyme en présence de 200 μ M. Cette non-correspondance des résultats entre l'expression du gène *Cu-ZnSODcy* et l'activité de la protéine résultante pourrait être expliquée par le fait que l'isoforme choisi est à localisation cytosolique alors que d'après

Kliebenstein et al. (1998) et **Moran et al. (2003)**, la Cu-Zn SOD peut se trouver au niveau de noyau, de l'apoplasme et des chloroplastes.

Concernant la catalase, les diverses concentrations de Cd (50, 100 et 200 μ M) provoquent une accumulation des transcrits *Cat* et une augmentation de l'activité de l'enzyme dès 24 h de traitement (**Figure 24b**). La catalase semble subir une régulation transcriptionnelle.

Tenant compte des résultats relatifs à l'activité de la GR, nous avons montré que l'activité de cette enzyme est importante dès 24 h du traitement quelque soit la concentration de Cd utilisée (**Figure 29b**). L'accumulation des transcrits codant pour cette enzyme (*GR*) est importante dès 12 h du traitement. On peut suggérer alors que l'activité de la GR peut être issue de l'accumulation de ses transcrits avec un certain délai. Ce délai est lié au temps d'apparition de la protéine et sa surexpression (environ 12 h). Selon plusieurs études, l'augmentation de l'activité de la glutathion réductase peut être expliquée par des modifications transcriptionnelle ou traductionnelle suite au stress cadmique (**Xiang et Olivier, 1998; Romeo-Puertas et al., 2002**). **Yannarelli et al. (2006)** ont suggéré une régulation post-traductionnelle de la GR en présence de Cd et non transcriptionnelle chez *Triticum aestivum*. De même, **Romero-Puertas et al. (2006)** ont proposé une régulation post-traductionnelle de la GR peroxysomiale en présence de Cd.

**Chapitre IV : Effets génotoxiques du cadmium
chez la fève**

I. Introduction

Dans ce chapitre, nous avons étudié les effets génotoxiques du Cd chez *Vicia faba*. Deux tests ont été utilisés; l'indice mitotique et l'induction des micronoyaux. L'étude a été effectuée au niveau des méristèmes racinaires des plantules de fève traitée par 50, 100 et 200 μ M de Cd, du fait que les cellules méristématiques sont des cellules à fort pouvoir de division.

Nous nous sommes intéressés aussi à d'autres aspects de la génotoxicité du Cd touchant la structure et le nombre de chromosomes.

II. Résultats

1. Effets de Cd sur la variation de l'indice mitotique

Le **Tableau 5** montre l'effet de différentes doses de Cd sur le nombre de cellules en division dans les extrémités racinaires des plantules de fève. Nous avons observé une diminution de l'indice mitotique au cours du traitement quelque soit la dose de métal utilisée. Cette diminution est hautement significative à 48 h de traitement ($p < 0.001$). Elle est d'environ 54% par rapport au témoin pour un traitement cadmique de 50 μ M, 45% pour un traitement cadmique de 100 μ M et atteint 80% pour un traitement de 200 μ M.

2. Effets de Cd sur l'induction des micronoyaux

Les résultats du traitement des extrémités racinaires de *Vicia faba* par le chlorure de cadmium (**Tableau 6**) ont montré que, pour les diverses doses de Cd testées, on observe une induction significative des micronoyaux ($p < 0.05$) dès 12 h de traitement. Cette induction est hautement significative ($p < 0.001$) dès 24 h de traitement quelque soit la dose de Cd utilisée.

3. Effets de Cd sur l'induction d'aberrations chromosomiques

L'observation en microscopie photonique des extrémités racinaires de fève soumis au traitement cadmique montre d'autres types d'anomalies qui touchent les chromosomes de *Vicia faba*.

La **figure 51** montre des cellules témoins des plantules de fève en division et la **figure 52**, les cellules méristématiques racinaires traitées par la Cd.

Parmi ces anomalies chromosomiques, on peut noter:

- ⇒ Des divisions cellulaires anormales; des métaphases (**Figure 53A**) et anaphases anormales (**Figure 53B**).

Tableau 5: Effet du cadmium sur la modification de l'indice mitotique au niveau des extrémités racinaires de fève

Durée du traitement (heures)	Indice mitotique (% ± SD)		
	12	24	48
Contrôle	19.66 ± 1.87 (100)	20.38 ± 2.34 (100)	19.88 ± 1.96 (100)
CdCl₂ (µM)			
50	16.56 ± 2.72 * (84)	14.30 ± 1.32 *** (70)	11.23 ± 1.7 *** (56)
100	16.83 ± 2.80 * (85)	12.88 ± 2.06 *** (63)	8.85 ± 3.49 *** (44)
200	10.14 ± 1.94 *** (51)	11.34 ± 2.57 *** (55)	4.02 ± 2.27 *** (20)

*** $p < 0.001$, * $p < 0.05$ comparé au contrôle

Les valeurs entre parenthèses représentent le pourcentage par rapport au témoin

Tableau 6: Effet du cadmium sur l'induction des micronoyaux au niveau des extrémités racinaires de fève

Durée du traitement (heures)	Fréquence de MCN (‰ ± SD)		
	12	24	48
Contrôle	0 ± 00	0 ± 00	0 ± 00
CdCl₂ (µM)			
50	0.5 ± 0.53*	0.66 ± 0.5**	1.33 ± 0.51***
100	0.37 ± 0.5*	1.22 ± 0.66***	1.75 ± 0.8***
200	0.55 ± 0.52**	1.37 ± 0.74***	1.44 ± 0.52***

*** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ comparé au contrôle

- ⇒ Des cellules comportant des chromosomes dont la structure est altérée (clastogénicité). Dans ce cas, on a pu détecter la présence des chromosomes collants ("stickiness") (**Figure 54A, B, C**) et des ponts anaphasiques (**Figure 55A, B**). Des cellules à plusieurs ponts anaphasiques, des cellules en phase de rupture de leur pont ainsi que des fragmentations chromosomiques sont illustrées dans les **figures 56, 57** et **58** respectivement.

- ⇒ Des cellules décrivant une mauvaise ségrégation de chromosomes se présentant sous forme de chromosomes isolés dus à une non migration des chromatides (**Figure 58A, B**). Ces chromosomes résultent d'un déplacement retardé des chromatides (décalage) au cours de l'anaphase.

- ⇒ Des cellules représentant des chromosomes retardataires qui n'ont pas rejoint la plaque équatoriale en métaphase (**Figure 59A**). Lors de l'anaphase, les deux chromatides jointes migrent vers l'un des pôles et seront inclus dans une cellule fille, l'autre cellule fille ne possédant pas ce matériel génétique.

- ⇒ Nous avons détecté aussi la présence de cellules à deux micronoyaux (**Figure 60A, B**).



Figure 51: Différents stades de division cellulaire dans la zone méristématique racinaire des plantules de *Vicia faba* non traitées; **i** : interphase, **1** : prophase, **2a** : début de métaphase, **2** : métaphase, **3a** : anaphase, **3b** : fin d’anaphase, **4** : télophase.

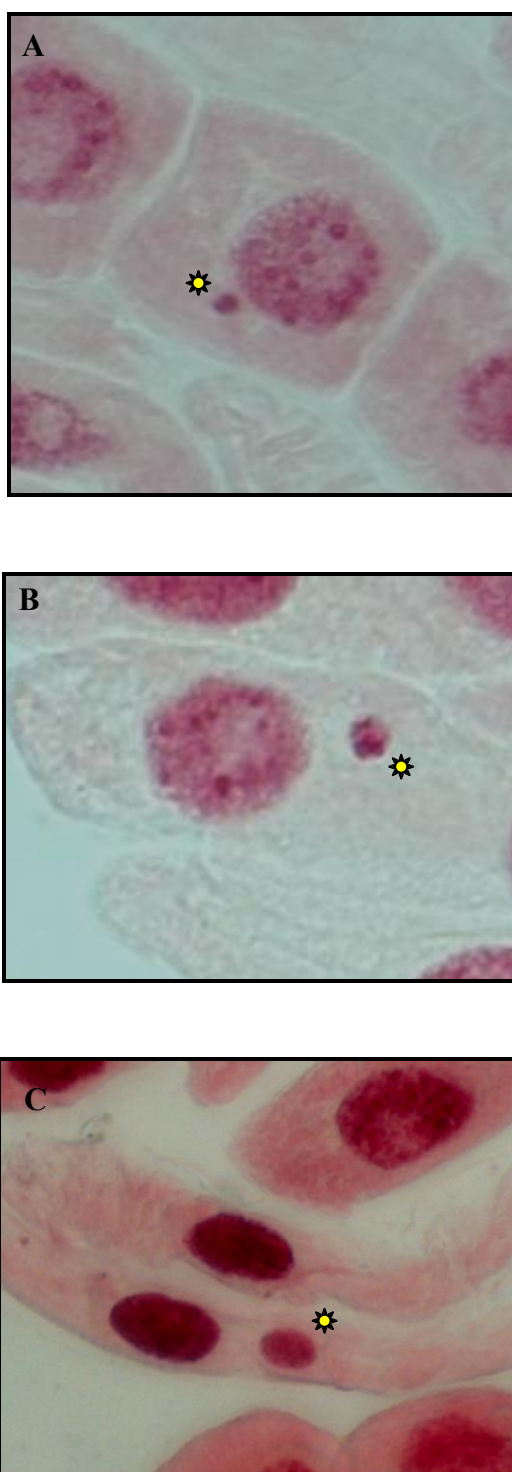



Figure 52: Induction des micronoyaux (*) [A : micronoyau de petite taille, B : micronoyau de taille moyenne, C : micronoyau de grande taille] après 48 h d'exposition des extrémités racinaires de *Vicia faba* à des concentrations de 50 μ M (A, B) et 200 μ M (C) de Cd.



Figure 53: Cellules en division cellulaire anormale () après 48 h de traitement des extrémités racinaires de *Vicia faba* par CdCl_2 .

- **A** : métaphase anormale (50 μM de Cd)
- **B** : anaphase anormale (50 μM de Cd)

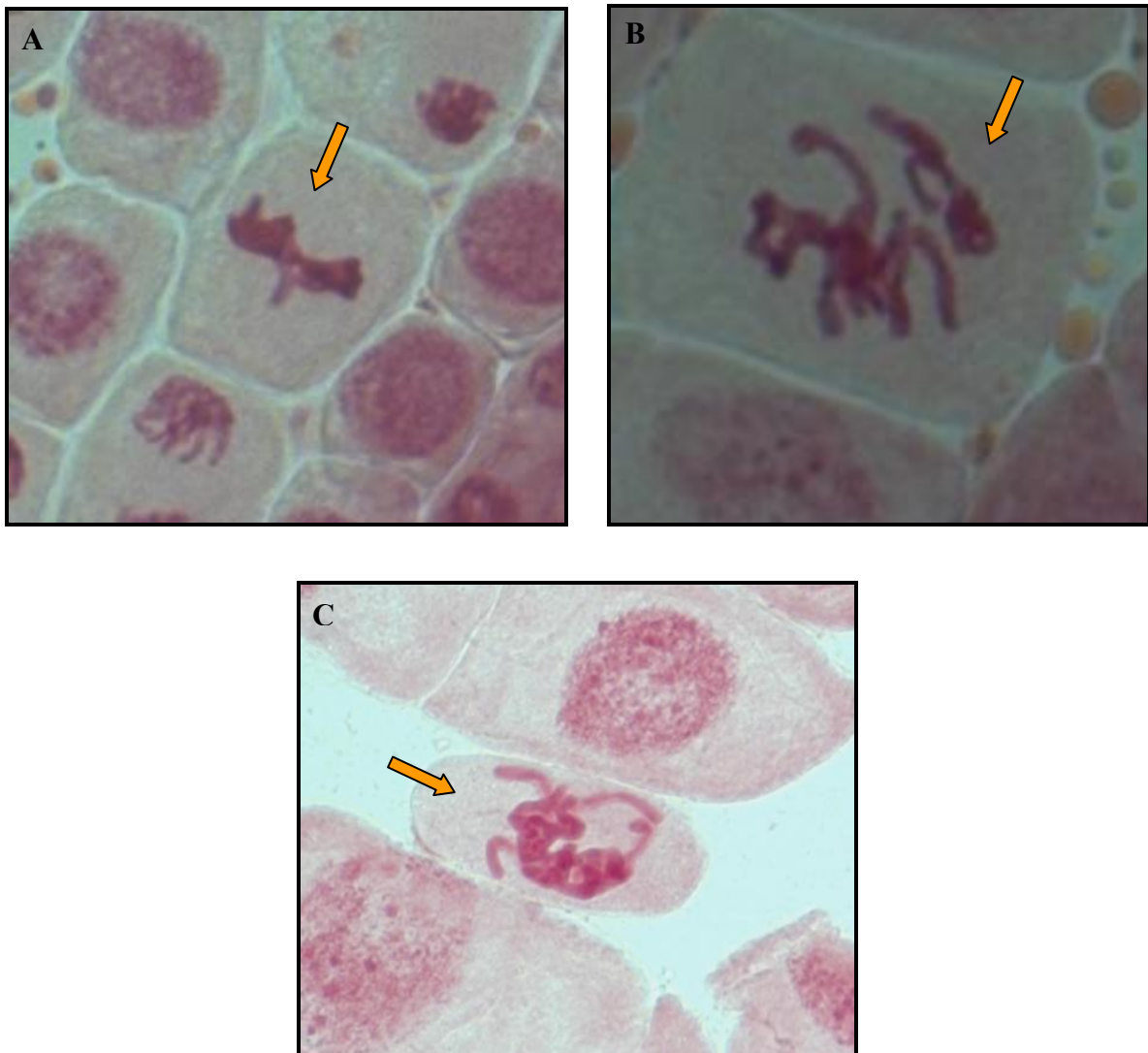


Figure 54: Induction des chromosomes adhérents ("stickiness" (→)) au niveau de la zone méristématique racinaire de *Vicia faba* après 48 h d'exposition à des concentrations de 50μM (A), 100μM (B) et 200μM (C) de CdCl₂.

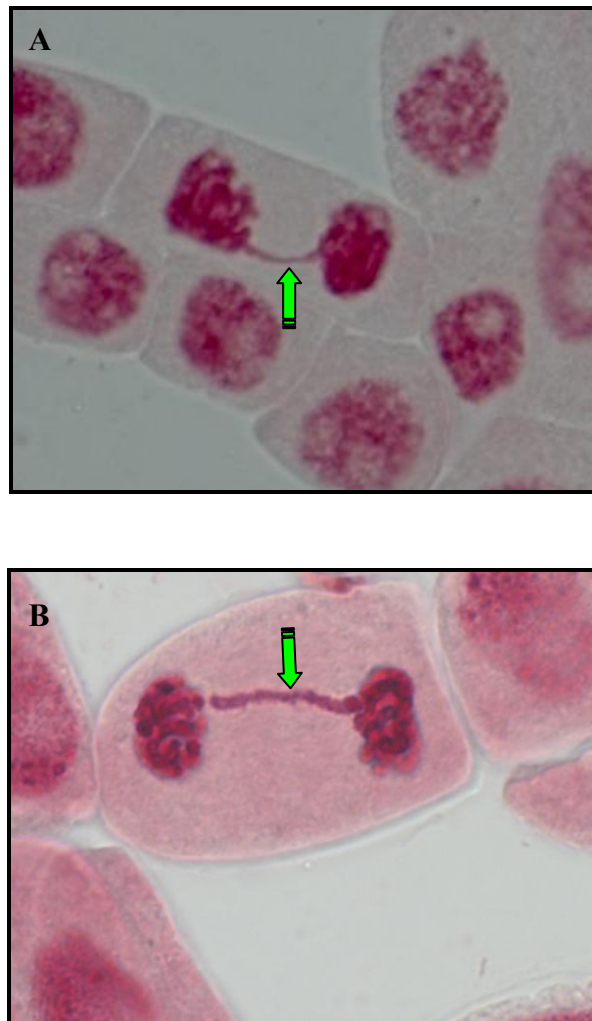



Figure 55: Induction d'un pont anaphasique () au niveau de la zone méristématique racinaire de *Vicia faba* après 48 h d'exposition à des concentrations de 50 μ M (A) et 200 μ M (B) de CdCl₂.

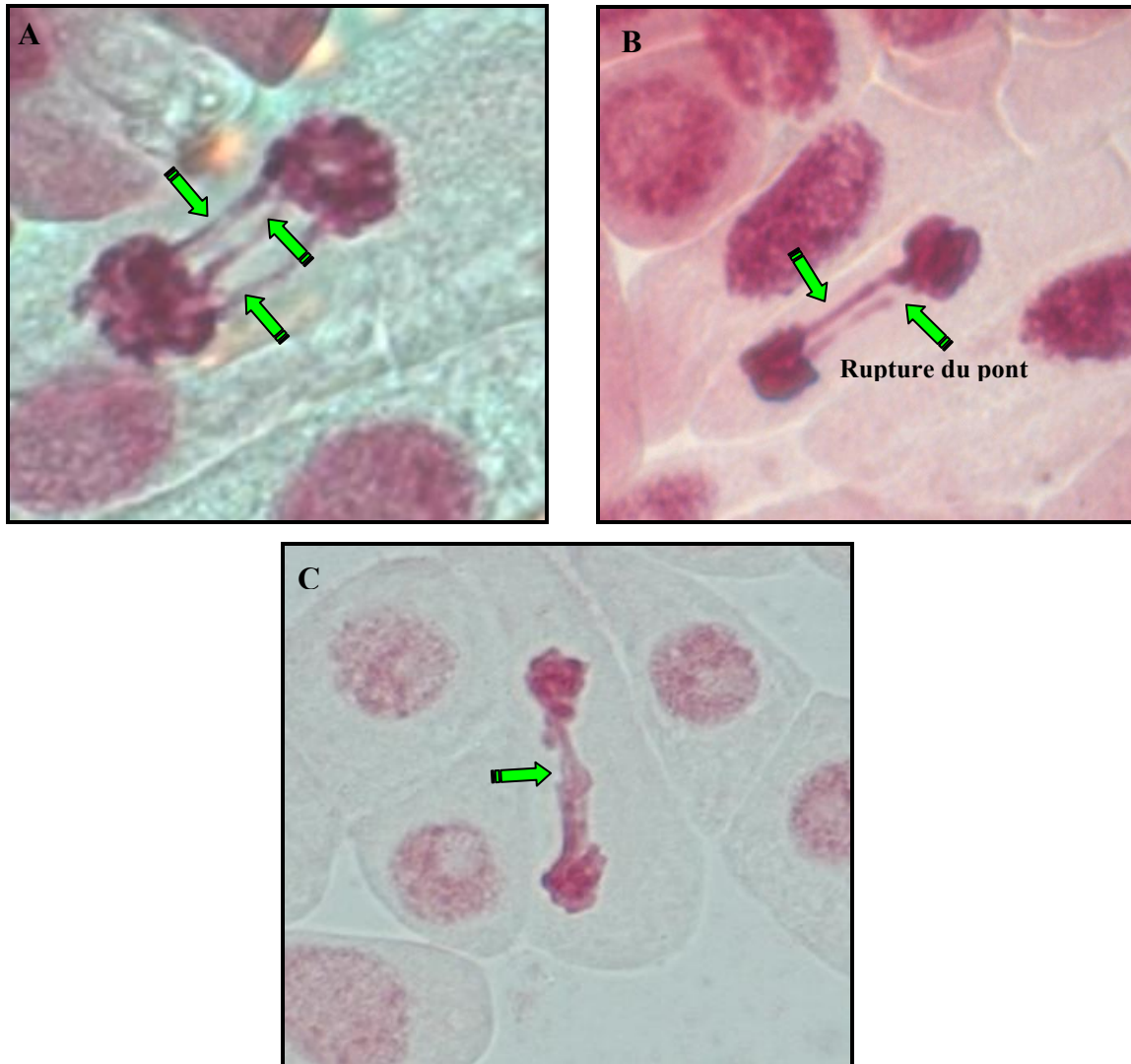



Figure 56: Induction de plusieurs ponts anaphasiques () au niveau de la zone méristématique de *Vicia faba* après 48 h d'exposition à des concentrations de 50 μ M (A) et 200 μ M (B, C) de CdCl₂.

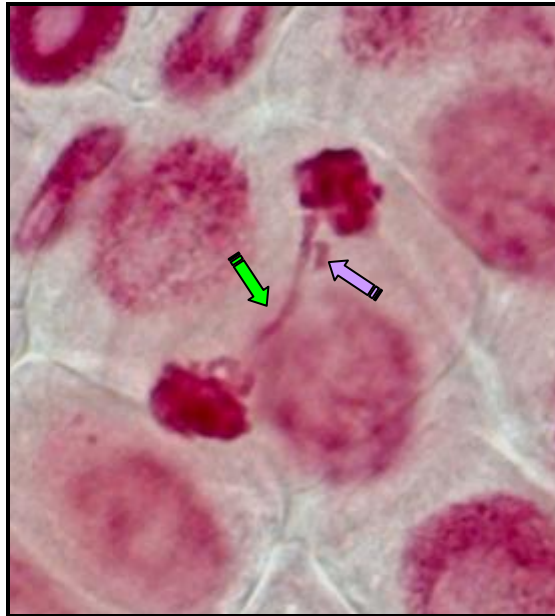



Figure 57: Fragmentation chromosomique () induite par une concentration de 50 μ M de Cd au niveau de la zone méristématique racinaire de *Vicia faba* après 48 h d'exposition.

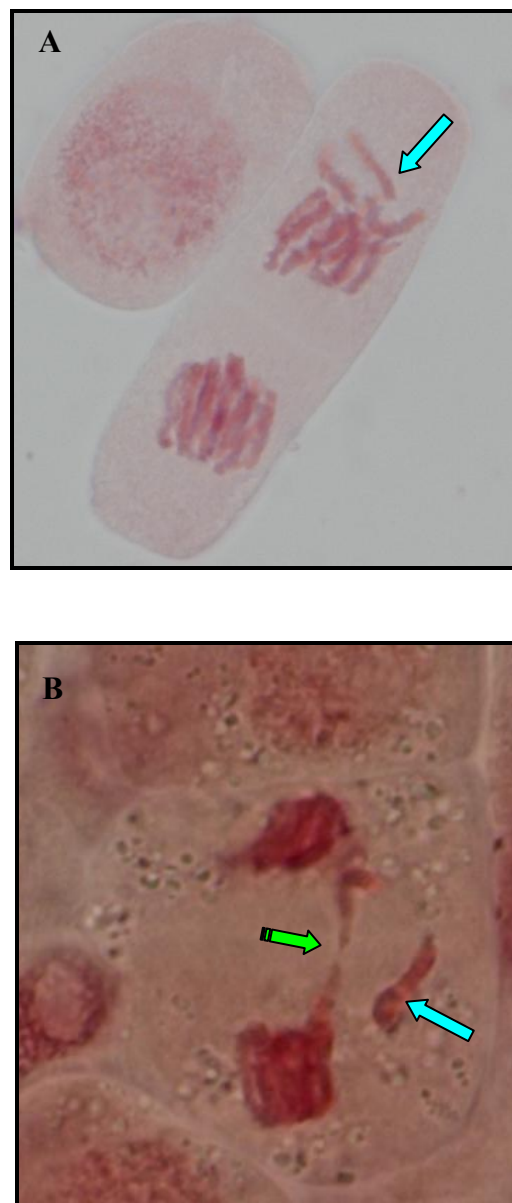




Figure 58: Formation de chromosomes isolés () à la télophase au niveau des cellules de la zone méristématique racinaire de *Vicia faba* après 48 h d'exposition à des concentrations de 200µM (**A**) et 50µM (**B**) de CdCl₂.



Figure 59: Formation de chromosomes non-disjoints () au niveau des cellules de la zone méristématique racinaire de *Vicia faba* après 48 h d'exposition à 200 μ M de CdCl₂.

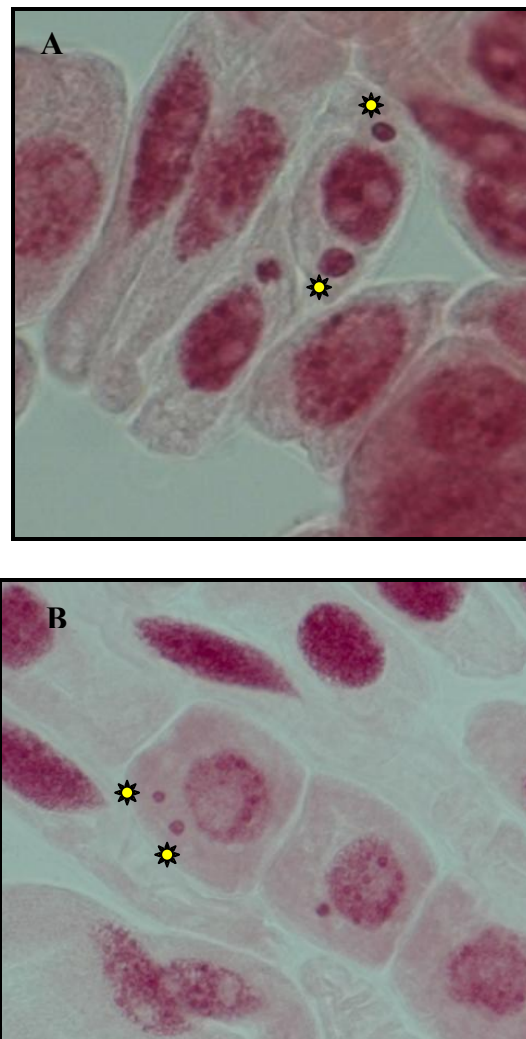


Figure 60: Formation de deux micronoyaux (★) au niveau des cellules de la zone méristématique racinaire de *Vicia faba*.

A : Traitement par 50μM de Cd pendant 24 h

B : Traitement par 200μM de Cd pendant 48 h

III. Discussion

Dans ce chapitre, nous avons présenté les résultats relatifs aux effets génotoxiques de Cd sur les extrémités racinaires de *Vicia faba*. Ces effets sont estimés par le comptage du nombre de cellules en division et la détermination du potentiel de cet agent polluant à induire des micronoyaux et des aberrations chromosomiques.

L'indice mitotique déterminé dans la zone méristématique racinaire est affecté par la présence de Cd dans la solution nutritive. On enregistre une baisse qui varie avec la dose et le temps de traitement. A 48 h de traitement cadmique, l'indice mitotique est 2.4 fois plus faible que celui du témoin à une dose de 100µM et 5 fois plus faible à une dose de 200µM.

L'indice mitotique est un paramètre expérimental largement utilisé dans les études génotoxiques de divers polluant. Pour le Cd, la diminution du nombre de cellules en division a été déjà démontrée par **Ünyayar et al. (2006)** et **Çelik et al. (2008)** dans les racines de *Vicia faba* pour des concentrations équivalentes à celles utilisées dans nos conditions expérimentales (50, 100 et 200µM de Cd).

L'indice mitotique est un test de génotoxicité très utilisé pour la détermination de l'effet néfaste de plusieurs polluants. Outre le Cd, l'indice mitotique est aussi affectée par d'autres métaux lourds tels que le cuivre (**Jiang et al., 2000**), par un gaz tel que le SO₂ (**Yi et Meng, 2003**), par un herbicide tel que l'hydrazide maléique (**Marcano et al., 2004**), et par divers composés polluants tels que le benzoate de sodium, l'acide borique, l'acide citrique, le citrate de potassium et le citrate de sodium (**Türkoğlu, 2007**). Tous ces polluants induisent une baisse de l'indice mitotique dans les méristèmes racinaires.

Si l'indice mitotique diminue, cela indique un blocage des mitoses par les polluants. Il est accompagné de diverses anomalies qui peuvent être soit d'origine clastogéniques soit d'origine aneugéniques. Nous avons observé, dans les méristèmes racinaires des plantules traitées par diverses concentrations de Cd, des anomalies clastogéniques (des chromosomes collants ou "stickiness", un ou plusieurs ponts anaphasiques et des fragments chromosomiques) et des anomalies aneugéniques (des chromosomes isolés et non-disjoints).

Les adhérences de chromosomes ("Stickiness") sont les premières anomalies mitotiques qui pourraient survenir au niveau des prophases. Ces adhérences observées dans les méristèmes racinaires de fève traitée par le Cd pourraient être à l'origine des ponts formés et des fragments chromosomiques isolés lorsque les chromosomes homologues se séparent à l'anaphase (**Souguir et al., 2008**). Ce type d'aberrations est défini par **Rieger et al. (1976)**, les

chromosomes présentent un aspect collant et par **Jiang et al. (2000)**, il s'agit d'une rangée de fibres chromosomiques créées par des ponts entre chromatides.

Un tel changement dans la morphologie des chromosomes a été observé chez d'autres espèces végétales telles que *Allium cepa* (**Fiskesjo, 1988; Liu et al., 1995; Borboa et De la Torre, 1996; Liu et al., 2003**) et *Hordeum vulgare* (**Zhang et Xiao, 1998**). La génotoxicité du Cd a été évaluée aussi chez des cellules humaines (**Seone et Dulout, 2001; Palus et al., 2003**) et chez les larves de *Xenopus laevis* (**Mouchet et al., 2006**).

Le Cd n'est pas le seul métal connu pour son effet génotoxique. Plusieurs travaux ont montré que d'autres métaux lourds tels que As, Be, Cr, Ni, Pb, Co, Se et Cu perturbent la structure et le nombre de chromosomes au niveau des cellules végétales (**Ahberg et al., 1972; Fiskesjo, 1979; 1988; 1997; Mukherjee et Sharma, 1986; Lerda, 1992; Liu et al., 1995; Borboa et De la Torre, 1996; Jiang et al., 2000; Souguir et al., 2008**).

Dans notre cas d'étude, le traitement des racines de fève par 50, 100 et 200µM de Cd a induit la formation de micronoyaux. L'induction des micronoyaux chez *Vicia faba* suite à un traitement par le Cd a été aussi étudiée par plusieurs auteurs (**Steinkellner et al., 1998, Rosa et al., 2003; Ünyayar et al., 2006; Béraud et al., 2007**).

Dans les racines de fève traitées par le Cd, les micronoyaux trouvés dans le cytoplasme des cellules mitotiques en interphase, pourraient avoir différentes origines. En se référant à nos travaux effectués avec le cuivre (**Souguir et al., 2008**) (**Figure 61**), ces micronoyaux pourraient résulter de la rupture des ponts anaphasiques, des fragments de chromosomes induits par la clastogénicité, d'une chromatide ou d'un chromosome entier. Selon la nature de matériel génétique isolé, scindé ou altéré, on observe des micronoyaux de différentes tailles (**Figure 52**). Cette différence de taille des micronoyaux a été observée dans les méristèmes racinaires de fève traitée par 50, 100 et 200µM de Cd.

L'apparition des anomalies chromosomiques suite à un traitement cadmique a été observé et interprété par **Rivetta et al. (1997)**. Le Cd entre dans la cellule à travers les canaux de Ca^{2+} situés sur la membrane plasmique. Le Ca^{2+} peut être remplacé par le Cd (**Rivetta et al., 1997; Clarkson et Lutge, 1989**) car ces ions présentent des rayons similaires ($Ca^{2+}=0,099nm$; $Cd^{2+}=0,097nm$) (**Wen et al., 1989**). **Means et Dedman (1989)** indiquent que la calmoduline (CaM) Ca-dépendante est localisée spécifiquement au niveau du fuseau mitotique et semble intervenir dans les processus de régulation et fonctionnement des chromosomes à travers le contrôle de la polymérisation-dépolymérisation des microtubules

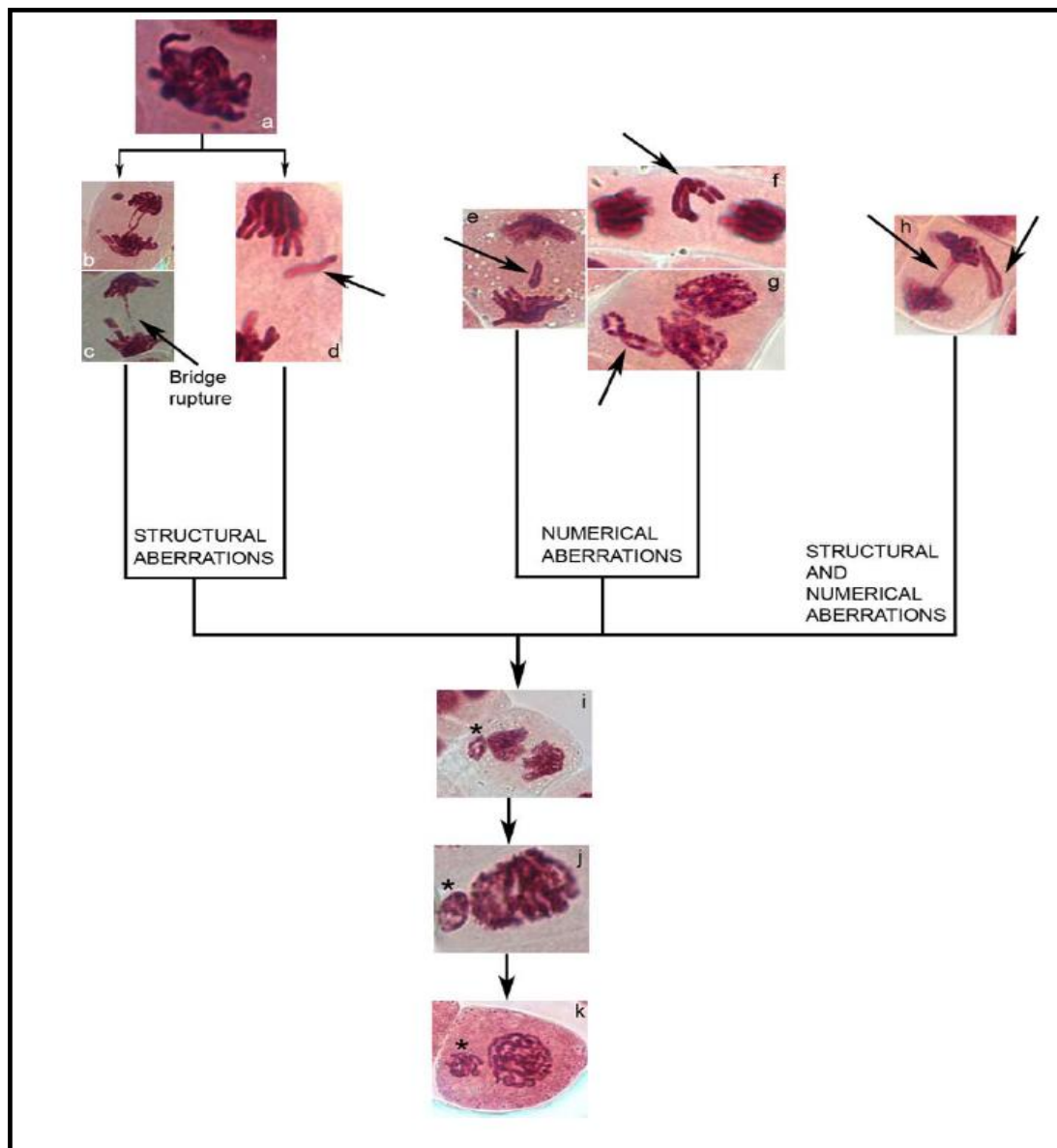


Figure 61: Analyse cytologique des aberrations chromosomiques dans les méristèmes racinaires de *Vicia faba* traitées par le cuivre. Illustration de différentes origines probables de la formation d'un micronoyau. Les anomalies chromosomiques peuvent être classées en deux types: Aberrations structurales et numériques. Les deux types d'aberrations sont observés au niveau des cellules en mitose. **a:** "stickiness" en métaphase, **b** et **c:** pont anaphasique, **d:** fragmentation chromosomique, **e** et **f:** mauvaise ségrégation des chromosomes, **g:** chromosome isolé en télophase, **h:** chromosome acentrique et pont anaphasique, **i** et **j:** micronoyau en télophase et interphase, respectivement, **k:** micronoyau en prophase. Les flèches indiquent les aberrations chromosomiques et les asterisks indiquent les micronoyaux. (Souguir et al., 2008).

(**Chueng, 1980; 1983**). Le Cd^{2+} entre en compétition avec le Ca^{2+} et se fixe à la CaM (**Rivetta et al., 1997**). Ainsi, les anomalies survenant au niveau de l'organisation des microtubules peuvent être le résultat d'une activité inappropriée de la calmoduline en présence de l'ion cadmique (**Perrino, 1989**). De ce fait, la présence des ions cadmiques dans la solution nutritive pourrait modifier la structure du cytosquelette. De même, la fonction des protéines de cytosquelette telles que la tubuline peut être perturbée suite à la fixation des ions cadmiques aux groupements thiols (**Wallin et Hartley-Asp, 1993**).

La fixation du Cd aux groupements thiols peut altérer la fonction d'autres protéines notamment les enzymes antioxydantes intervenant dans la détoxification des espèces réactives de l'oxygène ce qui va engendrer des lésions au niveau des lipides, des protéines et au niveau de l'ADN (**Ercal et al., 2001 ; Gichner et al., 2004**). L'accumulation des espèces réactives de l'oxygène et leurs implications dans les dommages survenus à l'ADN suite à un stress cadmique a été mise en évidence par **Kovalchuk et al. (2001)** et **Rosa et al. (2003)**.

Le Cd agit aussi sur l'ultrastructure du nucléole, induisant un changement de sa morphologie; cela suggère un blocage de la biosynthèse et/ou de la maturation des ARN ribosomiques qui se situent dans ces organites et affectent la formation du précurseur ribosomique 45S (**Marcano et al., 2000; Liu et al., 2003**).

Discussion générale

Pendant ces dernières décennies, la pollution a constitué une préoccupation majeure du fait de son action néfaste sur l'homme, sur les animaux et sur la productivité des végétaux. L'industrialisation et le trafic routier en constante augmentation constituent les principales sources de pollution. Ces polluants interagissent entre eux et forment des molécules hautement réactives et toxiques pour les végétaux. Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à étudier les effets de la pollution par le Cd sur la fève, une Fabacée très consommée en Tunisie. Le premier chapitre de ce travail a été consacré à l'étude de l'effet du stress causé par le Cd sur la croissance des plantules de fève. Nous avons, par la suite, étudié l'effet de ce métal sur la teneur en pigments chlorophylliens, sur la composition en certains éléments minéraux (calcium, fer et zinc) ainsi que son accumulation dans les feuilles et les racines de plantules de fève. Le deuxième chapitre, subdivisé en trois parties, a été consacré d'une part à l'étude de quelques paramètres marqueurs du stress oxydant et d'autre part, aux réponses enzymatiques et non-enzymatiques des plantules de fève face à ce stress environnemental. Le troisième chapitre a porté sur l'expression de certains gènes codant pour des protéines de stress, des protéines de chélation et des protéines antioxydantes. L'effet génotoxique du cadmium a été étudié lors du dernier chapitre.

Nous rappelons que les plantules de fève âgées de 12 jours ont subi un traitement cadmique en solution hydroponique durant 12, 24 et 48 h. L'étude a porté sur la partie foliaire, composée des deux premiers étages foliaires, et la partie racinaire qui représente l'interface entre le métal et la plante.

Nos résultats ont montré que des concentrations variables de Cd comprises entre 50 et 200 μ M de Cd provoquent, en 48 h, un retard dans le développement des feuilles et une diminution de leur biomasse fraîche et sèche. Dans les racines, le Cd a induit une inhibition de l'allongement racinaire et une réduction de la matière fraîche et de la matière sèche. La réduction de la croissance racinaire est plus prononcée que celle des feuilles. La vulnérabilité du système racinaire semble être le résultat de l'accumulation préférentielle de Cd dans les racines. D'après nos résultats, les plantules de fève accumulent majoritairement le Cd dans les racines. L'accumulation est 44 fois plus importante que celle notée dans les feuilles en présence d'un traitement de 200 μ M de Cd après 48 h d'exposition. Cette rétention privilégiée du Cd dans les racines pourrait constituer un moyen de défense pour limiter son ascension vers la partie aérienne. L'accumulation racinaire de Cd suite à son immobilisation par la paroi cellulaire (**Vecchia et al., 2005**) ou par des carbohydrates extracellulaires (**Wagner, 1993**)

semble être une stratégie de défense adoptée par les plantules de fève soumises à un stress cadmique.

La forte accumulation de Cd dans les racines pourrait être aussi le résultat de sa complexation avec les phytochélatines. Celles ci jouent un rôle essentiel dans l'homéostasie des ions métalliques chez les plantes en chélatant dans le cytoplasme des métaux tel que le Cd. Elles permettent leur séquestration vacuolaire (**Mehra et Tripathi, 2000**) ce qui limite leur effet néfaste sur le métabolisme cellulaire. D'après nos résultats, nous avons montré que les racines des plantules de fève, organes qui accumulent plus le métal, augmentent leurs teneurs en PC à 48 h du traitement en présence de fortes concentrations de Cd (100 et 200 μ M). Outre les PC, la séquestration vacuolaire des ions métalliques se fait par d'autres protéines de chélation telles que les métallothionéines. Lors de notre étude, nous avons montré une suraccumulation des transcrits codant pour les MT2 à 12 h du traitement des racines des plantules de fèves par 200 μ M de Cd. Une suraccumulation des transcrits MT2 pourraient être à l'origine d'une augmentation des protéines MT2 dans la cellule. De ce fait, la synthèse des PC et de MT2 dans les racines des plantules de fève traitées par le Cd pourraient limiter l'exportation des ions cadmiques vers les parties foliaires. Malgré leur faible passage dans les feuilles, les ions métalliques ont provoqué une réduction significative de la teneur en chlorophylle totale à la fin de la période de traitement. Cette réduction pourrait provoquer une altération de la photosynthèse et par la suite la diminution de croissance foliaire. La diminution de la croissance pourrait, aussi, avoir comme origine les troubles physiologiques touchant l'alimentation hydrique et minérale. En effet, des perturbations de l'absorption de l'eau (seulement dans les racines) et de certains éléments minéraux (zinc, fer, calcium) ont été montrées dans les plantules de fève traitées par le Cd.

L'accumulation des ions cadmiques dans les plantules de fève semble provoquer une altération de la membrane plasmique à travers l'attaque des acides gras polyinsaturés. Cette lipoperoxydation membranaire semble dépendre de l'organe qui accumule plus de métal. En effet, nous avons montré une accumulation importante de malondialdéhyde, l'un des produits de lipoperoxydation membranaire, dans les racines de plantules de fève traitées par le Cd. Dans les feuilles, organes qui accumulent moins les ions cadmiques, la production de lipoperoxydes ne varie pas par rapport au témoin. Cette lipoperoxydation semble être due à un effet indirect du Cd par les radicaux libres qu'il engendre. D'après nos résultats, nous avons montré une accumulation importantes des ROS ($O_2^{\cdot-}$ et H_2O_2) dans les racines de fève traitées par le Cd. Cependant, l'accumulation des ROS dans les feuilles ne s'accompagne pas d'une

lipoperoxydation membranaire. Ceci suggère que la quantité des ROS accumulés dans les feuilles n'est pas encore suffisante pour provoquer la lipoperoxydation membranaire.

Outre les ROS, la stimulation de la lipoperoxydation montrée dans les racines de fève traitées par le Cd semble impliquer la lipoxygénase. Cette enzyme, à localisation membranaire, montre une stimulation de son activité dès 12 h du traitement cadmique mais l'activité rejoint celle du témoin à la fin de la période du traitement. Plusieurs travaux ont montré une augmentation de l'activité LOX en présence d'un stress métallique (**Somashekaraiyah et al., 1992; Spiteller, 2003; Ali et Hahn, 2006; Yurekli et Porgali, 2006; Skórzynska-Polit et al., 2006**). De ce fait, nous pouvons suggérer, qu'en plus des ROS, la LOX peut être, en partie, responsable de la lipoperoxydation membranaire dans les racines de fève.

Les membranes constituent un support de différentes molécules impliquées dans le transport de solutés ou dans les processus de transfert d'électrons auxquels peuvent être associées des réactions de production d'énergie chimique potentielle. De ce fait, une perte de l'intégrité membranaire conduirait à des troubles physiologiques du métabolisme de la plante et raisonnablement, de la croissance.

L'augmentation de la peroxydation lipidique, les modifications des activités des enzymes antioxydantes et les rapports ASA/DHA et GSH/GSSG constituent, également, des marqueurs de stress oxydant. Ces marqueurs ont pour rôle de lutter contre les espèces oxydantes indésirables en empêchant leur apparition ou de les détruire une fois apparues dans le but d'éviter ou limiter leurs effets néfastes.

En ce qui concerne les enzymes antioxydantes, nos résultats ont montré que l'activité de différents isoformes de la superoxyde dismutase varie selon l'organe étudié. En effet, une stimulation suivie d'une inhibition de l'activité Cu-Zn SOD par rapport au témoin ont été montrées dans les feuilles et les racines des plantules de fève traitées par le Cd. L'inhibition de l'activité Cu-Zn SOD pourrait s'expliquer par l'accumulation des ROS particulièrement le H₂O₂ connu comme inhibiteur des Cu-Zn SOD (**Sandalio et al., 2001**). Les isoformes Fe/Mn SOD montrent une activité importante à 48 h du traitement dans les feuilles de fève. Dans les racines des plantules témoins et traitées par le Cd, cette activité semble être absente ou très faible.

L'élimination de H₂O₂ est assurée par la catalase, la gaïacol peroxydase et les enzymes du cycle ascorbate-glutathion. Nous avons montré l'absence d'une activité considérable de

ces différentes enzymes dans les feuilles, durant le traitement. Un tel résultat confirme l'hypothèse mentionnée précédemment concernant une quantité insuffisante de H₂O₂.

Dans les racines, les activités catalase, gaïacol peroxydase, MDHAR, DHAR et GR augmentent significativement à la fin du traitement cadmique. Toutefois, il y a une différence dans les processus de régénération de l'ascorbate qui dépend du temps de traitement : à 24 h, la présence de Cd dans la solution nutritive entraîne une augmentation de l'activité DHAR. A 48 h, c'est la DHAR et la MDHAR qui sont activées. L'ascorbate produit n'est pas utilisé par l'ascorbate peroxydase, enzyme clé du cycle ascorbate-glutathion. Cette enzyme ne présente aucune activité importante durant le traitement des plantules de fève par le Cd. Dans ce cas, l'ascorbate produit pourrait être incorporé dans la lutte contre les espèces oxydantes indésirables à travers la voie non-enzymatique. Cependant, l'étude de cette voie de réponse a révélé une diminution du rapport ASA/DHA à la fin du traitement en présence de fortes concentrations de Cd. La diminution de ce rapport dans les racines et les feuilles de fève traitées par le Cd pourrait être un indicateur de l'incapacité de la plante à maintenir au moins un état ASA-DHA équilibré.

En ce qui concerne le glutathion, nous avons noté une augmentation du rapport GSH/GSSG dans les racines et les feuilles des plantules de fève traitées par le Cd. L'augmentation de ce rapport est due à la stimulation de la synthèse du glutathion réduit.

Le GSH protège les cellules contre l'action toxique des ROS. Il intervient aussi dans la synthèse des phytochélatines dont les métaux lourds sont les inducteurs primaires. Dans les racines des plantules de fève traitées par le Cd, la synthèse de GSH est catalysée par la GR dont l'activité a été stimulée par le Cd. La synthèse de GSH pourrait être assurée par d'autres enzymes telles que la γ -glutamylcystéine synthétase et la glutathion synthétase (**Haag-Kerwer et al., 1999**). Dans les feuilles, cette synthèse semble faire intervenir la glutathion synthétase et la γ -glutamylcystéine synthétase, vue l'activité inchangée de la GR dans cet organe.

La présence des ions cadmiques dans la solution nutritive semble altérer la membrane plasmique. Une fois présents dans le cytoplasme, ces ions semblent perturber le métabolisme cellulaire en modifiant les activités de plusieurs enzymes notamment les enzymes antioxydantes. L'effet du Cd pourrait être direct ou indirect à travers la forte production des ROS dans les plantules de fève traitées.

Nous avons essayé, par la suite d'étudier les altérations survenues dans le noyau cellulaire en présence de Cd dans la solution nutritive. D'après nos résultats, nous avons

montré que des concentrations de 50, 100 et 200 μ M de Cd baissent significativement l'indice mitotique dans les méristèmes racinaires des plantules de fève. La diminution du nombre de cellules en division semble être accompagnée par une induction des micronoyaux et une apparition de divisions cellulaires anormales et de nombreuses anomalies structurales. Parmi les anomalies structurales touchant l'organisation des microtubules, nous avons montré la présence d'adhérences chromosomiques ("stickiness"), de ponts anaphasiques et de fragments de chromosomes. De même, le Cd provoque la formation d'anomalies qui touchent le nombre de chromosomes. Nous avons également montré la présence de chromosomes isolés et de chromosomes non-disjoints. Ces anomalies qui surviennent après une mauvaise ségrégation des chromatides lors de l'anaphase, pourraient avoir comme origine une altération de la fonction du fuseau mitotique.

La génotoxicité de Cd semble avoir comme origine une production accrue des ROS notamment le H₂O₂ (**Wang et Huang, 1994; Rosa et al., 2003**). Elle pourrait, aussi, résulter de l'inhibition des enzymes intervenant dans les processus de réparation de l'ADN (**Hartwig, 1998; Lützen et al., 2004**) et conduisant à la mort cellulaire. En effet, à de faibles concentrations, les dommages causés par le Cd peuvent être réparés. Cependant, ce métal est capable d'inhiber, à fortes concentrations (**Mouchet et al., 2006**), les mécanismes de réparation de l'ADN. Si ces dommages ne sont pas réparés, la mort cellulaire est déclenchée (**Cejka et al., 2003**). D'après nos résultats, le déclenchement de la mort cellulaire semble dépendre de la concentration de Cd et de la durée du traitement. En effet, la plus forte concentration de Cd (200 μ M) semble provoquer une perte de l'intégrité cellulaire dès 24 h de traitement dans les racines de fève. En prolongeant le temps de traitement (48 h), des concentrations de 50, 100 et 200 μ M de Cd semblent être responsables de la mort cellulaire dans les racines de fève. La mort cellulaire pourrait être une stratégie de défense adoptée par les plantules de fève traitées par le Cd à travers l'élimination des cellules contaminées.

La perturbation de l'intégrité cellulaire et les anomalies survenues dans le noyau cellulaire telles que la diminution de l'indice mitotique, la formation des micronoyaux et l'induction des anomalies chromosomiques (**Seregin et Ivanov, 2001; Liu et al., 2003**) pourraient être à l'origine de la diminution de la croissance racinaire des plantules de fève traitées par le Cd.

L'augmentation de la production des ROS dans les racines de fève traitées par le Cd semble être responsable, d'une manière directe ou indirecte, de nombreux dommages oxydants. Ces dommages touchent les lipides, les protéines et le noyau cellulaire. Cependant ces espèces, semblent jouer le rôle de messenger secondaire entraînant une surexpression des

gènes codant pour des protéines de stress, des protéines de chélation des ions cadmium et des enzymes antioxydantes. D'après nos résultats, nous avons montré une suraccumulation des transcrits *hsp70.1*, *MT2*, *Cu-ZnSODcy*, *Cat*, *GR* dans les racines de fève traitées par le Cd. Cette suraccumulation est importante à 12 h du traitement en présence de fortes concentrations du métal (à l'exception du gène *Cat*). L'expression de ces gènes empêche la dénaturation des protéines et permet la chélation des ions cadmiques et la protection de la cellule contre les effets néfastes des ROS.

Outre son rôle de signalisation (**Rentel et Knight, 2004; Maksymiec, 2007**), le peroxyde d'hydrogène semble avoir une action indirecte de renforcement des parois cellulaires pour diminuer la pénétration du métal à l'intérieur des cellules de fève. Cette molécule est nécessaire dans les processus de polymérisation des monomères de lignine catalysée par les peroxydases pariétales (**De Jaegher, 1986**). La polymérisation des monomères de lignine dans la paroi cellulaire confère aux cellules végétales une solidité et une rigidité pariétale. La synthèse de lignine fait intervenir les composés phénoliques dont les rôles sont variés et interviennent notamment dans la signalisation et la protection contre des agents biotiques et abiotiques. Le dosage des composés phénoliques dans les feuilles et les racines des plantules de fève traitées par le Cd a révélé une accumulation de ces composés dans les deux organes étudiés. Cependant l'augmentation de la rigidité de la paroi cellulaire pourrait être à l'origine de la diminution de la croissance observée chez les plantules de fève traitées par le cadmium.

Conclusion générale et Perspectives

L'adaptation des végétaux aux conditions contraignantes de leur environnement nécessite des modifications morphologiques, métaboliques et moléculaires. Ces changements doivent aider à la fois à minimiser les effets nocifs des stress et permettre à la plante de survivre.

D'après nos résultats, le stress causé par la présence du cadmium dans la solution nutritive, engendre des désordres relatifs à la croissance des plantules de fève. Ces altérations se manifestent, à l'échelle de la plante entière, par une réduction de l'élongation racinaire et de l'expansion foliaire et une réduction des biomasses fraîche et sèche. Ces altérations sont plus importantes dans les racines comparées aux feuilles des plantules de fève traitées par 50,100 et 200 μ M de Cd. Le système racinaire semble être plus affecté par le stress métallique. Ceci pourrait être expliqué par l'accumulation et la répartition du métal au sein de la plante. En effet, le Cd est accumulé préférentiellement dans les racines qui montrent des teneurs en Cd plus élevées par rapport aux feuilles. Les racines semblent jouer le rôle d'organe piège pour le Cd afin de limiter les effets destructeurs du métal dans les feuilles.

L'excédent de Cd a provoqué aussi une diminution de la teneur en chlorophylle b, des perturbations de l'absorption de l'eau (dans les racines) et des troubles touchant l'alimentation en certains éléments minéraux (calcium, fer et zinc).

A l'échelle cellulaire, nous proposons un schéma hypothétique (**Figure 62**) qui pourrait résumer les diverses perturbations survenues dans les cellules de plantules de fève traitées par le Cd. (1) Une fois absorbés, les ions cadmiques semblent être immobilisés par la paroi cellulaire pour empêcher leur pénétration dans la cellule (**Vecchia et al., 2005**). (2) Le Cd pourrait être à l'origine de la stimulation de la NADPH oxydase située au niveau de la membrane plasmique. L'augmentation de l'activité de cette enzyme pourrait être à l'origine de la production importante d'espèces réactives d'oxygène (ROS) observée dans les racines et les feuilles de fève. En effet, la NADPH oxydase stimule la production de $O_2^{\cdot-}$ qui est converti spontanément ou par la superoxyde dismutase en H_2O_2 (**Mithöfer et al., 2004**). (3) Les ROS sont nocifs pour la cellule et leur présence au niveau de la membrane plasmique pourrait provoquer une oxydation des acides gras polyinsaturés d'où la lipoperoxydation membranaire observée uniquement au niveau des racines de fèves traitées par le Cd. (4) D'après nos résultats, la lipoperoxydation pourrait, aussi, avoir comme origine une activation de la lipoxigénase. (5) Les ROS accumulés, particulièrement le H_2O_2 , semblent avoir une action indirecte de renforcement de la paroi cellulaire. En effet, cette molécule intervient dans la polymérisation des monomères de lignine catalysée par les peroxydases (**De Jaegher, 1986**).

L'altération de la membrane plasmique semble entraîner une perturbation de la perméabilité membranaire et de l'équilibre ionique. (6) Les ions cadmiques pourraient pénétrer à l'intérieur de la cellule à travers les canaux Ca^{2+} membranaires. Leur présence, dans le cytoplasme, semble augmenter la synthèse de molécules chélatrices telles que les phytochélatines et les métallothionéines. (7) La synthèse de phytochélatine est catalysée par une phytochélatine synthase en présence de glutathion réduit. (8) L'augmentation de métallothionéines semble être due à une stimulation des gènes codant pour ces protéines notamment le gène *MT2*. (9) l'accumulation des phytochélatines et les métallothionéines permet une séquestration vacuolaire des ions cadmiques dans le but de diminuer leur concentration dans le cytoplasme.

Les plantules de fève semblent développer des systèmes de défense visant à réagir aux changements de leur milieu environnant. Ces systèmes luttent contre les espèces réactives indésirables en évitant leur accumulation. Ces systèmes de détoxification font intervenir des mécanismes enzymatiques et d'autres non-enzymatiques. (10) Les systèmes enzymatiques font appel à la superoxyde dismutase, la gaïacol peroxydase, la catalase et les enzymes du cycle ascorbate-glutathion. Les systèmes non-enzymatiques font intervenir l'ascorbate (11), le glutathion réduit (12) et les composés phénoliques (13). (14) L'accumulation des composés phénoliques dans les plantules de fève traitées par le Cd semble intervenir aussi dans l'augmentation de la rigidité de la paroi cellulaire (Van Tunen et Mol, 1991; Booker et al., 1996, Quiroga, 2000).

Au niveau du noyau cellulaire, nous avons montré que le Cd pourrait engendrer une diminution de l'indice mitotique (15) et une apparition d'anomalies chromosomiques touchant la structure et le nombre de chromosomes dans les méristèmes racinaires de fève (16). L'effet génotoxique de Cd pourrait être direct ou indirect à travers l'action des ROS. Dans les racines, les ROS semblent jouer un rôle de messenger secondaire qui entraîne la surexpression de certains gènes liés au stress métallique. En effet, nous avons montré que des fortes concentrations de Cd, particulièrement $200\mu\text{M}$, entraînent une accumulation des transcrits codant pour une protéine de stress (*hsp70.1*) (17), une protéine de chélation des ions cadmiques (*MT2*) (18) et des protéines codant pour des enzymes antioxydantes (*Cu-Zn SODcy*, *Cat* et *GR*) (19).

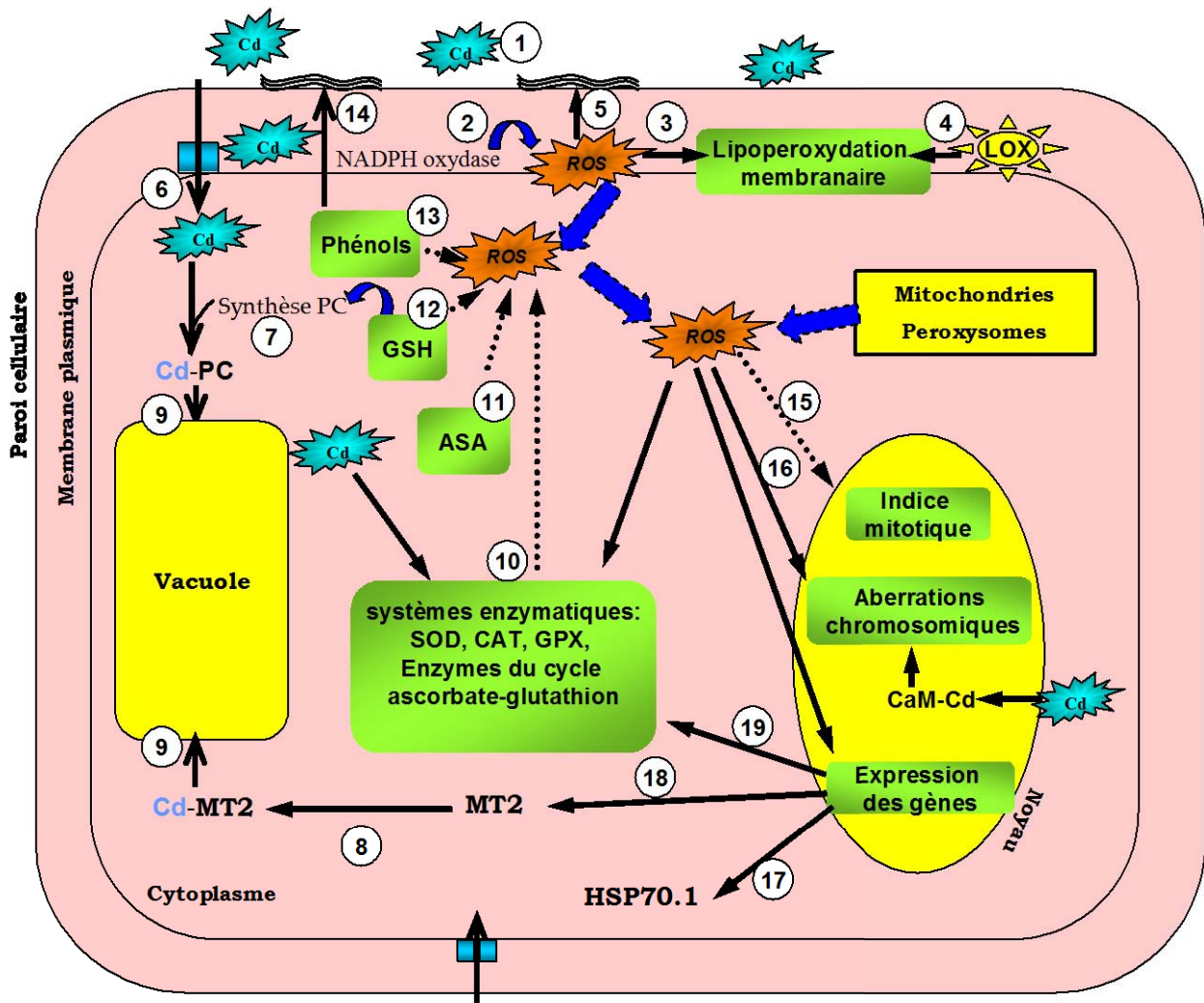


Figure 62: Schéma hypothétique décrivant les manifestations cellulaires probables survenues dans les racines de plantules de fèves suite à un traitement par la Cd. (—> Stimulation;> Inhibition).

Toutes ces manifestations cellulaires peuvent contribuer d'une manière directe ou indirecte à la diminution de la croissance observée chez les plantules traitées par 50, 100 et 200 μ M de Cd.

A la lumière de l'ensemble des résultats que nous avons présentés, il semble que la réponse des plantules de fèves au stress causé par le Cd est très complexe. Il serait intéressant d'étudier l'expression de nos gènes d'intérêt dans un intervalle de temps inférieur à 12 h. Cette étude pourra être approfondie par la détermination des gènes spécifiques dont la surexpression ou l'inhibition sont propres au stress cadmique.

Références Bibliographiques

- Abdes, F. B., Dunn, L. J., Callman, A., Dinterman, R. E., Schmidt, J. (1988) Induction of 33-kD peroxidases during ethylene-induced senescence of cucumber cotyledons. *Plant Physiol.* 87; 609-615.
- Aebi, H. (1984) Catalase *in vitro*. *Method. Enzymol.* 105 ; 121-126.
- Agarwal, K., Sharma, A., Talukder, G. (1987) Copper toxicity in plant cellular systems. *Nucleus* 30; 131-158.
- Agarwala, S. C., Bisht, S. S., Sharma, C. P. (1977) Relative effectiveness of certain heavy metal in producing toxicity and symptoms of iron deficiency in barley. *Can. J. Bot.* 55; 1299-1307.
- Ahlberg, J., Ramel, C., Wachtmeister, C. A. (1972) Organolead compounds shown to be genetically active. *Ambio.* 1; 29.
- Aina, R., Labra, M., Fumagalli, P., Vannini, C., Marsoni, M. (2007) Thiol-peptide level and proteomic changes in response to cadmium toxicity in *Oryza sativa* L. roots. In Lin, R., Wang, X., Luo, Y., Du, W., Guo, H., Yin, D. (2007) Effects of soil cadmium on growth, oxidative stress and antioxidant system in wheat seedlings (*Triticum aestivum* L.). *Chemosphere* 69; 89-98.
- Albert, F., Anderson. A. J. (1987) The effect of *Pseudomonas putida* colonisation on root surface peroxidase. *Plant Physiol.* 85; 537-541.
- Albrecht, G., Wiedenroth, E. M. (1994) Protection against activated oxygen following re-aeration of hypoxically pre-treated wheat roots. The response of the glutathione system. *J. Exp. Bot.* 45; 449-445.
- Ali, M.B., Hahn, E-J., Paek, K-Y. (2006) Antioxidative responses of *Echinacea angustifolia* cultured roots to different levels of CO₂ in bioreactor liquid cultures. *Enzyme and Microbial Technology* 39 ; 982-990.
- Alvarez-Moya, C., Santerre-Lucas, A., Zuniga-Gonzalez, G., Torret Bugarin, O., Padilla-Camberos, E., Feria-Velasco, A. (2001) Evaluation of genotoxicity activity of maleic hydrazide, ethyl methane sulphonate and N-nitroso diethyl amine in *Tradescantia* using the comet assay. *Salud Publica Mex.* 43; 6-12.
- Anderson, M. E. (1985) Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. *Method. Enzymol.* 113; 548-554.
- Anderson, O. (1986) Evaluation of spindle inhibiting effects of metals on chromosome length measurement. *Toxicological and Environmental Chemistry* 12; 195-213.
- Aravind, P., Prasad, M. N. V. (2003) Zinc alleviates cadmium-induced oxidative stress in *Ceratophyllum demersum* L.: a free floating freshwater macrophyte. *Plant Physiol. Biochem.* 41; 391-397.
- Aravind, P., Prasad, M. N. V. (2005) Modulation of cadmium-induced oxidative stress in *Ceratophyllum demersum* by zinc involves ascorbate-glutathione cycle and glutathione metabolism. *Plant Physiol. Biochem.* 43 ; 107-116.
- Arnon, D.I. (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts. *Plant. Physiol.* 24; 1-15.
- Asada, K., Kiso, K., Yoshikawa, K. (1974) Univalent reduction on molecular oxygen by spinach chloroplasts on illumination. *J. Bio. Chem.* 249; 2175-2181.
- Asada, K., Takahashi (1987) Production and scavenging of active in photosynthesis. In D.J. Kyle, C.B. Osmond, C.J. Arntzen, eds, *Ohotoinhibition (Topics in Tphotosynthesis, vol 9)*, Elsevier, Amesterdam, pp. 227-287.
- Axerold, B., Chesbrough, T. M., Laakso, S. (1981) Lipoxygenase from soybean. In: Lowenstein JM, editor. *Methods Enzymology*. New York: Academic press. 441-451.
- Baccouche, S. (2001) Etude de la contribution des enzymes antioxydantes dans le processus de détoxification de métaux lourds (Ni, Cd) chez le maïs et le tournesol. Thèse de Doctorat en physiologie Végétale ; Faculté des Sciences de Bizerte, p 229.
- Baccouche, S., Chaoui, A., El Ferjani, E. (1998) Nickel induced oxidative damage and antioxidant reponses in *Zea mays* shoots. *Plant Physiol. Biochem.* 36; 689-694.
-

- Baker, A. J. M. (1987)** Metal Tolerance. *New Phytol.* 106; 93-111.
- Baker, C. J., Mock, N. M. (1994)** An improved method for monitoring cell death in a cell suspension and leaf disk assays using Evans blue. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 39; 7-12.
- Barcelo, J., Vazquez, M. D., Poschenrieder, C. H. (1989)** Cadmium-induced structural and ultrastructural changes in the vascular system of bush bean stems. *Bot. Acta* 101; 254-261.
- Barcelo, J., Poschenrieder, C. H. (1990)** Plant water relations as affected by heavy metal stress. *J. Plant Nutr.* 13; 1-37.
- Baszinsky, T., Wajda, I., Krol, M., Wolinska, D., Krupa, Z., Tukendorf, A. (1980)** Photosynthetic activities of cadmium-treated tomato plants. *Physiol. Plantarum.* 48; 365-370.
- Bauer, R., Demeter, I., Hasemann, V., Johansen, J. T. (1980)** Structural properties of the zinc site in Cu, Zn-superoxide dismutase; perturbed angular correlation of gamma ray spectroscopy on the Cu, ¹¹¹Cd-superoxide dismutase derivative. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 94; 1296-1302.
- Bazzaz, F. A., Rolfe, G. L., Carlson, R. W. (1992)** Effect of cadmium on photosynthesis and transpiration of excised leaves of corn and sunflower. *Physiol. Plantarum* 32; 373-377.
- Ben Youssef, N., Nouairi, I., Ben Temime, S., Taamalli, W., Ghorbal, M. H., Zarrouk, M., Ben Miled Daoud, D. (2005)** Effets du cadmium sur le métabolisme des lipides de plantules de colza (*Brassica napus* L.). *C. R. Biol.* 328 ; 745-757.
- Béraud, E., Cotellet, S., Leroy, P., Féraud, J-F. (2007)** Genotoxic effects and induction of phytochélatins in the présence of cadmium in *Vicia faba* roots. *Mut. Res.* 633; 112-116.
- Betti, C., Barale, R., Pool-Zobel, B. B. (1993)** Comparative studies and cytotoxic and genotoxic effects of two organic mercury compounds in lymphocytes and gastric mucosa cells of Sprague-Dawley rats. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 22; 172-180.
- Beyersmann, D., Hechtenberg, S. (1997)** Cadmium, gene regulation, and cellular signaling in mammalian cells. In Lin, R., Wang, X., Luo, Y., Du, W., Guo, H., Yin, D. (2007) Effects of soil cadmium on growth, oxidative stress and antioxidant system in wheat seedlings (*Triticum aestivum* L.). *Chemosphere* 69; 89-98.
- Blasiak, J. and Kowalik, J. (2000)** A comparison of the *in vitro* genotoxicity of tri and hexavalent chromium. *Mut. Res.* 469; 135-145.
- Bolwell, G. P., Bindschedler, L. V., Blee, K. A., Butt, V. S., Davies, D. R., Gerdner, S. L., Gerrish, C., Minibayeva, F. (2002)** The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a three-component system. *J. Exp. Bot.* 53, 1367-1376.
- Booker, F., Antonnen, S., Heagle, A. S. (1996)** Catechin, and lignin contents of loblolly pine (*Pinus taeda* L.) needles after chronic exposure to ozone. *New Phytol.* 132; 438-492.
- Borboa, L., De la Torre, C. (1996)** The genotoxicity of Zn (II) and Cd (II) in *Allium cepa* root meristematic cells. *New Phytol.* 134; 481-486.
- Bouazizi, H. (2008)** Modifications biochimiques et structurales induites par le stress cuprique au niveau des parois cellulaires du haricot vert (*Phaseolus vulgaris* L.) (Thèse de Doctorat). Faculté des Sciences de Bizerte.
- Bouazizi, H., Jouili, H., El Ferjani, E. (2007)** Copper-induced oxidative stress in maize shoots (*Zea mays* L.): H₂O₂ accumulation and peroxidases modulation. *Acta Biol. Hun.* 58 (2); 209-218.
- Bouazizi, H., Jouili, H., Geitmann, A., El Ferjani, E. (2008)** Effect of copper excess on H₂O₂ accumulation and peroxidase activities in bean roots. *Acta Biol. Hun.* 59(2); 233-245.
- Boussama, N., Ouariti, O., Ghorbel, M. H. (1996)** Accumulation du cadmium et du cuivre et influence sur l'activité nitrate réductase chez le maïs (*Zea mays* L.). *C.R. Soc. Biol. (France)* 190 ; 581-593.
- Bradford, M. M. (1976)** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72. 248-254.

- Breckle, S. W. (1991)** Growth under stress: heavy metals, plant roots: the hidden half, Waisel, Y. and Kakafi, U. (Eds.), New York: Marcel Dekker; 351-373.
- Briat, J-F., Lebrun, M. (1999)** Plant responses to metal toxicity. *Plant biology and pathology* 322; 43-54.
- Bruns, I., Sutter, K., Menge, S., Neumann, D., Krauss, G. J. (2001)** Cadmium lets increase the glutathione pool in bryophytes. *J. Plant Physiol.* 158; 79-89.
- Buege, J.A., Aust, S. D. (1978)** Microsomal lipid peroxidation. *Method. Enzymol.* 52; 302-310.
- Burel, C., Mezger, V., Pinto, M., Raullu M., Trigon S., Morange, M. (1992)** Mammalian heat shock protein families. Expression and functions. *Experientia*, 48; 629-634.
- Burzynski, M., Grabowski, A. (1984)** Influence of lead on NO₃⁻ uptake and reduction in cucumber seedlings. *Acta Soc. Bot. Polon* 53; 77-86.
- Cabrea, C., Ortega, E., Gallego, C., Lopez, M.C., Lorenzo, M.L., Assensio, C. (1994)** Cadmium concentration in farmlands in southern Spain: possible sources of contamination. *Sci. Total Environ* 153; 261-265.
- Cadet, J., Bellon, S., Berger M., Bourdat, A.G., Douki, T., Duarte, V., Frelon, S., Gasparutto, D., Muller, E., Ravanat, J. L., Sauvaigo, S. (2002)** Recent aspects of oxidative DNA damage: guanine lesions, measurement and substrate specificity of DNA repair glycosylases. *Biol. Chem.* 383(6); 93.
- Cakmak, I. (2000)** Possible roles of zinc in protecting plant cells from damage by reactive oxygen species. *New Phytol.* 146; 185-205.
- Castillo, J. F., Greppin, H. (1988)** Extracellular ascorbic acid and enzyme activities related to ascorbic acid metabolism in *Sedum album* 1. leaves after ozone exposure. *Environ. Exp. Bot.* 28; 231 -238.
- Çelik, A., Ünyayar, S., Özlem Çekiç, F., Güzel, A. (2008)** Micronucleus frequency and lipid peroxidation in *Allium sativum* root tip cells treated with gibberellic acid and cadmium. *Cell Biol Toxicol.* 24; 159-164.
- Chaiffi, R. (2003)** Phytotoxicité de l'aluminium, du cuivre et du cadmium chez le maïs (*Zea mays* L.) : effet sur le métabolisme lipidique, détoxification par les acides organiques. Thèse de Doctorat en physiologie Végétale ; Faculté des Sciences de Bizerte, p 162.
- Chaoui, A., Mazhoudi, S., Ghorbal, M. H., El Ferjani. (1997)** Cadmium and Zinc induction of lipid peroxidation and effects on antioxidant enzyme activities in bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Sci.* 127; 139-147.
- Chen, G-X., Asada, K. (1989)** Ascorbate peroxidase in tea leaves: occurrence of two isozymes and the differences in their enzymatic and molecular properties. *Plant Cell Physiol.* 30; 987-998.
- Cho, U. H., Seo, N. H. (2005)** Oxidative stress in *Arabidopsis thaliana* exposed to cadmium is due to hydrogen peroxide accumulation. In Lin, R., Wang, X., Luo, Y., Du, W., Guo, H., Yin, D. (2007) Effects of soil cadmium on growth, oxidative stress and antioxidant system in wheat seedlings (*Triticum aestivum* L.). *Chemosphere* 69; 89-98.
- Chueng, W. D. (Ed) (1980-1983)** Calcium and cell function. Academic. Press. London New York.
- Clain, E., Daysson, G. (1997)** Cytotoxicité du cadmium: Etude sur les meristemes radiculaires d'*Allium sativum* L. ; In Seregin I. V. and Ivanov V. B. Physiological aspects of cadmium and lead. Toxic effects on higher plants. *Russ. J. Plant Physiol.* 48 (4), (2001); 523-544.
- Clarkson, D. T., Luttge, U. (1989).** Mineral nutrition . Divalent cations. Transport and compartmentalization. *Progr. Bot.* 51; 93-112.
- Clemens, S. (2001)** Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. *Planta* 212; 475-486.
- Coi, H. R., Hwang, I. D., Lee, S. H., Kwon, Y. M. (1996)** Phytochelatins in Cadmium Treated Seedlings of *Canavalia lineat.* *Mol. Cells.* 6; 451-455.

- Constantin, M. J., Nilan, R. A. (1982)** Chromosomes aberrations assays with assays in barley (*Hordeum vulgare*), A report of the US Environmental Protection Agency Gene-Tox-Program. Mut. Res. 99; 1-12.
- Cornforth, M., Goodwin, E. (1991)** Transmission-induced centric chromosomal fragments to micronuclei in normal human fibroblasts. Radiat. Res. 126; 210-217.
- Cutler, J. M., Rains, D. W. (1974)** Characterization of cadmium uptake by plant tissue. Plant Physiol. 54; 67-71.
- Dat, J., Vandenabeele, S. V., Vranova, E., Van Montagu, M., Inze, D., Van Breusegem, F. (2000)** Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. Cell Mol. Life Sci. 57; 779-795.
- De Jaegher, G. (1986)** la thigmomorphogénèse de la bryone, lignification et métabolisme de l'éthylène. Thèse de Doctorat. Université de Clermont ferrand II, U.F.R de recherche scientifique et technique, p195.
- De Knecht, J. A., Van Dillen, M., Koevoets, P. L. M., Schat, H., Verkleij, J. A. C., Ernst, W. H. O. (1994)** Phytochelatine in cadmium sensitive and cadmium-tolerant *Silene vulgaris*. Chain length distribution and sulfide incorporation. Plant Physiol. 104; 255-261.
- De Marco, A., Boccardi, C., De Simone, A., Piccolo, M., Raglione, M., Testa, A., Trinca, S. (1990)** Induction of micronuclei in *Vicia faba* root tip treated in different soils with the herbicide alachlor. Mut. Res. 241; 1-6.
- De Marco, A., De Simone, C., Raglione, M., Lorenzoni, P. (1995)** Influence of Soil characteristic on the clastogenic Effect of maleic Hydrazide in root tips of *Vicia faba*. Mut. Res. 344; 5-12.
- Degrassi, F., Rizzoni, M. (1982)** Micronucleus test in *Vicia faba* root tips to detect mutagen damage in fresh water pollution. Mut. Res. 97; 19-33.
- Dekergommeaux, D. J., Grant, W. F. S., Sadhu, S. (1983)** Clastogenic and physiological response of chromosomes to nine pesticides in the *Vicia faba in vivo* root tip assay system. Mut. Res. 124; 69-84.
- Del campo, A., Coletto, R. (1998)** Capacidad genotóxica de la hidracida Malpica (MH) detectada por intercambio de la cromátidas hermanas SCE) y por otros bioensayos en *Allium cepa*. Ciencia 6; 7-21.
- Dixit, V., Pandey, V., Shyam, R. (2001)** Differential oxidative responses to cadmium in roots and leaves of pea (*Pisum sativum* L. Cv. Azad). J. Exp. Bot. 52; 1101-1109.
- Djebali, W., Chaibi, W., Ghorbel, M. H. (2002)** Croissance, activité peroxydasique et modifications ultrastructurales induites par le cadmium dans la racine de tomate. Can. J. Bot. 80 ; 942-953.
- Doke, N. (1997)** The oxidative burst: role in signal transduction and plant stress. In: Scandalios JG, ed. Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses. Cold Spring Harbour: Cold Spring Harbour Laboratory Press, 785-813.
- Doulis, A. G., Debian, N., Kingston-Smith, A. H., Foyer, C. H. (1997)** Differential localization of antioxidants in maize. Plant Physiol. 114;1031-1037.
- Drażkiewicz, M., Skórzynska-Polit, E., Krupa, Z. (2007)** The redox state and activity of superoxide dismutase classes in *Arabidopsis thaliana* under cadmium or copper stress. Chemosphere 67;188-193.
- Dudka, S., Miller, W. P. (1999)** Accumulation of potential toxic elements in plants and their transfer in human food chain. J. Environ. Sci. Heal. 34.
- Edwards, E.A., Enard, C., Creissen, G.P. Mullineaux, P.M. (1994)** Synthesis and properties of glutathione reductase in stressed peas. In Yannarelli, G.G. ed. Glutathione reductase activity and isoforms in leaves and roots of wheat plants subjected to cadmium stress. Phytochemistry (in press).
- El Alami, A. (1997)** Contribution à la compréhension du comportement de la tomate cultivée en présence de cadmium par l'étude des paramètres physiologiques et biochimiques. Thèse

de Doctorat en Sciences Biologiques (Physiologie Végétale). Faculté des Sciences de Tunis, 242p.

Elftheriou, E. P., Krataglis, S. (1989) Ultrastructural and morphological characteristics of cultivated wheat growing on copper polluted fields. Bot. Acta 102; 134-140.

Ellman, G. L. (1959) Tissue sulfhydryl groups. Arch. Biochem. Biophys. 82; 70-77.

Elloumi, N., Ben Abdallah, F., Rhouma, A., Ben Rwina, B., Mezghani, I., Boukhris, M. (2007) Cadmium-induced growth inhibition and alteration of biochemical parameters in almond seedlings grown in solution culture. Acta Physiol. Plant 29; 57-62.

Ercal, N., Gurer-Orhan, H., Aykin-Burns, N. (2001) Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal-induced oxidative damage. Curr. Top. Med. Chem. 1; 529-539.

Ernst, W. H.O. (1999) Effects of Heavy Metals in Plants at the Cellular and Organismic Level. Ecotoxicology. Ecological Fundamentals, Chemical Exposure and Biological Effects, Schuurmann, G. and Markert, B., Eds., Heidelberg: Wiley and Sons; 587-620.

Evans, H. J. (1976) Cytological Methods for Detecting Chemical Mutagens, in: Chemical mutagens, Principles and Methods for their Detection, Vol.4, Hollaender, A. (ed) Plenum Press, New York and London; 1-29.

Fairbairn D, Olive P, O Neill K. (1995) The comet assay: A comprehensive review. Mut. Res. 339; 7-59.

Favier, A. (2003) Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. L'actualité chimique, novembre-décembre 2003. 108-115.

Feige, U., Morimoto, R. I., Yahara, I., Polla, B.S. (1996) Stress-inducible cellular responses. Basel, 492p.

Fenik, S.I., Trofimyak, T.B., Blyum, Y. B. (1995) Development of plant tolerance to heavy metals. Usp. Sovrem. Biol. 115; 261-275.

Fielding, J. L., Hall, J. L. (1978) A biochemical and cytochemical study of peroxidase activity in roots of *Pisum sativum*. J. Exp. Bot. 29; 979-986.

Finkemeier, I., Kluge, C., Metwally, A., Georgi, M., Grotjohann, N., Dietz, K-J. (2003) Alteration in Cd-induced gene expression under nitrogen deficiency in *Hordeum vulgare*. Plant Cell Environ 26; 821-833.

Fiskesjo, G. (1979) Mercury and selenium in a modified *Allium* test. Hereditas 9; 169-178.

Fiskesjo, G. (1988) *Allium* test-an alternative in environmental studies: The relative toxicity of metal ions. Mut. Res. 197; 243-260.

Fiskesjo, G. (1997) *Allium* for screening chemicals; evaluation of cytological parameters, in W.Wang, J.W. Grosush and J. S. Hughes (eds) Plant for Environmental Studies, Lewis CRC Publishers, Boca Raton, FL; 309-333.

Foraman, J., Demidchik, V., Bothwell, J. H. L., Mylona, P., Miedema, H., Torres, M. A., Linstead, P., Costa, S., Brownelee, C., Jones, J. D. G., Davies, J. M., Dolan, L. (2003) Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. Nature 422; 442-446.

Fornazier, R. F., Ferreira, R. R., Pereira, G. J. G., Molina, S. M. G., Smith, R. J., Lea, P. J., Azevedo, R. A. (2002) Cadmium stress in sugar cane callus cultures : effect on antioxidant enzymes. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 71 ; 125-131.

Foyer, C.H., Lopez-Delgado, H., Dat, J.F., Scott, I. M. (1997) Hydrogen peroxide and glutathione associated mechanism of acclamatory stress tolerance and signaling. In Lin, R., Wang, X., Luo, Y., Du, W., Guo, H., Yin, D. (2007) Effects of soil cadmium on growth, oxidative stress and antioxidant system in wheat seedlings (*Triticum aestivum* L.). Chemosphere 69; 89-98.

- Freeman, L., Borrelli, M. J., Syed, K., Senisterra G., Stafford, D. M., Lepock, J. R. (1995) Characterization of a signal generated by oxidation of protein thiols that activates the heat shock transcription factor. *J. Cell Physiol.* 164; 356-366.
- Frenzilli, G., Bosco, E., Berale, R. (2000) Validation of single cell gel assay in human leukocytes with 18 reference compounds? *Mut. Res.* 468; 93-108.
- Fryer, M. J. (1992) The antioxidant effects of thylakoid vitamin E (atocopherol). *Plant Cell Environ.* 15; 381-392.
- Gallego, S.M., Benavides, M.P., Tomaro, M. L. (1996) Effect of heavy metal ion excess on sunflower leaves: evidence for involvement of oxidative stress. *Plant Sci.* 121;151-159.
- Galloway, S. M., Amestrong, M. J., Reuben, C., Colman, S., Brown, B., Cannon, C., Bloom, A. D., Nakamura, F., Ahmed, M., Duk, S., Rimpo, J., Margolin, G. H., Resnick, M. A., Andersen, G., Zeiger, E. (1978) Chromosome aberration and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals. *Environ. Mol. Mutagen.* 10; 1-175.
- Ganeva, G., Zozikova, E. (2007) Effect of increasing concentrations on growth and content of free phenols in two lines of wheat (*Triticum aestivum*) with different tolerance. *Gen. Appl. Plant Physiol.* 33 (1-2); 75-82.
- Garnier, L., Simon-Plas, F., Thuleau, P., Agnel, J.P., Blein, J. P., Ranjeva, R., Montillet, J. L. (2006) Cadmium affects tobacco cells by series of three waves of reactive oxygen species that contribute to cytotoxicity. *Plant. Cell Environ.* 29; 1956-1969.
- Gaulden, M. E. (1987) Hypothesis: some mutagens directly alter specific chromosomal proteins (DNA topoisomérase II and peripheral proteins) to produce chromosomal aberrations. *Mut. Res.* 2; 357-365.
- Gichner, T. (2003) Differential genotoxicity of ethyl methanesulphonate, N-Ethyl-N-nitrosourea and maleic hydrazide in tobacco seedlings based on data on the comet assay and two recombination assays. *Mut. Res.* 538; 171-179.
- Gichner, T., Patkova, Z., Szakova, J., Demnerova, K. (2004) Cadmium induces DNA damage in tobacco roots, but no DNA damage, somatic mutations or homologous recombination in tobacco leaves. *Mut. Res.* 559; 49-57.
- Girotti, A.W. (1985) Mechanisms of lipid peroxidation, *J.Free. Med* 1; 87-95.
- Godzik, B. (1993) Heavy metals content in plants from zinc dumps and reference areas. *Polish bot. Stud.* 5; 113-132.
- Gomes-Junior, R. A., Moldes, C. A., Delite, F.S., Pompeu, G. B., Gratão, P. L., Mazzafera, P., Lea, P. J., Azevedo, R. A. (2006) Antioxidant metabolism of coffee cell suspension cultures in response to cadmium. *Chemosphere* 65; 1330-1337.
- Grant, W. F. (1982) Plant mutagen assays based upon chromosome mutations; in; E.J. Klekowskijr. (ed.) *Environmental Mutagenesis, Carcinogenesis and Plant Biol.* 2 Praeger, New York; 1-24.
- Grant, W. F. (1993) Plants as detectors of atmospheric mutagens, in: M. Corn (Ed.), *Handbook of hazardous materials*, Academic Press, San Diego, CA; pp 591-609.
- Grant, W. F., Owens, E-T. (1998) Chromosome aberration assays in *Crepis* for study of Environmental mutagens. *Mut. Res.* 410; 291-307.
- Greger, M., Lindberg, S. (1987) Effects of Cd²⁺ and EDTA on young sugar beets (*Beta vulgaris*). II-Net uptake and distribution of Mg²⁺, Ca²⁺, and Fe²⁺/Fe³⁺. *Physiol. Plant* 69; 81-86.
- Grill, E., Loeffler, S., Winnacker, E-L., Zenk, M. H. (1989) Phytochelatin, the heavy metal-binding peptides of plants, are synthesized from glutathione by a specific γ -glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase (Phytochelatin synthase) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 86 ; 6838-6842.
- Gupta, B., Mukherji, S. (1977) Effects of toxic concentrations of copper on growth and metabolism of rice seedlings. *Z. Pflanzenphysiol.* 82; 95-106.
-

- Haag-Kerwer, A., Schafer, H. J., Heiss, S., Walter, C., Rausch, T. (1999)** Cadmium exposure in *Brassica juncea* causes a decline in transpiration rate and leaf expansion without effect on photosynthesis. *J. Exp. Bot.* 50; 1827-1835.
- Haliwell, B., Gutteridge, J. M. C. (1986)** Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine : some problems and concepts. *Arch. Biochem. Biophys.* 246; 501-514.
- Harmens, H., Den Hartog, P. R., Ten Bookum, W.M., Verkkleig, J. A. C. (1993)** Increased zinc tolerance in *Silene Vulgaris* (Moench) Garcke is not due to increased production in phytochelatins. *Plant Physiol.* 141; 309-315.
- Hart, J. J., Welch, R. M., Norvell, U., Sullivann L. A., Kochian, L. V. (1998)** Characterization of cadmium binding, uptake and translocation in intact seedling of bread and durum wheat cultivars. *Plant physiol.* 116; 1413-1420.
- Hartmann, A., Speit, G. (1994)** Comparative investigation of the genotoxic effect of metals in single cell (SSG) assay and the sister chromatid exchange (SCE) test. *Environ. Mol. Mutagen.* 23; 299-305.
- Hartwig, A. (1998)** Carcinogenicity of metals compounds: possible role of DNA repair inhibition. In Mouchet , F. Eds. Genotoxic and stress inductive potentiel of cadmium in *Xenopus laevis* larvae. *Aquatic Toxicol.* 78; 157-166.
- Heath, R. L., Packer, L. (1968)** Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch. Bioophys.* 125; 189-198.
- Hegedüs, A., Erdei, S., Horvath, G. (2001)** Comparative studies of H₂O₂ detoxifying enzymes in green and greening barley seedlings under cadmium stress. *Plant Sci.* 160; 1085-1093.
- Heid C; A., Stevens, J., Livak, K. J., Williams, P. M. (1996)** Real time quantitative PCR. *Genome Res.* 6; 986-994.
- Helma, C., Knasmüller, S., Schulte-Hermann, R. (1994)** Die Belastung von Wassern genotoxischen Substanzen, Umweltwissenschaften und Schadstofforschung 6; 277-288.
- Hernandez, J. A., Olmos, E., Corpas, J. F., Sevilla, F., del Rio, L. A. (1995)** Salt-induced oxidative stress in chloroplasts of pea plants. *Plant Sci.* 105; 151-167.
- Hernandez, I.E., Garate and Carpenarui, R. (1997)** Effects of cadmium on the uptake distribution and assimilation of nitrate in *Pisum sativum*, *Plant Soil* 189; 97-106
- Hernandez, L. E., Lozano-Rodríguez, E., Carate, A., Carpeno-Ruiz, R. (1998)** Influence of cadmium on the uptake, tissue accumulation and subcellular distribution of manganese in pea seedlings. *Plant Sci.* 132; 139-151.
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., Watson, R. (1993)** Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Bio/technology* 11; 1026-1030.
- Humphreys, M. O., Nicholls, M. K. (1984)** Relationships between tolerances to heavy metals in *Agrostis capillaris* (A. Tenuis S. Bth). *New Phytol.* 98; 177-190.
- Iannelli, M. A., Pietrini, F., Fiore, L., Petrilli, L., Massacci, A. (2002)** Antioxidant response to cadmium in phragmites australis plants. *Plant Physiol. Bioch.* 40; 977-982.
- Inouhe, M. (2005)** Phytochelatins. *Braz. J. Plant Physiol.* 17 ; 65-78.
- Ishidate, M. J., Sofuni, T. (1985)** The *in Vitro* Chromosomal Aberration test Using Chinese Hamster Lung (CHL) Fibroblast cells in culture, in: *Progress in Mut. Res.* 5. Ashby, J. et al., (eds) Elsevier Science Publishers, Amsterdam-New York-Oxford; 427-432.
- Jacobson, L. (1951)** Maintenance of iron supply in nutrient solution by a signal addition of Ferric-potassium-ethylene-diamine-tetraacetat. *Plant Physiol.* 26; 411-413.
- Janero, D. R. (1990)** Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radical. Biol. Med.* 9; 515-40.
- Jarvis, S. C., Jones, L. H. P., Hopper, M. J. (1991)** Cadmium uptake from solution by plants and its transport from root to shoots. *Plant Soil* 44; 179-191.
-

- Ji, Q., Yang, H., Zhang, X. (1999)** *Vicia* root micronuclei assays on the clastogenicity of water samples from the Kui River near Xuzhou city. People's Republic of China. *Mut. Res.* 426; 133-135.
- Jiang, W., Liu, D., Li, A. (2000)** Effects of Cu²⁺ on root growth; cell division and nucleolus of *Helianthus annuus* L. *Sci. Total Environ.* 256; 59-65.
- Jiménez, A., Hernández, J. A., del Río, L. A., Ros Barceló, A., Sevilla, F. (1997)** Evidence for the presence of the ascorbate-glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea (*Pisum sativum* L.) leaves. *Plant Physiol.* 114; 275-284.
- John, R., Ahmad, P., Gadgil, K., Sharma, S. (2007)** Antioxidative response of *Lemna polyrrhiza* L. to cadmium stress. *J. Environ. Biol.* 28(3); 583-589.
- Jouili, H., El Ferjani, E. (2003)** Changes in antioxidant and lignifying enzyme activities in sunflower roots (*Helianthus annuus* L.) stressed with copper excess. *C. R. Biol.* 326 (7); 639-644.
- Jouili, H., El Ferjani, E. (2004)** Effect of copper excess on superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in sunflower seedlings (*Helianthus annuus* L.). *Acta Physiol. Plantarum* 26 (1); 29-35.
- Jurczuk, M., Brzóska, M., Moniuszko-Jakoniuk, J., Gałazyn-Sidorczuk, M., Kulikowska-Karpińska, E. (2004)** Antioxidant enzymes activity and lipid peroxidation in liver and kidney of rats exposed to cadmium and ethanol. *Food Chem. Toxicol.* 42. 429-438.
- Kanaya, N., Gill, B. S., Grover, I S., Murin, A. Oseicka, R., Sandhu, S. S., Andersson, H. C. (1994)** *Vicia faba* chromosomal aberration assay. *Mut. Res.* 310; 231-248.
- Kappus, H. (1985)** Lipid peroxidation, mechanisms analysis, enzymology and biological relevance. In : H. Sies (Eds), *Oxidative stress*. Academic Press, London, pp 273-310.
- Kay, L. E. Basile, D. V. (1987)** Specific peroxidase isozymes are correlated with organogenesis. *Plant Physiol.* 84; 99-105.
- Kihlman, B. A., Anderson, H. C. (1984)** Root tips of *Vicia faba* for the study of the induction of chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges, in: B.J. kilbey, M.legator, W. Nichols and C. Ramel (eds.), *Handbook of mutagenicity test procedures*, 2nd edn. Elsevir, Amsterdam; 531-554.
- Kihlman, B. A., Komberg, D. (1975)** Sister chromatid exchanges in *Vicia faba* demonstrated by a modified fluorescent plus giesma technique (FPG), *Chromosoma* 51; 1-10.
- Kliebenstein, D. J., Monde, R. A., Last, R. L. (1998)** Superoxide dismutase in *Arabidopsis*: an eclectic enzyme family with disparate regulation and protein localization. *Plant Physiol.* 118; 637-650.
- Knasmuller, S., Gottaman, E., Steinkellner, H., Formin, A., Pickel, C., Paschke, A., God, R., Kundi, M. (1998)** Detection of genotoxicity effects of heavy metal contaminated soils with plant bioassays. *Mut. Res.* 420; 37-48.
- Knecht, J. A., Van Dillen, M., Koevoets, P. L. M, Schat, H., Verkleij, J. A. C., Ernst, W. H. O. (1994)** Phytochelatin in cadmium sensitive and cadmium-tolerant *Silene vulgaris*. Chain length distribution and sulfide incorporation. *Plant Physiol.* 104; 255-261.
- Knözer, O. C., Durner, J., Böger, P. (1996)** Alterations in the antioxidative system of suspension-cultured soybean cells (*Glycine max*) induced by oxidative stress. *Plant Physiol.* 97; 388-396.
- Koppen, G., Verschaeve, L. (1996)** The alkaline Comet test on plant cells an genotoxicity test for DNA strand breaks in *Vicia faba* root cells . *Mut. Res.* 360; 193-200.
- Kovalchuk, O., Titov, V., Hohn, B., Kovalchuck, I. (2001)** A Sensitive transgenic plant system to detect toxic inorganic compounds in the environment. *Nature Biotechnol.* 19; 568 - 572
- Kurepa, J., Van Montagu, M., Inzé, D. (1997)** Expression of *sodCp* and *sodB* genes in *Nicotiana tabacum*: effects of light and copper excess. *J. Exp. Bot.* 48; 2007-2014.

- Lamb, C., Dixon, R. A. (1997) The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48; 251-271.
- Lane, S. D. and Martin, E. S. (1982) An ultrastructural examination of lead localization in germinating seeds of *Raphanus sativus*. *Z. Pflanzenphysiol.* 107; 33-40.
- Latt, S. A., Allen, J., Bloom, S. E., Carrano, A., Falke, E., Kram, D., Schneider, E., Schreck, R., Tice, R., Whitefield, B. And Wolff, S. (1981) Sister chromatid exchange: second report of the Gene-tox Program. *Mut. Res.* 87; 17-62.
- Lee, J., Shim, D., Hwang, I., Lee, Y. (2004) *Arabidopsis* metallothioneins 2a and 3 enhance resistance to cadmium when expressed in *Vicia faba* guard cells. *Plant Mol. Biol.* 54; 805-815.
- Lefèvre, G., Beljean-Leymarie, M., Beyerle, F., Bonnefont-Rousselot, D., Cristol, J.-P., Théron, P., Torreilles, J. (1998) Evaluation de la peroxydation lipidique par le dosage des substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique. *Annales de Biologie Clinique* 56 (3) ; 305-319.
- Leita, L., Contin, M., Maggioni, A. (1991) Distribution of cadmium and induced Cd-binding proteins in roots, stems and leaves of *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Sci.* 77; 139-147.
- Lerda, D. (1992) The effect of lead on *Allium cepa* L.. *Mut. Res.* 281; 89-92.
- Lima, A. I. G., Perira, S. I. A., Figueira, E. M. P., Caldeira, G. C. N., Caldeira, H. D. Q. (2006) Cadmium detoxification in roots of *Pisum sativum* seedlings: relationship between toxicity levels, thiol pool alterations and growth. *Environ. Exp. Bot.* 55; 149-162.
- Lin, R., Wang, W., Luo, Y., Du, W., Guo, H., Yin D. (2007) Effects of soil cadmium on growth, oxidative stress and antioxidant system in wheat seedlings (*Triticum aestivum* L.). *Chemosphere* 69 ; 89-98.
- Liu, D., Jiang, W., Wang, W., Zhai, L. (1995) Evaluation of metal ion on root tip cells by the *Allium* Test. *Israel J. Plant Sci.* 43; 125-133.
- Liu, D., Jiang, W., Gao, X. (2003) Effects of cadmium on root growth, cell division and nucleoli in root tip cells of garlic. *Biol. Plantarum* 47(1); 79-83.
- Liu, Y., Wang, X., Zeng, G., Qu, D., Gu, J., Zhou, M., Chai, L. (2007) Cadmium-induced oxidative stress and response of the ascorbate-glutathione cycle in *Beckmannia nivea* (L.) Gaud. *Chemosphere* 69; 99-107.
- Lützen, A., Liberti, S. E., Rasmussen, L. J. (2004) Cadmium inhibits human DNA mismatch repair *in vivo*. In Mouchet, F. Eds. Genotoxic and stress inductive potential of cadmium in *Xenopus laevis* larvae. *Aquatic Toxicol.* 78; 157-166.
- Ma, T-H. (1982a) *Vicia* cytogenetic tests for Environmental mutagens. A report for the US Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mut. Res.* 99; 257-291.
- Ma, T-H. (1982b) *Tradescantia* micronuclei (Trad-MCN) test for environmental clastogens, in: A. R. Kolber, T. K., Wong, L. D., Grant, R. S. De Woskin and T.J. Hughes (Eds), *in vitro* toxicity testing of environmental agents, Pt. A Plenum. New York; pp.191-214.
- Ma, T-H. (1982c) *Tradescantia* cytogenetic tests (root-tip mitosis, pollen meiosis, pollen mother-cell meiosis). *Mut. Res.* 99; 293-302.
- Ma, T-H., Zhidong, X., Xu, C., McComell, H., Rabago, E.V., Arreola, G. A. and Zhang, H. (1995) The improved *Allium/Vicia* root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants, *Mut. Res.* 334; 185-195.
- Mac Kinney, G. (1941) Absorption of light by chlorophyll solution. *J. Biol. Chem.* 140; 315-322.
- Maksymiec, W. (2007) Signaling responses in plants to heavy metals. *Acta Physiol. Plant* 29; 177-187.
- Maksymiec, W., Krupa, Z. (2006) The effect of short-term exposition to Cd, excess Cu ions and jasmonate on oxidative stress appearing in *Arabidopsis thaliana*. *Environ. Exp. Bot.*, 57; 187-194.

- Marcano, L., Carruyo, I., Del campo, A., Montiel, X. (2000)** Effect of cadmium on the nucleoli of meristematic cells on onion *Allium cepa* L.: An ultrastructural study. Environ. Res. 88; 30-35.
- Marcano, L., Carruyo, M. H., Del campo, A., Montiel, A. (2004)** Cytotoxicity and mode of action of Maleic hydrazide in root tips of *Allium cepa*. Environ. Res. 94; 221-226.
- Mazhoudi, S., Chaoui, A., Ghorbal, M. H., Ferjani, E. E. (1997)** Response of antioxidant enzymes to excess copper in tomato (*Lycopersicon esculentum*, Mill). Plant Sci. 127; 129-137.
- McCord, J. (1985)** Oxygen derived free radicals in post ischemic tissue injury. New Engl. Med. 312; 159-163.
- Means, A. R., Dedman, J. R. (1980)** Calmodulin-an intracellular calcium receptor. Nature 285; 73-77.
- Mehra, R. K., Tripathi, R. D. (2000)** Phytochelatin and metal tolerance, in: Agarwal, S.B., Agarwal, M. (Eds.), Environmental Pollution and Plant Responses. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, USA.
- Mishra, H.P., Fridovich, I. (1972)** The role of superoxide anion in the autooxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. J. Biol. Chem. 247; 3170-3175.
- Mishra, S., Srivastava, S., Tripathi, R. D., Govindarajan, R., Kuriakose, S. V., Prasad, M. N. V. (2006)** Phytochelatin synthesis and response of antioxidants during cadmium stress in *Bacopa monnieri* L.. Plant Physiol. Bioch. 44; 25-37.
- Mithöfer, A., Schulze, B., Boland, W. (2004)** Biotic and heavy metal stress response in plant: evidence for common signal. FEBS letters 566; 1-5.
- Miyake, C., Asada, K. (1992)** Thylakoid-bound ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts and photoreduction of its primary oxidation product monodehydroascorbate radicals in thylakoids. Plant Cell Physiol. 33; 541-553.
- Miyake, C., Cao, W. H., Asada, K. (1993)** Purification and molecular properties of the thylakoid-bound ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts. Plant cell Physiol. 34; 881-889.
- Moran, J. F., James, E. K., Rubio, M. C., Sarath, G., Klucas, R. V., Becana, M. (2003)** Functional characterization and expression of a cytosolic iron-superoxide dismutase from cowpea root nodules. Plant Physiol. 133 ; 773-782.
- Mortvedt, J. J., Mays, D. A., Osborn, G. (1981)** Uptake by wheat of cadmium and other metal contaminants in phosphate fertilizers. J. Environ. Qual 10 (2); 193-197.
- Mouchet, F., Baudrimont, M., Gonzalez, P., Cuenot, Y., Bourdineaud, J. P., Boudou, A., Gauthier, L. (2006)** Genotoxic and stress inductive potential of cadmium in *Xenopus laevis* larvae. Aquatic Toxicol. 78; 157-166.
- Mukherjee, A., Sharma, A. (1986)** Effects of cadmium chloride and sodium selenite on plant chromosomes. Perspective in Cytology and Genetics 5; 325-328.
- Mulla, P. J., Page, A. I., Ganje, T. J. (1980)** Cadmium accumulation and bioavailability in soils from long-term phosphorus fertilization. J. Environ. Qual. 10; 193-197
- Muller, S. L., Huggett, D. B., Rodgers Jr, J. H. (2001)** Effects of sulfate on *Typha latifolia* Seed germination and early Seeding growth in aqueous and sediment exposures. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 40; 192-197.
- Müller-Moulé, P., Havaux, M., Niyogi, K. K. (2003)** Zeaxanthin deficiency enhances the high light sensitivity of an ascorbate-deficient mutant of *Arabidopsis*. Plant Physiol. 133; 748-760.
- Mullins, G., Sommers, L. E. (1986)** Cadmium and zinc influx characteristics by intact corn (*Zea mays*) seedlings. Plant soil 96; 153-164.
- Murphy, A., Zhong, J., Goldsbrough, P. B., Taiz, L. (1997)** Purification and immunological identification of metallothioneins 1 and 2 from *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiol 113; 1293-1301.
- Nakano, Y., Asada, K. (1981)** Spinach chloroplasts scavenge hydrogen peroxide on illumination. Plant Cell Physiol. 21; 1295-1307.

- Navarrete, M. H., Carrera, P., de Miguel, M., De la Torre, C. (1997) A fast comet assay for solid tissue cells. The assessment of DNA damage in higher plants. *Mut. Res.* 389, 271-277.
- Neumann, D., Lichtenberger, O., Gunther, D., Tschiersch, K., Nover, L. (1994) Heat-Shock proteins induce heavy-metal tolerance in higher plants. *Planta* 194; 360-367.
- Neuwly, P., Rauser, W. E. (1992) Alteration of thiol pools in roots and shoots of maize seedlings exposed to cadmium. Adaptation and developmental cost. *Plant Physiol.* 99; 187-196.
- Newcombe, H. B. (1979) Measuring the public health impact of the aneuploids. *Environ. Health Perspect.* 31; 3-8.
- Nguyen, V. T., Morange, M., Bensaude, O. (1989) Protein denaturation during heat shock and related stress. *Escherichia coli* beta-galactosidase and *Photinus pyralis* luciferase inactivation in mouse cells. *J. Biol. Chem.* 264; 10487-10492.
- Nicoloff, H., Gecheff, K. (1976) Methods of scoring induced chromosome structural changes in barley. *Mut. Res.* 34; 233-244.
- Nishizono, H., Kubota, K., Suzuki, S., Ishii, F. (1989) Accumulation of heavy metals in cell walls of *Polygonum cuspidatum* roots from metalliferous habitats. *Plant Cell Physiol.* 30; 595-598.
- Noctor, G., Foyer, C. H. (1998) Ascorbate and glutathione : Keeping active oxygen under control. *Annu Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49; 249-279.
- Obroucheva, N. V., Bystrova, E. I., Ivanov, V. B., Antipova, O. V., Seregin, I. V. (1998) Root growth responses to lead in young maize seedlings. *Plant Soil* 200; 55-61.
- Ortega-Villasante, C., Hernadez, L. E., Rellan-Alvarez, R., Del Campo, F., Carpeno-Ruiz, R. O. (2007) Rapid alteration of cellular redox homeostasis upon exposure to cadmium and mercury in alfalfa seedlings. *New Phytol.* 176; 96-107.
- Ouariti, O., Gouia, H., Ghorbal, M. H. (1997) Responses of bean and tomato Plants to cadmium -growth, mineral nutrition and nitrate reduction. *Plant Physiol. Bio-Chem.* 26; 347-354.
- Ouzounidou, G., Moustakas, M., Eleftherious, E. P. (1997) Physiological and ultrastructural effects of cadmium on wheat (*Triticum aestivum* L.) leaves. *Archiv. Environ. Contam. Toxicol.* 32; 154-160.
- Palus, J., Rydzynski, K., Dziubaltaowka., Wyszynska, K., Natajan, A. T., Nilsson (2003) Genotoxic effects of occupational exposure to lead and cadmium. *Mut. Res.* 540; 19-28.
- Pan , J-W., Zhu, M-Y, Chen, H. (2001) Aluminium-induced cell death in root-tip cells of barley. *Environ. Exp. Bot.* 46 ; 71-79.
- Panda, K. K., Lenka, M., Panda, B. B (1992) Monitoring and assessment of mercury pollution in the vicinity of a chloralkali plant. II plant availability, tissue-concentration and genotoxicity of mercury from agricultural soil contaminated with solid waste assessed in barley (*Hodreum vulgare*). *Environ. Pollut.* 76; 33-42.
- Panda, K. K., Patra, J., Panda, B. B (1996) Induction of sister chromatid exchanges by heavy metal salts in root meristem cells of *Allium cepa*. *Biol. Plantarum* 38; 555-561.
- Panda, K. K., Sahu, U. K., Panda, B. B. (1998) A new haematoxylin procedure for differential staining of sister chromatid exchanges in root meristem cells of *Allium cepa*. *Cytobios* 93; 113-121.
- Paradiso, A., Berardino, R., De Pinto, M.C., Sanita di Toppi, L., Storelli, M. M., Tommasi F., De Gara, L. (2008) Increase in ascorbate-glutathione metabolism as local and precocious systemic responses induced by cadmium in durum wheat plants. *Plant Cell Physiol.* 49(3); 362-74.
- Patil, B. C., Bhat, G. I. (1992) A Comparative study of MH and EMS in the induction of Chromosomal aberrations on lateral root meristem in *Clitoria ternate* L.. *Cytologia* 57; 358-368.
-

- Perrino, B. A. (1989)** Role of calmodulin in modulating Cd²⁺ induced microtubule disassembly and inhibition of microtubule assembly in vitro. In Dovgalyuk, A., Kalynyak, T., Blume, Ya.B. (2003) Heavy metals have a different action from aluminium in disrupting microtubules in *Allium cepa* meristems cells. Cell Biol. International 27; 193-195.
- Petruzelli, G., Ottaviani, M., Lubrano, L., Veschetti, E. (1994)** Characterization of heavy metal mobile species in sewage sludge for agricultural utilization. Agrochem 38(4); 277-284.
- Piqueras, A., Olmas, E., Martinez-Solano, J. R., Hellin, E. (1999)** Cd induced oxidative burst in tobacco BY2 cells: time course, subcellular location and antioxidant response. In Lin, R; ed. Effects of soil cadmium on growth, oxidative stress and antioxidant system in wheat seedlings (*Triticum aestivum* L.). Chemosphere 69; 89-98.
- Polle, A., Krings, B., Rennenberg, H. (1989)** Superoxide dismutase activity in needles of Norwegian trees (*Picea Abies* L.). Plant Physiol. 90;1310-1315.
- Pool-Zool, B. L., Lotzmann, N., Knoll, M., Kuchenmeister, F., Lambertz, R. Leucht, U., Schroder, H. G., Poschenrieder, C., Gunse, B., Barcelo, J. (1989)** Influence of cadmium on water relations, stomatal resistance, and abscisic acid content in expanding bean leaves. Plant Physiol. 90; 1365-1371.
- Poschenrieder, C. H., Gunse, B., Barcelo, J. (1989)** Influence of cadmium on water relations, stomatal resistance, and abscisic acid content in expanding bean leaves. Plant Physiol. 90; 1365-1371.
- Punz, W. F., Sieghardt, H. (1993)** The response of roots of herbaceous plant species to heavy metals. Environ. Exp. Bot. 33; 85-98.
- Qadir, S., Qureshi, M. I., Javed, S., Abdin, M. Z. (2004)** Genotypic variation in phytoremediation potential of Brassica juncea cultivars exposed to Cd stress. In Lin, R., Wang, X., Luo, Y., Du, W., Guo, H., Yin, D. (2007) Effects of soil cadmium on growth, oxidative stress and antioxidant system in wheat seedlings (*Triticum aestivum* L.). Chemosphere 69; 89-98.
- Qian, X-W., Luo, W-H., Zheng, O-X. (2006)** Joint effects of microwave and chromium trioxide on root tip of *Vicia faba*, J. Zhejiang Univ. Sci.B 7(3); 221-227.
- Quiroga, G., Guerrero, C., Botella, A. M. A., Barcelo, A., Amaya, I., Meddina, M. I., Alonso, F. J., Forchetti, M. S., Tigier, H., Valpuesta, V. (2000)** A tomato peroxidase involved in the synthesis of lignin and suberin. Plant Physiol. 122; 1119-1127.
- Radetski, C. M., Ferrari, B., Cotelle, S., Masfaraud, J. F., Ferrard, J. F. (2004)** Evaluation of the genotoxic, mutagenic and oxidant stress potentials of municipal solid waste in cinerator bottom ash leachates. Sci. Total Environ. 333; 209-216.
- Rank, J., Nielson, M. H. (1993)** A modified *Allium* test as a tool in screening of the genotoxicity of complex mixtures. Hereditas 118; 49-53.
- Rank, J., Nielson, M. H. (1994)** Evaluation of *Allium* anaphase-telophase test in relation of genotoxicity screening of industrial waste water. Mut. Res. 312; 17-24.
- Rank, J. and Nielson, M. H. (1997)** *Allium cepa* anaphase-telophase root tip chromosome aberration assay on N-methyl-N-nitrosourea, maleic hydrazide, acridine and DEHP in *Allium* root cells performed by two laboratories. Hereditas 136, 13-18.
- Rank, J., Lopez, L., Mette, H., Moretton, J. (2002)** Genotoxicity of maleic hydrazide, acridine and DEHP in *Allium* root cells performed by two different laboratories. Hereditas 136; 13-18.
- Rausser, W. E., Ackerley, C. A. (1987)** Localization of cadmium in granules within differentiating and mature roots cells. Can. J. Bot. 63; 643-646.
- Reddy, N. M., Panda, k. k. subhadra, A. V., Panda, B. B. (1995)** The *Allium* micronucleus (MNC) assay may be used to distinguish clastogens from aneugens. Biogisches Zentralblatt 144; 358-368.
- Reddy, T. P., Vaidyanth, K. (1978)** Synergistic interaction of gamma rays and some metallic salts in the induction of chlorophyll mutations in rice. Mut. Res. 52, 361-365.

- Reese, R. N., Wagner, G. J. (1987)** Properties of Tobacco (*Nicotiana tabacum*) cadmium-binding peptide(s). *Biochem. J.* 241; 641-647.
- Rejeb, S. (1990)** Effets des eaux usées traitées et des boues résiduelles sur la croissance et la composition chimique de quelques espèces végétales. Doctorat De Troisième Cycle (Physiologie Végétale), Faculté des Sciences de Tunis, 153p.
- Rentel, M., Knight, M.R. (2004)** Oxidative stress-induced calcium signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 135; 1471-1479.
- Ribas, G., Frenzilli, G., Brale, R., Marcos, R. (1995)** Herbicide induced DNA damage in Human lymphocytes evaluated by the single-cell gel electrophoresis (SCGE) assay. *Mut. Res.* 344; 41-54.
- Rieger, R., Michaelis, A., Green, M. M. (1976)** Glossary of genetics and cytogenetics: Classical and Molecular. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Rivetta, A., Negrini, N., Cocucci, M. (1997)** Involvement of Ca²⁺-calmodulin in Cd²⁺ toxicity during the early phases of radish (*Raphanus sativus* L.) seed germination. *Plant Cell Environ.* 20; 600-608.
- Robinson, N. J., Tommey, A. M., Kuske, C., Jackson, P. J. (1993)** Plant metallothioneins. *Biochem. J.* 295; 1-10.
- Rodriguez-Serrano, M., Romero-Puertas, M. C., Zabalza, A., Corpas, F. J., Gomez, M., Del Rio, L. A., Sandalio, L. M. (2006)** Cadmium effect on oxidative metabolism of pea (*Pisum Sativum* L.) roots. Imaging of reactive oxygen species and nitric oxide accumulation *in vivo*, *Plant Cell Environ.* 29; 1532-1544.
- Rogers, H. R. (1996)** Sources, behaviour and fate of organic contamination during sewage treatment and in sewage sludges. *Sci. Total Environ.* 185; 3-26.
- Rojas, E., Valverde, M., Herrera, L. A., Altramirano-Lozano, M., Ostrosky-Wegman, P. (1996)** Genotoxicity of vanadium pentoxide evaluated by the single cell gel electrophoresis assay in human lymphocytes. *Mut. Res.* 360; 193-200.
- Romero-Puertas, M. C., Corpas, F. J., Sandalio, L. M., Leterrier, M., Rodriguez-Serrano, M., Del Rio, I. A., Palma, J. M. (2006)** Glutathione reductase from pea leaves: responses to abiotic stress and characterization of the peroxisomal isozyme. In Yannarelli, G.G. ed. Glutathione reductase activity and isoforms in leaves and roots of wheat plants subjected to cadmium stress. *Phytochemistry* (in press).
- Romero-Puertas, M.C., Palma, J. M., Gomez, M., del Rio, I.A., Sandalio, L. M. (2002)** Cadmium causes the oxidative modification of protein in pea plants; In Drązkiewicz, M. ed. The redox state and activity of superoxide dismutase classes in *Arabidopsis thaliana* under cadmium or copper stress. *Chemosphere* 67 (2007); 188-193.
- Romero-Puertas, M. C., Rodríguez-Serrano, M., Corpas, F. J., Gómez, M., del Río, L. A., Sandalio, L. M. (2004)** Cadmium induced subcellular accumulation of O₂ and H₂O₂ in pea leaves. *Plant Cell Environ.* 27; 1122-1134.
- Rosa, E. V., Valgas, C., Souza-Sierra, M. N., Correa, A. X., Radetski, C. M. (2003)** Biomass growth, micronucleus induction, and antioxidant stress enzyme responses in *Vicia faba* exposed to cadmium in solution. *Environ. Toxicol. Chem.* 22 (3); 645-649.
- Rueggsegger, A., Schmutz, D., and Brunold, C. (1990)** Regulation of glutathione synthesis by cadmium in *Pisum sativum* L.. *Plant Physiol.* 93; 1579-1584.
- Ruposhev, A. R. (1976)** The cytogenetic effect of heavy metal ions on seed of *Crepis capillaris* L. *Genetika* 12; 37-43.
- Salt, D. E., Blaylock, M., Kumar, N. P. B. A., Dushenkov, V., Ensley, B. D., Chet, I., Raskin, I. (1995)** Phytoremediation: a novel strategy for the removal of toxic metals from the environment using plants. *Biotechnology* 13; 468-474.
- Sandalio, L. M., Dalurzo, H. C., Gómez, M., Romero-Puertas, M.C., Del Rio. (2001)** Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. *J. Exp. Bot.* 52 (364) ; 2115-2126.
-

- Sandhu, S. S., Vig, B. K., Constantain, M. J. (1986)** Detection of chemically induced aneuploidy induction with plant test systems. *Mut. Res.* 167; 61-69.
- Sanita di Toppi, L., Gabbrielli, R. (1999)** Response to cadmium in higher plants. *Environ. Exp. Bot.* 41; 105-130.
- Schickler, H., Caspi, H. (1999)** Response of antioxidant enzymes to nickel and cadmium stress in hyperaccumulator plants of the genus *Alyssum*. *Physiol. Plantarum.* 105; 39-44.
- Schneider, E. A., Wightman, F. (1974)** Metabolism of auxin in higher plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 25; 487-513.
- Schubert, I. (1994)** Sister chromatid exchanges in *Nicotiana plumbaginifolia*. *Biologisches Zentralblatt* 113; 487-491.
- Schützendübel, A., Schwanz, P., Teichmann T., Gross, K., Langenfeld-Heyser, R., Goldbold D. L., Polle, A. (2001)** Cadmium induced changes in antioxidative systems, H₂O₂ content and differentiation in pine (*Pinus sylvestris*) roots. *Plant Physiol.* 127; 887-892.
- Schwartzman, J. B., Cortes, F. (1977)** Sister chromatid exchanges in *Allium cepa* L. *Chromosoma* 62; 119-131.
- Schwartzman, J. B. (1987)** Sister chromatid exchanges in higher plants cells: past and perspectives. *Mut. Res.* 181; 127-145.
- Sela, M., Tel-Or, E., Fritz, E., Huttermann, A. (1988)** Localization and toxic effects of cadmium, copper, and uranium in *Azolla*. *Plant Physiol.* 88; 30-36.
- Seone, A. I., Dulout, F. N. (2001)** Genotoxicity ability of cadmium, chromium and nickel salts studied by kinetochore staining in the cytokinesis-blocked micronucleus assay. *Mut. Res.* 490; 99-106.
- Seregin, I. V., Ivanov, V. B. (2001)** Physiological aspects of cadmium and lead toxic effects on higher plants. *Russ. J. Plant Physiol.* 48 (4); 606-630.
- Sergiev, I., Alexieva, V., Karnov E. (1997)** Effect of spermine, atrazine and combination between them on some endogenous protective systems and stress markers in plants. *Com. Rend. Acad. Bulg. Sci.* 51; 121-124.
- Sgherri, C. Cosiantd, E., Navari-Izzo, F. (2003)** Phenols and oxidative status of *Raphus sativus* grown in copper excess. *Physiol. Plantarum* 118; 21-28.
- Shah, K., Kumar, R. G., Verma, S., Dubey, R. S. (2001)** Effect of cadmium on lipid peroxidation, superoxide anion, generation and activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. *Plant Science* 161; 1135-1114.
- Sharma, S. S., Kaul, A., Metwally, K. C., Goyal, I., Finkemeier, I., Dietz, K. J. (2004)** Cadmium toxicity to barley (*Hordum vulgare*) as affected by varying Fe nutritional status. *Plant Sc.* 166; 1287-1295.
- Shelby, M. D. (1976)** Chemical mutagenesis in plants and mutagenicity of plant related compounds. *Environ. Mutagen. Information Center, Oak Ridge.*
- Singh, M. P., Mathur, M. M. K., Saxena, D. K, Chowdhuri D. K. (2009)** Induction of hsp70, hsp60, hsp83 and hsp26 and oxidative stress markers in benzene, toluene and xylene exposed *Drosophila melanogaster*: Role of ROS generation. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 235(2); 226-243.
- Singh, N., McCoy, M., Tice R, Schneider, L. (1988)** A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res.* 175; 184-191.
- Singh, S., Eapen, S., D'Souza, S. F. (2006)** Cadmium accumulation and its influence on lipid peroxidation and antioxidative system in an aquatic plant, *Bacopa monnieri* L.. *Chemosphere* 62 (2); 233-246.
- Skórzyńska, E., Baszyński, T. (1998)** The modifying effect of calcium on Cd-treated runner bean plants. In Maksymiec, W. (2007) Signaling responses in plants to heavy metals. *Acta Physiol. Plant.* 29; 177-187.
-

- Skórzynska-Polit, E., Pawlikowska-Pawlega, B., Szczuka, E., Drazkiewicz, M., Krupa, Z. (2006) The activity and localization of lipoxygenases in *Arabidopsis thaliana* under cadmium and copper stress. *Plant Growth Regul.* 48; 29-39.
- Smeets, K., Cuypers, A., Lambrechts, A., Semane, B., Hoet, P., Van Laere A., Vangronsveld, J. (2005) Induction of oxidative stress and antioxidative mechanisms in *Phaseolus vulgaris* after Cd application. *Plant Physiol. Biochem.* 43; 437-444.
- Sobkowiak, R., Deckert, J. (2003) Cadmium-induced change in growth and cell cycle gene expression in suspension-culture cells of soybean. *Plant Physiol. Biochem.* 41; 767-772.
- Somashekaraiah, B. V., Padmaja, K., Prasad, A. R. K. (1992) Phytotoxicity of cadmium ions on germinating seedlings of mungbean (*Phaseolus vulgaris*): involvement of lipid peroxides in chlorophyll degradation. *Physiol. Plant* 85; 85-89.
- Souguir, D., Ferjani, E., Ledoigt, G., Goupil, P. (2008) Exposure of *Vicia faba* and *Pisum sativum* to copper-induced genotoxicity. *Protoplasma* 233(3-4); 203-207.
- Spiteller, G. (2003) The relationship between changes in the cell wall, lipid peroxidation, proliferation, senescence and cell death. *Physiol. Plantarum* 119, 5-18.
- Srivastava, A., Jaiswal, V. S. (1990) Biochemical changes in duck weed after cadmium treatment. *Water Air Soil Pollut.* 50; 163-170.
- Srivastava, S., Tripathi, R. D., Dwivedi, U. N. (2004) Synthesis of phytochelatins and modulation of antioxidants in response to cadmium stress in *Cuscuta reflexa*- an angiospermic parasite. *J. Plant Physiol.* 161; 665-674.
- Steinkellner, H., Mum-sik, K., Helma, C., Ecker, S., Ma, T-H., Horak, O., Kundi, M and Knasmuller, S. (1998) Genotoxic effects of heavy metals: Comparative investigation with plant bioassays. *Environ. Mol. Mutagen.* 31; 183-191.
- Stevens, J. L., Liu, H., Halleck, M., Bowes, R.C., Chen, Q.M., Van De, W.B. (2000) Linking gene expression to mechanisms of toxicity. *Toxicol. Lett.* 112-113; 479-486.
- Sutherland, M. W., Learmonth, B. A. (1997) The tetrazolium dyes MTS and XTT provide new quantitative assays for superoxide and superoxide dismutase. *Free Radical Res.* 27(3); 283-289.
- Swain, T., Hillis. (1959) The phenolic constituents of *Prunus domestica*. I. The quantitative analysis of phenolic constituent. *J. Sci. Food Agric.* 10; 418-425.
- Tamás, L., Dudíková, J., Ďurčková, K., Halušková, L., Hottová, J., Místík, I., Ollé, M. (2008) Alterations of the gene expression, lipid peroxidation, proline and thiol content along the barley root exposed to cadmium. *J. Plant Physiol.* 165; 1193-1203.
- Tanaka, K., Takeuchi, E., Kubo, A., Sakaki, T., Haraguchi, K., Kawamura, Y. (1991) Two immunologically different isozymes of ascorbate peroxidase from spinach leaves. *Arch. Biochem. Biophysiol.* 286; 371-375.
- Tanguay, R. M., Wu, Y., Khandjian, E. W. (1993) Tissue-specific expression of heat shock proteins of the mouse in the absence of stress. *Dev. Genet.* 14; 112-118.
- Teichmann, T. (2001) The biology of wood formation: scientific challenges and biotechnological perspectives. In SG Panadalai, ed. *Recent Research Developments in Plant Physiology*. Research Signpost, Trivandrum, India; 269-284.
- Templaar, M. J., De Both, M. T. J., Verteegh, J. E. G. (1982) Measurement of SCE frequencies in plants: a simple Fulgen- staining procedure of *Vicia faba*. *Mut. Res.* 103; 322-326.
- Terslov, L., Samoe-Petersen, L., Rasmussen, J. O., Kristensen, P. (1997) Use of waste products in agriculture. Contamination level, Environmental risk assessment and recommendation for quality criteria. Environmental Project No. 366. Danish Environmental Protection Agency, Denmark.
- Timperio, A. M., Egidi, M. G., Zolla, L. (2008) Proteomics applied on plant abiotic stresses: Role of heat shock proteins (HSP). *J. Proteomics* 71; 391-411.
- Tucker, J. D., Auletta, A., Cimido, M.C., Dearfield, K. L., Jacobson-Kram, D. Tice, R. R., Carreno, A. V. (1993) (Cortes, F., Daza, P., Pinero, J., Escalza, P. (1994) Evidence that SCEs

- induced by mutagens do not occur at the same locus in successive cycle cell: lack of concellation in three way stained CHO chromosomes. Environ. Mol. Mutagen. 24; 203-207.
- Türkoğlu, S. (2007)** Genotoxicity of five food preservatives tested on root tips of *Allium cepa* L.. Mut. Res. 626; 4-14.
- Ünyayar, S., Çelik, A., Çekiç, Ö. F., Gözel, A. (2006)** Cadmium-induced genotoxicity, cytotoxicity and lipid peroxidation in *Allium sativum* et *Vicia faba*. Mutagenesis 21(1); 77-81.
- Vaidyanathan, H., Sivakumar, P., Chakrabarty, R., Thomas, G. (2003)** Scavenging of reactive oxygen species in NaCl-stressed rice (*Oryza sativa* L.)-differential response in salt-tolerant and sensitive varieties. Plant Sci. 165;1411-1418.
- Valverde, M., Trejo, C., Rojas, E. (2001)** Is the capacity of lead acetate and cadmium chloride to induce genotoxic damage due to direct DNA metal interaction. Mutagenesis 16; 265-270.
- Van Assche, F., Clijsters, H. (1990)** Effects of metals on enzyme activity in plants. Plant Cell Environ. 13 ; 195-206.
- Van Balen, E., Van de Geijn, S. C., Desmot, G. M. (1980)** Autoradiographic evidence for the incorporation of cadmium into calcium oxalate crystals. Z. Pflanzenphysiol. 97; 123-133.
- Van Tunen, A. L., Mol, J. N . M. (1991)** Control of flavonoide synthesis and manipulation of flower colour; .In: Blackie, D.G., ed. Developmental regulation of plant gene expression. Plant Biotechnology Series. New York.
- Vansuy, G., Mench, M., Briat, J.F. (2000)** Soil-dependent variability of iron accumulation in transgenic tobacco overexpressing ferritin. Plant Physiol. Biochem. 38; 499-506.
- Vecchia, F.D., La Rocca, N., Moro, I., De Faveri, S., Andreoli, C., Rascio, N. (2005)** Morphogenetic, ultrastructural and physiological damages by submerged leaves of *Elodea canadensis* exposed to cadmium. Plant Sci. 168; 329-338.
- Vitória, A. P., Lea, P. J., Azevedo, R. A. (2001)** Antioxidant enzymes responses to cadmium in radish tissues. Phytochemistry 57; 701-710.
- Von Zglinicki, T., Edwall, C., Ostlund, E., Lind, B., Nordberg, M., Ringertz, N., Wroblewski, J. (1992)** Very low cadmium concentration stimulate DNA synthesis and cell growth. In Lin, R., Wang, X., Luo, Y., Du, W., Guo, H., Yin, D. (2007) Effects of soil cadmium on growth, oxidative stress and antioxidant system in wheat seedlings (*Triticum aestivum* L.). Chemosphere 69; 89-98.
- Wagner, G. J. (1993)** Accumulation of cadmium in crop plants and its consequences to human health. Advances in Agronomy 51, 173-212.
- Wallin, M., Hartley-Asp, B. (1993)** Effects of potential aneuploidy inducing agents on microtubule assembly in vitro. In Dvogyalyuk, A., Kalynyak, T., Blume, Ya.B. (2003) Heavy metals have a different action from aluminium in disrupting microtubules in *Allium cepa* meristems cells. Cell Biol. International 27; 193-195.
- Wang, H. (1999)** Clastogenicity of Chromium contaminated soil samples evaluated by *Vicia faba* micronucleus assay, Mut. Res. 426; 147-149.
- Wang, T.S., Huang, H. (1994)** Active oxygen species are involved in the induction of micronuclei by arsenite in XRS-5 cells. Mutagenesis 9(3); 253-257.
- Waters, M. D., Stack, H. F., Brady, A. L., Lohman, P. H., Haroun, L. And Vinio, H. (1988)** Use of computerized data listing and activity profiles of genetic and related effects in the review of 195 compounds. Mut. Res. 205; 1067-1074.
- Wen, Y.Y.(ed) (1989)** Calcium and calmodulin. Chemical Industry Publishing House. Beijing (In chin).
- Whitelaw C. A. . Le Huquet, J. A., Thurman, D. A., Tomsett, A. B. (1997)** The isolation and characterisation of type II metallothionein-like genes from tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). Pant Mol. Biol. 33; 503-511.
- Wichkner, S., Maurizi, M.R., Gottesman, S. (1999)** Posttranslational quality control : folding, refolding, and degrading proteins. Science 286; 1888-1893.

- Wiersma, D, van Goor, B.J. and van derVeen, N.G. (1986)** Cadmium, lead, mercury, and arsenic contaminations in crops and corresponding soils in the Netherlands. *J. Agr. Food Chem.* 34; 1067-1074.
- Wierzbicka, M. (1994)** Resumption of mitotic activity in *Allium cepa* root tips during treatment with lead salts. *Environ. Exp. Bot* 34; 173-180.
- Wu, F., Zhang, G., Dominy, P. (2003)** Four barley genotypes respond differently to cadmium: lipid peroxidation and activities of antioxidant capacity. *Environ. Exp. Bot.* 50 ; 67-78.
- Xiang, C., Olivier, D. J. (1998)** Glutathione metabolic genes coordinately respond to heavy metals and jasmonic acid in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 10; 1539-1550.
- Yamamoto, Y., Hachia, A., Hamada, H., Matsumoto, H. (1998)** Phenylpropanoids as a protectant of aluminum toxicity in cultured tobacco cells. *Plant Cell Physiol* 39; 950-957.
- Yang, T., Poovaiah, B. W. (2002)** Hydrogen peroxide homeostasis: Activation of plant catalase by calcium/calmoduline. *PNAS* 6; 4097-4102.
- Yannarelli, G. G., Fernández-Alvarez, A. J., Santa-Cruz, D. M, Tomaro, M. L. (2006)** Glutathione reductase activity and isoforms in leaves and roots of wheat plants subjected to cadmium stress. *Phytochemistry*.
- Yi, H., Meng, Z. (2003)** Genotoxicity of hydrated sulfur dioxide on root tips of *Allium sativum* and *Vicia faba*. *Mut. Res.* 537; 10-114.
- Yurekli, F., Porgali, B.Z. (2006)** The effects of excessive exposure to copper in bean plants. *Acta Biol. cracov. Bot.* 48; 7-13.
- Zaka, R., Chenal, C., Misset, M. T. (2002)** Study external low irradiation dose affects on induction of chromosomes aberrations in *Pisum sativum* root tip meristem. *Mut. Res.* 517; 87-99.
- Zhang, Y., Yang, X. (1994)** The toxic effect of cadmium on cell division and chromosomal morphology of *Hordeum vulgare*. *Mut. Res.* 312; 121-126.
- Zhou, Z. S., Huang, S. Q., Guo, K., Mehta, S. K., Zhang, P. C., Yang, Z. M. (2007)** Metabolic adaptations to mercury-induced oxidative stress in roots of *Medicago sativa* L.. *J. Inorg. Biochem.* 101; 1-9.
- Zhu, Y. L., Pilon-Smits, E. A., Tarun, A. S., Weber, S. U., Jouanin, L., Terry, N. (1999)** Cadmium tolerance and accumulation in Indian mustard enhanced by overexpressing gamma-glutamylcysteine synthetase. *Plant Physiol.* 121; 1169-1178.
- Zimeri, A. M., Dhankher, O. P., McCaig, B., Meagher, R. B. (2005)** The plant MT1 metallothioneins are stabilized by binding of Cd and are required for cadmium tolerance and accumulation. *Plant Mol. Biol.* 58; 839-855.
- Zou, J., Salminen, W. F., Roberts, S. M., Voellmy, R. (1998)** Correlation between glutathione oxidation and trimerization of heat shock factor 1, an early step in stress induction of the Hsp response. *Cell Stress Chaperones* 3, 130-141.
-

Annexes

Annexe I : Extraction des ARN- Système KIT TRI-REAGENT (Sigma ou Euromedex)

-Broyage des tissus dans N2 Liquide.

-Transfert du broyat dans des tubes eppendorff 2mL stérile.

Attention : le broyat ne doit pas dépasser le 1/3 du tube pour obtenir une purification différentielle des ARN vis-à-vis de l'ADN génomique.

-Ajouter 1mL de TRI-REAGENT- Vortexer

-Lyser 5 min dans la glace

-Ajouter 300µL de chloroforme (déprotéination) -Vortexer

- Séparation des phases 15 min dans la glace

-Centrifuger 15 min, 12000xg, 4°C

-Récupérer la phase aqueuse dans un tube stérile

-Ajouter 850µL de l'isopropanol (Agiter doucement par renversement)

-Laisser 10 à 15 min à température ambiante (précipitation des ARN)

-Centrifuger 15 min, 12000xg, 4°C

-Éliminer complètement et minutieusement l'éthanol et sécher le culot à l'air

-Resuspendre le culot dans 30µL de l'eau stérile

La resuspension peut être assez longue si les ARN ne sont pas purs. Laisser resuspendre dans la glace et tapoter le tube

-Centrifuger 15 min, 12 000xg, 4°C

Cette étape est indispensable pour se débarrasser de toutes les insolubilités pouvant fausser le dosage des ARN

- Récupérer délicatement le surnageant contenant les ARN solubilisés

-Stocker les ARN à - 80°C (ou à -20°C pour un stockage non prolongé)

Annexe II : Gel de Contrôle pour tester l'intégrité des ARN

L'électrophorèse des ARN en gel d'agarose nécessite l'utilisation de tampon stérile (autoclavé) et fraîchement préparé.

TAE 50X :

Pour 1 litre de tampon TAE 50X : 242g Tris base, 100mL EDTA 0,5 M(pH 8), ramener pH 8 avec acide acétique glacial (57.1 mL)

Préparation du tampon de migration :

Préparation de 600ml de tampon TAE 1x

Préparation de gel de migration : gel d'agarose 1% :

-Peser 1,5g d'agarose, ajouter 150ml de tampon TAE1x, faire fondre au micro-onde, laisser refroidir, ajouter le Bromure d'Ethidium (BET) à 0,5µg/mL

-Couler le gel d'agarose le jour même de la migration des ARN.

*Pour la cuve Midigel (10x13 cm) : 150mL de gel, 600 mL de tampon de migration

*Pour la cuve Minigel (8x10.5 cm) : 100mL de gel, 250 mL de tampon de migration

-Faire migrer 1 à 2 µg d'ARN par puits en présence de tampon de charge (mélange d'Orange G dans 30% de glycérol)

-Migration à 80 volts, pendant 2 à 3 heures environ.

-La visualisation des ARN s'effectue sur la table UV.

Bonne intégrité des ARN : Visualisation des sous unités ribosomiques 28S, 18S et 5S.

Mauvaise intégrité des ARN : Observation d'un smire au dessous des sous unités ribosomiques correspondant à leur dégradation.

Annexe III : Synthèse des ADNc (Reverse Transcriptase Core Kit, RT-RTCK-03, Eurogentec)

-Préparer une série de tubes de thermocycleur contenant 1µL d'ARN totaux (800ng) + 3µL de RNase Free Water

-Placer les tubes dans le thermocycleur pendant 2 min à 70°C : Etape de dénaturation des ARN puis retour rapide à 4°C pour éviter la renaturation

-Ajouter 6µL de mix

Préparation de mix :

Pour x + 1 échantillons (ou + 2 au dessus de 10 échantillons):

Milieu réactionnel pour 1 échantillon d'ARN

- 1µL Tampon 10x

- 2µL de la solution de MgCl₂ 25mM (5mM final)

- 2µL de la solution dNTP 2.5mM (500µM final)

- 0.5µL d'Oligod(t)₁₅ ou Random nonamer (2.5µM final)

- 0.2µL RNase Inhibitor 0.4 U/µL)

- 0.25µL EuroScript RT(1.25 U/µL)

=6µL : Volume total de mix

Annexe V : Contrôles de Synthèse des ADNc

RT-PCR de Contrôle de Synthèse des ADNc :

-1 à 5µL d'ADNc (représentant alors 0,2 à 1ng)

-47µL de mix par échantillon contenant

-5µL PCR Buffer 10x

-1µL de la solution dNTP (10mM each)

-3µL de la solution de MgCl₂

-1µL d'amorce "sens"

-1µL d'amorce "anti-sens"

-0.5µL Taq DNA polymerase

-Eau stérile qsp 50µL

-Mettre au thermocycleur pendant 25 à 36 cycles comportant chacun 3 phases :

- 30 sec à 95°C: Dénaturation

- 30 sec à 56°C: Hybridation des amorces spécifiques(*T_m* variant selon les amorces)

- 30 sec à 72°C: Elongation

-Laisser 10 min à 72°C pour obtenir des produits de PCR

Annexe VI: Purification de l'ADN (GFX™ PCR DNA and Gel Band

Purification Kit) (amersham pharmacia biotech)

- Faire une électrophorèse sur gel d'agarose 0,9% (amorce : 50ng/µL, ADNc : 3 à 5µL à partir d'une RT-PCR dilué 20x et une ARN à 800ng /µL).

- Couper les bandes obtenues et les récupérer les bandes dans des tubes Eppendorf

- Peser le gel : Il ne faut pas dépasser 300mg de gel/tube

- Ajouter un volume de "**Capture buffer**"qui est égal à la masse de gel

- Faire fondre le gel dans un bain marie à 60°C pendant 15 min.

- Pendant l'incubation, placer le "**GFX Column**" sur le "**Collection Tube**"

- Après que le gel soit complètement fondu, centrifuger brièvement

- Transférer l'échantillon dans la "**GFX Column**" et laisser 1min à température ambiante

- Centrifuger dans la microcentrifugeuse(10.000 à 16.000xg) pendant 30 sec

- Jeter le contenu de "**Collection Tube**" et ajouter 500µL de "**Wash Buffer**" à la colonne, laisser 1 min à Température ambiante

- Centrifuger 30 sec

-
-
- Placer la colonne sur des tubes de 1.5 mL. A partir de cette étape, pas de "Collection Tube"
 - Ajouter 10 μ L de la **solution d'éluion** (qui consiste soit à une solution de :Tris-HCl 1mM pH 8.0, TE pH 8.0 soit du l'eau bidistillée et autoclavée) pour avoir l'ADN purifiée
 - Laisser 1 min à la température ambiante
 - Centrifuger 1 min
 - Ajouter 10 μ L de la **solution d'éluion**

Laisser 1 min à température ambiante et centrifuger pendant 1 min

Remarque :Le volume total à ajouter pour l'éluion ne doit pas dépasser 50 μ L et il ne doit pas être inférieur à 10 μ L.

Annexe VII : qPCR = PCR semi-quantitative en temps réel (MasterMix, Plus for SYBER Green, Eurogentec)

Milieu réactionnel :

2.5 μ L d'ADNc à déposer dans les puits de la microplaque.

Protocole du mix pour x + 2 échantillons :

- 12.5 μ L reaction buffer 2x ;
- 1 μ L d'amorce "sens" à 5ng/ μ L ;
- 1 μ L d'amorce "anti-sens" à 5ng/ μ L ;
- Eau stérile qsp 25 μ L.

Amplification :

2 min à 50°C : Etape initiale : Dégradation des simples brin ARN par la Uracil-N glycosylase.

10 min à 95°C : Activation de la polymérase et inactivation de la Uracil-N glycosylase

30s à 95°C : Dénaturation

30s à 56°C : Hybridation, température selon le Tm des amorces

30s à 72°C : Elongation.

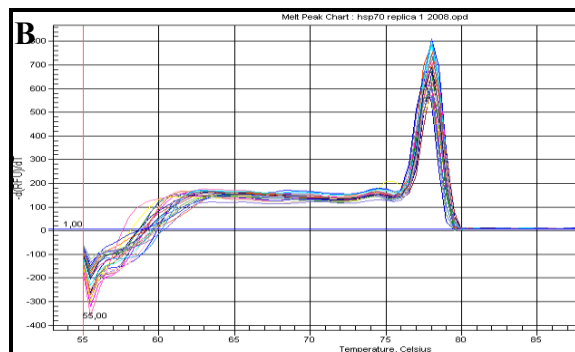
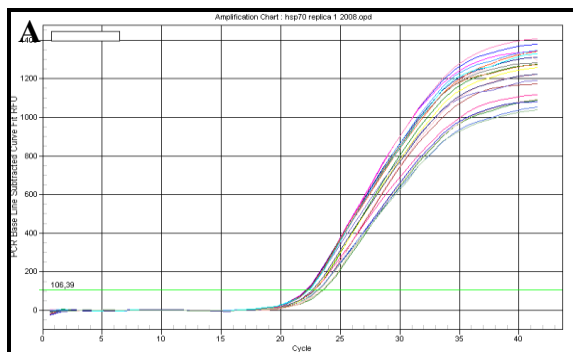
} 42 cycles

Retour à 4°C

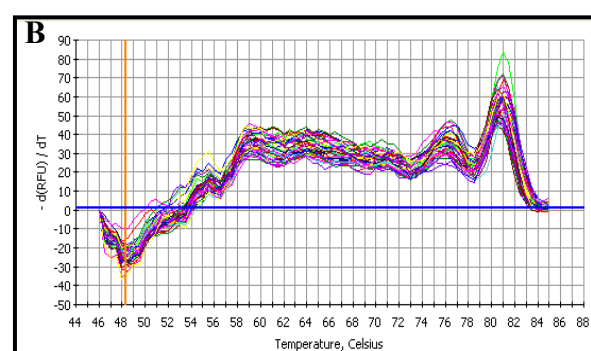
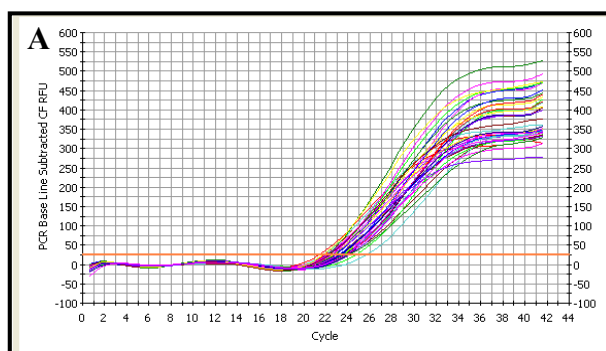
Pour établir la courbe de fusion :

80 cycles de 46°C à 86°C avec une montée en température de 0.5°C par cycle.

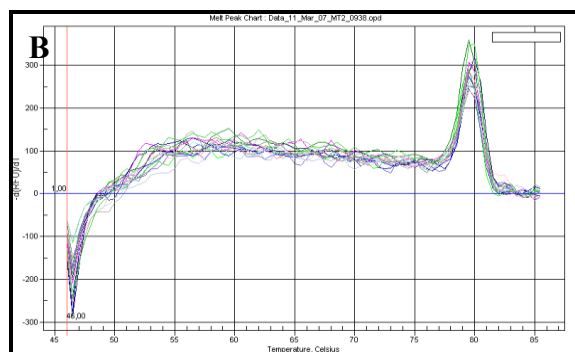
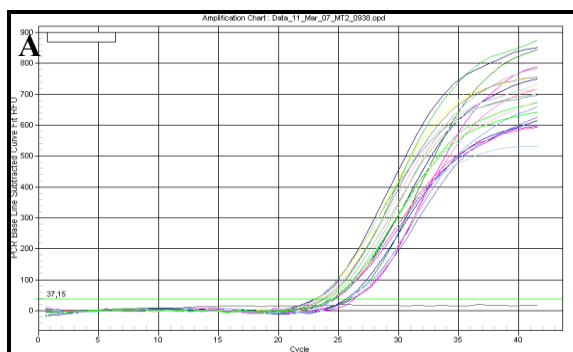
Annexe VIII: Courbes d'amplifications et de fusion des gènes d'intérêts



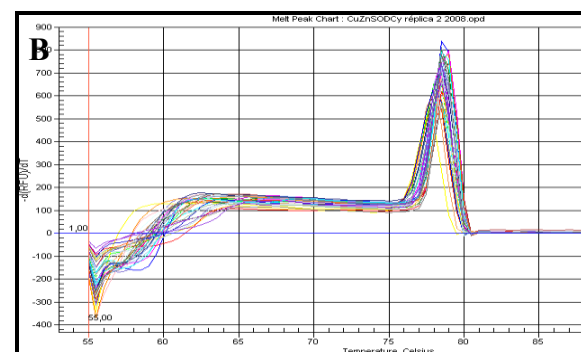
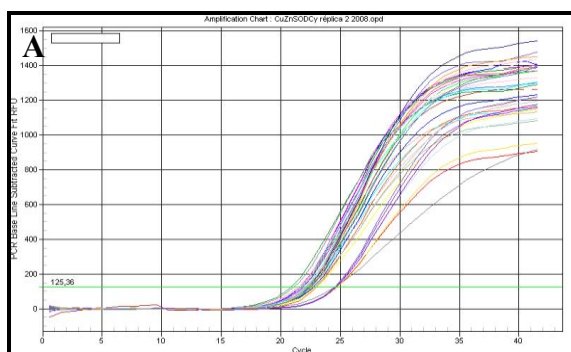
Annexe VIII.1 : courbes d'amplification (A) et de fusion (B) du gène *hsp70.1*



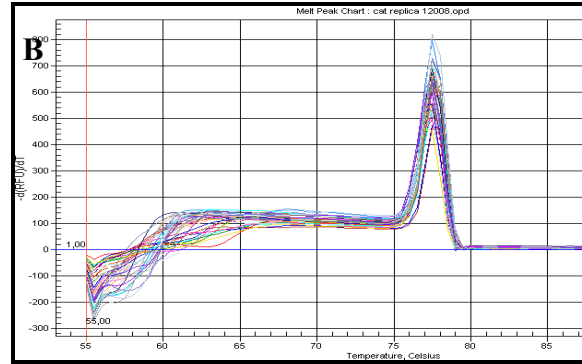
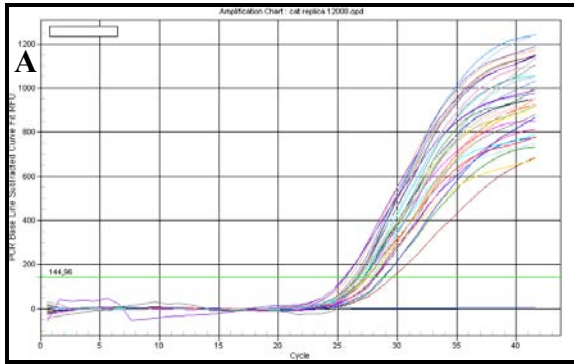
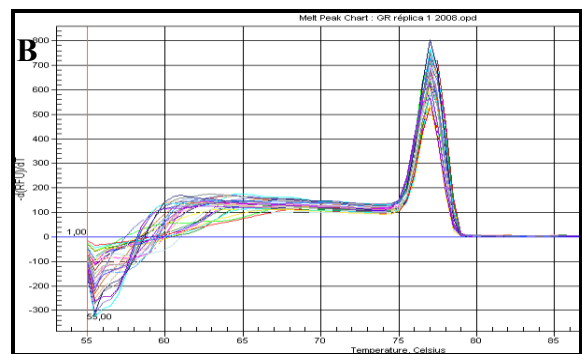
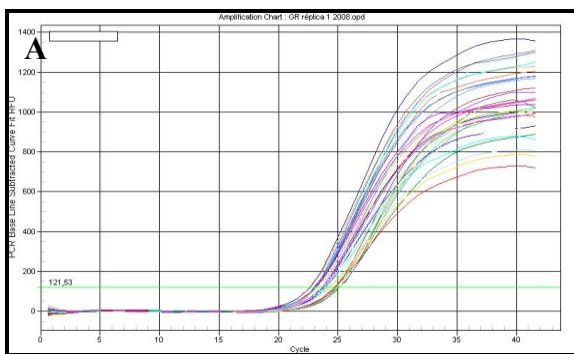
Annexe VIII.2 : courbes d'amplification (A) et de fusion (B) du gène *MT1*



Annexe VIII.3 : Courbes d'amplification (A) et de fusion (B) du gène *MT2*



Annexe VIII.4: Courbes d'amplification (A) et de fusion (B) du gène *CuZnSODcy*

Annexe VIII.5 : Courbes d'amplification (A) et de fusion (B) du gène *Cat*Annexe VIII.6 : Courbes d'amplification (A) et de fusion (B) du gène *GR*

**Liste des travaux de recherche et des
publications**

Publications

- **Exposure of *Vicia faba* and *Pisum sativum* to copper-induced genotoxicity.** Dalila Souguir, Ezzeddine Ferjani, Gérard Ledoigt, Pascale Goupil. *Protoplasma* (2008) 233:203–207
- **Expression of stress-related genes in tomato plants exposed to arsenic and chromium in nutrient solution.** Pascale Goupil, Dalila Souguir, Ezzeddine Ferjani, Olivier Faure, Adnane Hitmi, Gérard Ledoigt. *Journal of Plant Physiology* (2009). doi:10.1016/j.jplph.2009.01.015

Communications présentées dans des manifestations scientifiques nationales

Communications orales:

- **Production des espèces réactives de l'oxygène et altération de la division cellulaire au niveau des racines de *Vicia faba* traitées par le cadmium.** Dalila Souguir, Pascale Goupil, Gérard Ledoigt, Ezzeddine Ferjani.
20^{ème} Forum des Sciences Biologiques; 5^{ème} congrès International de Biotechnologie. 22-25 Mars 2009, Hammamet Tunisie.
- **Génotoxicité de cadmium et de cuivre chez *Vicia faba* et *Pisum sativum*.** Dalila Souguir, Pascale Goupil, Gérard Ledoigt, Ezzeddine Ferjani.
XVII^{èmes} Journées Nationales de Biologie "Bio-Géo-Ressources et Environnement", 3-6 Novembre 2007, Hammamet-Tunisie.

Communications par affiche:

- **Stimulation de la production du peroxyde d'hydrogène et activation du système antioxydant en présence du cadmium au niveau des racines de *Vicia faba*.** Dalila Souguir, Pascale Goupil, Gérard Ledoigt, Ezzeddine Ferjani.
XVIII^{èmes} Journées Nationales de Biologie "Génie biologique et Environnement", 6-9 Novembre 2008, Hammamet-Tunisie.
 - **Altération de la croissance et pouvoir génotoxique du cadmium au niveau des racines de *Vicia faba*.** Dalila Souguir, Pascale Goupil, Gérard Ledoigt, Ezzeddine Ferjani.
XVIII^{èmes} Journées Nationales de Biologie "Génie biologique et Environnement", 6-9 Novembre 2008, Hammamet-Tunisie.
-

Communications présentées dans des manifestations scientifiques internationales

Communications par affiche:

- **Genotoxicity of Heavy metals (Cd and Cu) for cultivated plants.** **Dalila Souguir**, Ezzeddine Ferjani, Gérard Ledoigt, Pascale Goupil.

First Congress of the Federation for Environmental Research, Clermont Ferrand, 22-24 Octobre 2008

- **Genotoxicity and cytotoxicity of cadmium and copper on plants.** **Dalila Souguir**, Seybou Tinni Nouhou, Pascale Goupil, Gérard Ledoigt, Ezzeddine Ferjani.

COST Action 859WG2 and WG3 Workshop "-omics approaches and agricultural management: driving forces to improve food quality and safety?" Sait Etienne, France, 31 August – 02 September 2006



Exposure of *Vicia faba* and *Pisum sativum* to copper-induced genotoxicity

D. Souguir · E. Ferjani · G. Ledoigt · P. Goupil

Received: 8 January 2008 / Accepted: 6 March 2008 / Published online: 12 June 2008
© Springer-Verlag 2008

Abstract The potential genotoxicity of Cu^{2+} was investigated in *Vicia faba* and *Pisum sativum* seedlings in hydroponic culture conditions. Cu^{2+} caused a dose-dependent increase in micronuclei frequencies in both plant models. Cytological analysis of root tips cells showed clastogenic and aneugenic effects of this heavy metal on *V. faba* root meristems. Cu^{2+} induced chromosomal alterations at the lowest concentration used (2.5 mM) when incubated for 42 h, indicating the potent mutagenic effect of this ion. A spectrum of chromosomal abnormalities was observed in *V. faba* root meristems, illustrating the genotoxic events leading to micronuclei formation.

Keywords Chromosomal aberrations · Genotoxicity · Heavy metal · Micronuclei · Root tips

Abbreviations

MCN micronuclei
MH maleic hydrazide

Introduction

Heavy metal deposition has increased dramatically over the last decades as a result of anthropogenic activities leading to heavily polluted areas worldwide. One of the major problems of this environmental pollution is copper over-accumulation in soils. Its concentration can reach 500 mg kg^{-1} in vineyard soils (Deluisa et al. 1996; Brun et al. 2001) or even more in the vicinity of copper-nickel smelters in the northern hemisphere, with 5800 mg kg^{-1} being measured in the organic layer of the strongest polluted places (Helmisaari et al. 1995). Copper is an essential micronutrient for higher plant growth and metabolism (Maksymiec 1997). However, its high bioavailability in soils make it a potentially toxic substance causing inhibition of growth and oxidative injuries (Hall 2002; Schützendübel and Polle 2002; Yruela 2005).

The formation of micronuclei (MCN) in root tips has been widely described and used as a bioassay for the evaluation of in vivo mutagenic effects of environmental pollutants on plants (Grant and Owens 1998; Knasmüller et al. 1998; Türkoglu 2007). MCN can be composed of small chromosome fragments resulting from chromosome breaks caused by clastogenic activity. The failure of entire chromosomes to migrate during anaphase as a result of the aneugenic effects of genotoxic agents can also lead to MCN formation (Krishna and Hayashi 2000; Çava and Ergene-Gözükara 2003).

In this study, we analysed and compared the potentially genotoxic effects of high Cu^{2+} concentrations on two closely related Fabaceae species, *Vicia faba* and *Pisum sativum*. Cytological analysis of *V. faba* meristematic root cells showed the potential clastogenic and aneugenic effects of Cu^{2+} on *V. faba* chromosomes. The different types of mitotic chromosomal abnormalities could be grouped into

D. Souguir · G. Ledoigt · P. Goupil (✉)
Laboratoire de Physiologie et Génétique Végétales, EA ERTAC,
Université Blaise Pascal-Clermont II,
Campus Universitaire des Cézeaux, 24, Avenue des Landais,
63177 Aubière, France
e-mail: Pascale.GOUPIL@univ-bpclermont.fr

D. Souguir · E. Ferjani
Laboratoire de Physiologie et Génétique des Plantes
à Intérêt Agronomique, Faculté des Sciences de Bizerte,
7021 Jarzouna, Tunisia

two classes, according to the structural and/or numerical disturbances that might lead to MCN formation.

Materials and methods

The genotoxicity of an essential heavy metal for meristematic root cells of two related Fabaceae species, *V. faba* and *P. sativum*, was analysed. Both species have a low chromosome number ($2n=12$ and $2n=14$, respectively), making them suitable for cytogenetic studies. Seeds of *V. faba* var. Aguadulce and *P. sativum* var. Douce de Provence were germinated on saturated paper at 25°C for 4 to 5 days, and transferred to a hydroponic support in the following nutrient solution (pH 7): 3.9 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 6.5 mM KNO_3 , 2 mM MgSO_4 , 0.9 mM KH_2PO_4 plus micro-nutrients: 90 μM Fe-ethylene diamine tetra-acetic acid, 2.7 μM MnSO_4 , 0.8 μM ZnSO_4 , 4.5 μM H_3BO_3 , 4 μM CuSO_4 and 2.0 μM $\text{Mo}_7\text{O}_{24}(\text{NH}_4)_6$. Once roots had reached a length of 2–3 cm, additional concentrations of CuSO_4 (1 to 50 mM) were added to the hydroponic solution for 42 h at 25°C with a light/dark photoperiod of 16:8 h. All tests were repeated three times, using a negative control (containing no additional Cu^{2+}), and nutrient solution containing 4×10^{-3} M maleic hydrazide (MH) as a positive control. MH is a herbicide known to be a mutagenic and clastogenic agent (Marcano et al. 2004).

Root tips (meristem zones) were cut and placed overnight in the dark in the Carnoy fixation solution containing ethanol and glacial acetic acid (3:1) at 4°C, and then stored in 70% ethanol. Root tips were rinsed with distilled water and hydrolysed with 1 N HCl for 10 min. The root cap was removed before squashing root tissues, and samples were stained with orcein. The slides were examined under a Zeiss microscope. At least three slides were stained per replica and at least 1000 cells were scored from each slide. Therefore, the analysis was conducted on an average of 9000 cells per treatment. MCN frequency was calculated from the number of MCN scored divided by the total cells scored, and expressed in terms of MCN/1000 cells.

Results and discussion

Micronuclei induction

In order to assess the genotoxic effects of Cu^{2+} , different concentrations were applied for a transient period of 42 h in hydroponic cultures. The frequencies of cells with Cu^{2+} -induced MCN in meristematic root tips of both plant species are presented in Fig. 1. Low MCN frequencies were detected in root tips of control plants. However, as

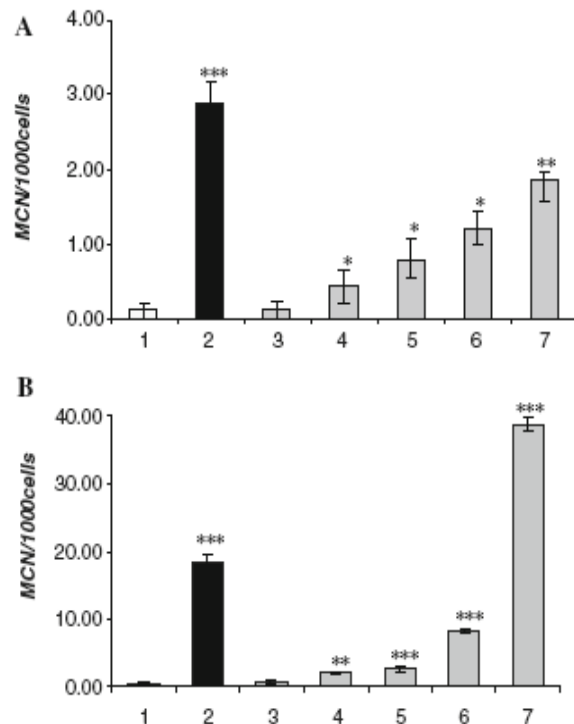
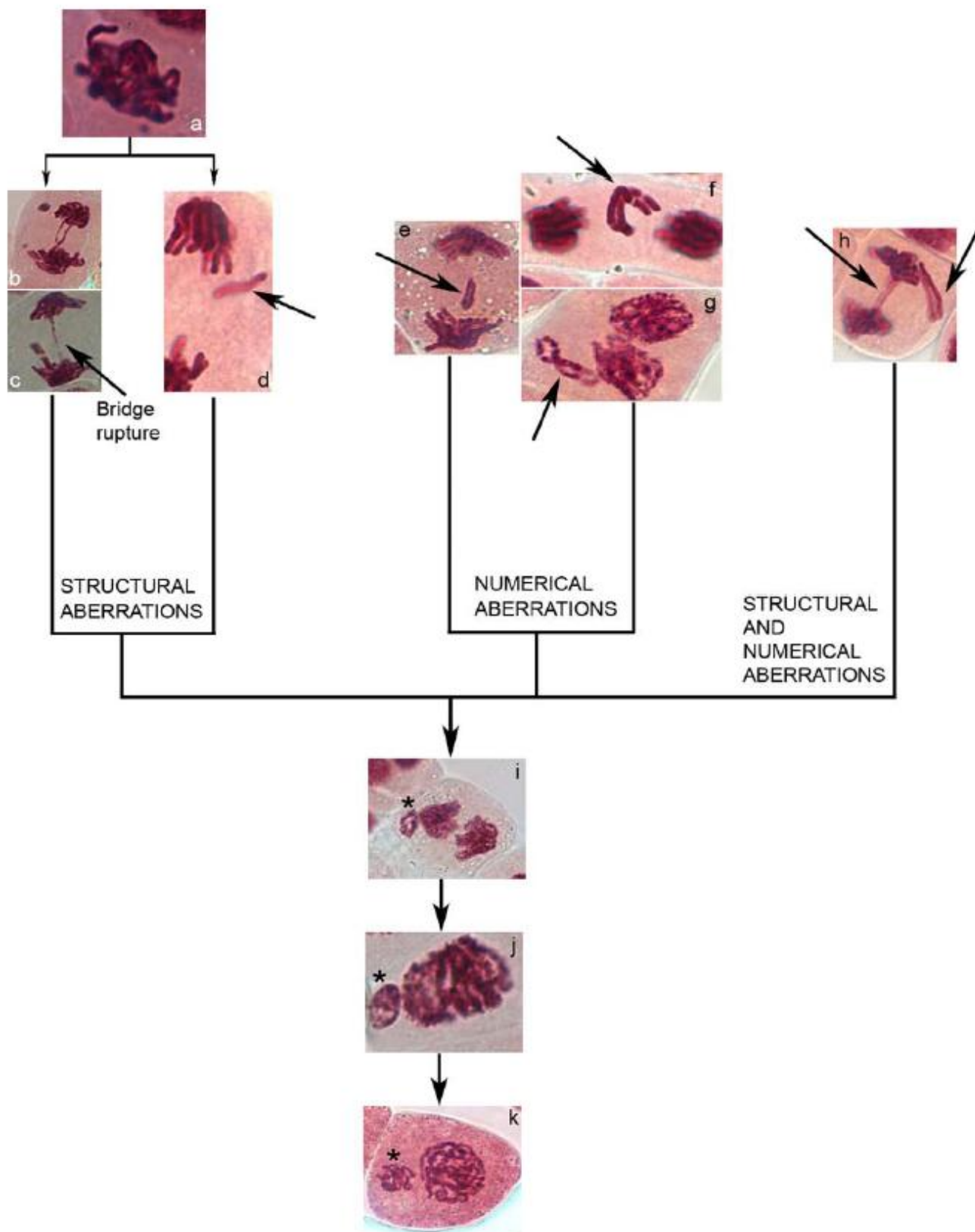


Fig. 1 Dose effect of Cu^{2+} on MCN induction in *Pisum sativum* (A) and *Vicia faba* (B) root cells. Empty bar: 1: Control, 2: MH, filled bar: CuSO_4 (3: 1 mM, 4: 2.5 mM, 5: 5 mM, 6: 10 mM, 7: 50 mM). Values are the means of three replicates. Bars indicate SD. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$

expected, MH dramatically increased the frequency of MCN in root meristems as compared to control plants, showing that this herbicide can be used as a positive control for genotoxicity studies.

Cu^{2+} significantly enhanced the frequency of MCN formation in the root tips of *V. faba* and *P. sativum* ($p \geq 0.05$). MCN induction was significant ($p < 0.05$) when 2.5 mM Cu^{2+} was used. In both plant species, the frequency of MCN formation was proportional to the Cu^{2+} concentration added to the hydroponic solution. In our experiments, the highest frequency of cells with MCN was detected in the presence of 50 mM Cu^{2+} . At this high Cu^{2+} concentration, the MCN frequency in root tips was dramatically higher in *V. faba* than in *P. sativum* (20 times

Fig. 2 Cytological analysis of chromosomal aberrations in *Vicia faba* meristematic root cells, illustrating the different origins of MCN formation. The mitotic chromosomal abnormalities can be grouped into two classes: structural and numerical aberrations. Both structural and numerical aberrations may be observed in mitotic cells. a: stickiness in metaphase, b and c: chromosome bridges in anaphase, d: chromosome breaks in telophase, e and f: laggard chromosomes in telophase, g: isolated chromosome in telophase, h: acentric chromosome and anaphase bridge, i and j: micronuclei in telophase and interphase, respectively, k: micronuclei in prophase. Arrows indicate the chromosomal aberrations and Asterisks the micronuclei



higher), suggesting that *V. faba* is more sensitive than *P. sativum*. The potential tolerance of *P. sativum* to chemicals has been demonstrated with MH treatment and other chemicals (Jain and Sarbhoy 1987a, b). As previously suggested (Ma et al. 1995), a greater total length of the diploid complement and higher number of metacentric chromosomes may result in greater sensitivity to DNA damage-inducing agents like heavy metals. *Vicia* contains long and thin chromosomes suitable for genotoxicity analysis, while *Pisum* contains shorter chromosomes (Blixt 1972). Further investigation is required to determine whether metacentric chromosomes present a potential target for heavy metal action.

Induction of chromosomal aberrations

We investigated chromosomal aberrations in *V. faba* root cells, since this species displayed higher sensitivity to Cu^{2+} in terms of MCN induction. In addition to MCN formation, cytological analysis of root meristems revealed drastic changes in the organization and morphology of chromosomes (Fig. 2). We could group the chromosomal abnormalities detected in meristematic cells into two classes: structural and numerical aberrations. Our results corroborate the documented MCN formation in animal cells containing chromosomal aberrations induced by exposure to genotoxic agents (Krishna and Hayashi 2000; Iarmarcovai et al. 2006). Chromosome stickiness should be the initial event that occurs in prophase cells. This has been described as chromosome agglutinations displaying a sticky appearance (Rieger et al. 1976) and a winding of chromosomal fibres created by chromatid bridges (Jiang et al. 2000). This phenomenon is regarded as a physiological effect exerted by chemical agents that may affect peripheral proteins such as DNA topoisomerase II (Gaulden 1987). According to Gömürgen (2005), this chromosomal abnormality leads to chromosome bridges, a result of the failure of free anaphase separation, unequal translocation or inversion of chromosome segments. Since stickiness holds the two chromosomes together, the separation process can lead to chromosome rupture, i.e. chromosome break formation. Therefore, chromosome stickiness, chromosome bridges and chromosome breaks are closely related. These chromosome aberrations, sticky metaphase, anaphase bridges and fragments of chromosomes in telophase (Fig. 2a–d), were detected during the mitotic phases when *V. faba* seedlings were incubated with Cu^{2+} . Since Cu^{2+} induced chromosome fragmentation, this heavy metal should be considered as a clastogenic agent.

Besides structural aberrations, Cu^{2+} also induced numerical aberrations in *V. faba* root meristems. Numerical aberrations resulting from acentric fragments or lagging chromosomes lead to aneuploidy, i.e. loss of genetic

material and MCN formation. Aneugenic effects are represented by laggard chromosomes (Fig. 2e) and acentric chromosomes in telophase (Fig. 2f,g). Figure 2h illustrates that anaphase bridges and acentric chromosomes, which lead to structural and numerical aberrations, respectively, can occur simultaneously in mitotic cells. Earlier reports have demonstrated that heavy metals can cause spindle perturbation. Several authors have described the alteration of chromosome numbers by environmental aneuploidy-inducing agents that induce microtubule and kinetochore disorganization in mitotic cells (Borboa and De la Torre 1996; Voutsinas et al. 1997; Seoane and Dulout 2001; Qian 2004). Dysfunction of the spindle mechanism is mainly due to the reactivity of metal ions with thiol groups of tubulin, a multi-cysteine protein in which the cysteine residues are actively involved in regulating microtubule-assembly dynamics (Chaudhuri et al. 2001). Since Cu^{2+} has a high affinity for sulphhydryl groups (Maksymiec 1997), the aneuploidy phenomenon observed in *Vicia* root meristems might be due to the high sensitivity of the microtubular apparatus to this ion.

The structural and numerical disturbances of chromosomes induced by the heavy metal during mitosis are expected to lead to MCN formation. Chromosome breaks or anaphase bridges, grouped into structural aberrations, result in chromosomal fragments segregating independently to daughter nuclei. Chromosome laggards or non-separated chromosomes, grouped into numerical aberrations, fail to migrate towards either of the daughter nuclei during telophase of the mitotic cells (Krishna and Hayashi 2000; Iarmarcovai et al. 2006). MCN formation was also obvious in *V. faba* root cells during telophase or interphase (Fig. 2i,j). Cells containing abnormal chromosomes could enter a new mitotic cycle (Fig. 2k).

To conclude, our work illustrates the genotoxic events leading to MCN formation through different pathways in the studied model plant. This is obvious even when an essential element like Cu^{2+} is used at a high concentration (>2.5 mM), causing chromosome breaks and chromosome migration impairment. This heavy metal, therefore, acts as a potent genotoxic agent.

In an environmental perspective, the bioavailability of Cu^{2+} might become an increasing concern for a range of living organisms including cultivated plants. The necessity to elucidate Cu^{2+} toxicity results from its systematic use as a fungicide, algicide or bactericide in agriculture. The evaluation of Cu^{2+} bioavailability is highly complex and plant species specific, since it is related not only to the physical-chemical properties of the soil but also to processes governed by plants (Hinsinger et al. 2006). Plant bioassay systems allowing the detection of cellular genotoxic events in meristems provide the best approach for assessing metal bioavailability, especially for Cu^{2+} which

accumulates substantially in the roots of plants. Another indicator of Cu^{2+} bioavailability has also been developed, in which Cu^{2+} uptake is estimated by quantifying the Cu^{2+} content of the plant (Brun et al. 2001). Combining plant bioassays and root analyses of Cu^{2+} content would allow us to define phytotoxicity thresholds in plants.

Acknowledgment This work was supported by a grant from ADEME "Bioindicateurs de Qualité des Sols" (PNETOX 2003).

References

- Blixt S (1972) Mutation genetic in *Pisum*. *Agric Hort Genet* 30:1–293
- Borboa L, De la Torre C (1996) The genotoxicity of Zn(II) and Cd(II) in *Allium cepa* root meristematic cells. *New Phytol* 134:481–486
- Brun LA, Maillet J, Hinsinger P, Pépin M (2001) Evaluation of copper availability to plants in copper-contaminated vineyard soils. *Environ Pollut* 111:293–302
- Çava T, Ergene-Gözükara S (2003) Evaluation of the genotoxic potential of lambda-cyhalothrin using nuclear and nucleolar biomarkers on fish cells. *Mutat Res/Genet Toxicol Environ Mutagen* 534:93–99
- Chaudhuri AR, Khan IA, Ludueña RF (2001) Detection of disulfide bonds in bovine brain tubulin and their role in protein folding and microtubule assembly in vitro: a novel disulfide detection approach. *Biochemistry* 40:8834–8841
- Deluisa A, Giandon P, Aichner M, Bortolami P, Bruna L, Lupetti A, Nardelli F, Stringari G (1996) Copper pollution in Italian vineyard soils. *Commun Soil Sci Plant Anal* 27:1537–1548
- Gaulden ME (1987) Hypothesis: some mutagens directly alter specific chromosomal proteins (DNA topoisomerase II and peripheral proteins) to produce chromosomal aberrations. *Mutagenesis* 2:357–365
- Gömürgen AN (2005) Cytological effect of the potassium metabisulfite and potassium nitrate food preservative on root tips of *Allium cepa* L. *Cytologia* 70:119–128
- Grant WF, Owens E-T (1998) Chromosome aberration assays in *Crepis* for study of environmental mutagens. *Mutat Res* 410:291–307
- Hall JL (2002) Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *J Exp Bot* 53:1–11
- Helmisaari H-S, Derome J, Fritze H, Nieminen T, Palmgren K, Salemaa M, Vanha-Majamaa I (1995) Copper in Scots pine forests around a heavy-metal smelter in South-Western Finland. *Water Air Soil Pollut* 85:1727–1732
- Hinsinger P, Plassard C, Jaillard B (2006) Rhizosphere: a new frontier for soil biogeochemistry. *J Geochem Explor* 88:210–213
- Iamarcovai G, Botta A, Orsière T (2006) Number of centromeric signals in micronuclei and mechanisms of aneuploidy. *Toxicol Lett* 166:1–10
- Jain AK, Sarbhoy RK (1987a) Cytogenetical studies on the effects of some chlorinated pesticides. I. Effect on somatic chromosomes of *Lens* and *Pisum*. *Cytologia* 52:47–53
- Jain AK, Sarbhoy RK (1987b) Cytogenetical studies on the effects of some chlorinated pesticides. I. Effect on meiotic chromosomes of *Lens* and *Pisum*. *Cytologia* 52:55–61
- Jiang W, Liu D, Li A (2000) Effects of Cu^{2+} on root growth, cell division and nucleolus of *Helianthus annuus* L. *Sci Tot Environ* 256:59–65
- Knasmüller S, Gottmann E, Steinkellner H, Fomin A, Pickl C, Paschke A, Göd R, Kundi M (1998) Detection of genotoxic effects of heavy metal contaminated soils with plant bioassays. *Mutat Res* 420:37–48
- Krishna G, Hayashi M (2000) *In vitro* rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. *Mutat Res* 455:155–166
- Ma TH, Xu Z, Xu C, McConnell H, Rabago EV, Arreola GA, Zhang H (1995) The improved *Allium/Vicia* root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants. *Mutat Res* 334:185–195
- Maksymiec W (1997) Effect of copper on cellular processes in higher plants. *Photosynthetica* 34(3):321–342
- Marcano L, Carruyo MH, Del Campo A, Montiel A (2004) Cytotoxicity and mode of action of maleic hydrazide in root tips of *Allium cepa*. *Environ Res* 94:221–226
- Qian X-W (2004) Mutagenic effect of chromium trioxide on root tip cells of *Vicia faba*. *J Zhejiang Univ Sci* 5:1570–1576
- Rieger R, Michaelis A, Green MM (1976) Glossary of genetics and cytogenetics: classical and molecular. Springer, Berlin, p 139
- 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
- Seoane AI, Dulout FN (2001) Genotoxicity ability of cadmium, chromium and nickel salts studied by kinetochore staining in the cytokinesis-blocked micronucleus assay. *Mutat Res* 490:99–106
- Türkoglu S (2007) Genotoxicity of five food preservatives tested on root tips of *Allium cepa* L. *Mutat Res* 626:4–14
- Voutsinas G, Zarani F, Kappas A (1997) The effect of environmental aneuploidy-inducing agents on the microtubule architecture of mitotic meristematic root cells in *Hordeum vulgare*. *Cell Biol Int* 21:411–418
- Yruela I (2005) Copper in plants. *Braz J Plant Physiol* 17(1):145–156

Résumé

Des plantules de fève (*Vicia faba*), âgées de 12 jours, sont traitées en conditions hydroponiques par 50, 100 et 200µM de chlorure de cadmium pendant 12, 24 et 48 h. Les signes d'intoxication se manifestent par des perturbations de la croissance foliaire et racinaire accompagnées d'un brunissement des racines traitées. Nos résultats ont aussi montré, une diminution de la teneur en chlorophylle totale, un désordre nutritionnel et des perturbations de l'absorption de l'eau dans les plantules de fève traitées. Concernant la répartition de Cd entre les feuilles et les racines de fève, nous avons montré un faible passage des ions métalliques vers les feuilles et une localisation préférentielle de ces ions dans les racines.

La présence des ions cadmiques dans la solution nutritive a entraîné l'installation d'un état de stress oxydant caractérisé par une production accentuée de O₂^{•-} et de H₂O₂ dans les racines et les feuilles de plantules de fève traitées. Dans les racines, la production de radicaux d'oxygène actif s'accompagne d'une augmentation de la production de MDA (malondialdéhyde), une stimulation de l'activité lipoxigénasique (LOX) au début du traitement et un accroissement du taux de mort cellulaire. Dans les feuilles traitées par le Cd, nous n'avons pas montré des modifications de la production de MDA par rapport aux témoins.

Face au stress cadmique, les plantules de fève mobilisent des systèmes antioxydants pour éliminer les espèces réactives de l'oxygène (ROS). Nous avons noté des perturbations des activités des enzymes antioxydantes (SOD, CAT, GPX, et des enzymes du cycle ascorbate-glutathion), des modifications des rapports ASA/DHA et GSH/GSSG et une production accentuée des composés phénoliques. Dans les racines, organes qui accumulent le Cd, nous avons noté une augmentation de la teneur en phytochélatines et une modification de l'expression de certains gènes liés au stress métallique (*hsp70.1*, *MT2*, *CuZnSODcy*, *Cat*, *GR*). Dans les zones méristématiques de ces organes, nous avons montré aussi une baisse de l'indice mitotique, une induction des micronoyaux et l'apparition d'anomalies chromosomiques touchant la structure et le nombre des chromosomes.

Abstract

twelve day old bean seedlings (*Vicia faba*) were treated in hydroponic conditions with 50, 100 and 200µM cadmium chloride for 12, 24 and 48 h. Cd induced a growth inhibition in both leaves and roots and a brownish colour in treated roots. Our results showed a decline in total chlorophyll, a nutritional disorder and disturbance of water absorption. A higher Cd accumulation is shown in roots with increasing concentrations of cadmium chloride.

The Cd induced several changes on the antioxidant cell state characterized by an overproduction of O₂^{•-} and H₂O₂ in both bean seedling leaves and roots. In roots, the production of harmful radicals is accompanied by increased production of MDA (malondialdehyde), a stimulation of lipoxigenase (LOX) activity and an increase of the rate of the cell death. In Cd-treated leaves, we have not shown changes in the MDA production when compared with controls. Based on our results, we noted significant disturbance of the activity of antioxidant enzymes (SOD, CAT, GPX, and ascorbate-glutathione cycle enzymes), changes in ratio of ASA/DHA and GSH/GSSG and an enhanced production of phenolic compounds. In roots, we noted an increase in the phytochelatin content and a change in the expression of some stress-related genes like *hsp70.1*, *MT2*, *CuZnSODcy*, *Cat*, *GR*. In the root tip cells, we have shown a decrease in the mitotic index, the induction of micronuclei and chromosomal abnormalities.

