

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem
Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie
Département d'Agronomie



Mémoire
Pour l'obtention du diplôme de
Magistère
Option : biotechnologie végétale

Présenté par :

M. MESNOUA Mohammed

THEME

Caractérisation enzymatique d'*Atriplex halimus* soumis aux stress des métaux lourds, cas du Cuivre.

Soutenu le : / /2010

Devant le jury :

M. BOUDEROUA K.	M.C. Université de Mostaganem	Président.
M. BAKHTI A.	M.C. Université de Mostaganem	Examineur
M. REGUIEG YSSAAD H.A.	M.C. Université de Mostaganem	Examineur
M. LOTMANI B.	M.C. Université de Mostaganem	Promoteur
M. MEDJAHED M.	M.A. Université de Tlemcen	Co-promoteur

Année universitaire : 2009/2010

Résumé

Notre étude porte sur l'effet des métaux lourds (cas du Cu) sur la plante d'*Atriplex halimus* cultivée en condition hydroponique. L'objectif de cette étude est d'analyser un certains nombres de systèmes enzymatiques de la plante en réponse aux stress provoqués par le cuivre (sous forme de CuSO₄).

Les analyses portent sur les profils enzymatiques, sur la teneur en protéines et le contenu en chlorophylle dans les feuilles *A. halimus*.

La plante a été soumise à différentes concentrations en CuSO₄ (50, 500, 1000 et 2000 µM). Les échantillons sont prélevés pour analyse après 6, 24 et 48 heures. Les résultats montrent que le contenu en chlorophylle diminue significativement avec l'accroissement de la dose en Cu, et à l'inverse la teneur en protéine subit une légère diminution après 6^h (38%) à 2000 µM Cu, puis une augmentation jusqu'à 155% à 500 µM après 48^h. Le gel d'électrophorèse en condition non dénaturante (PAGE) a révélé trois isoformes CAT, trois isoformes SOD et cinq isoformes POX. Une nouvelle isoforme SOD et deux nouvelles isoformes CAT par rapport au témoin ont été trouvées suite au traitement en Cu. La densité des bandes de ces trois enzymes s'accroît avec l'augmentation de la concentration du Cu.

Mots clés : *Atriplex halimus*; Cuivre (Cu); Stress oxydant; Superoxyde dismutase (SOD); Catalase (CAT); Peroxydase (POX); Isoenzyme.

Abstract

Our study showed the effect of heavies metals (Cu) on *Atriplex halimus* grown in hydroponics conditions. The aim of this work was to investigate some enzymatic systems response of this plant to copper stress.

Analyses were carried in enzymatic profiles, protein tenor and chlorophyll content in *A. halimus* leaves.

This plant was subject to different concentrations of CuSO₄ (50, 500, 1000 and 2000 µM) and samples were analyse after 6, 24 and 48hour. Results demonstrate that chlorophyll content declined progressively with increasing concentrations of copper. In contrast, protein content decreased after 6 hour to 38% at 2000 µM CuSO₄, and then increased after 48 hour to 155% at 500 µM CuSO₄. Non-denaturing PAGE revealed three CAT isoformes, three SOD isoformes and five POX isoformes. One new SOD isoforme and two news CAT isoformes were found as respond to high concentration of Cu. The bands density of these enzymes increased with increasing of Cu-dose.

Keywords: *Atriplex halimus*, Copper (Cu); Oxidative stress; Superoxyde dismutase (SOD); Catalase (CAT); Peroxydase (POX); Isoenzyme.

تلخيص

تقوم دراستنا على إظهار أثر المعادن الثقيلة (حالة النحاس) على نبتة القطف " *Atriplex halimus*" مزروع في وسط مخبري مراقب. و الهدف من هذه الدراسة هو تحليل بعض إنزيمات هذه النبتة في ردها على ضغط معدن النحاس.

التحليلات أجريت على الجانب الإنزيمي و كمية البروتينات و اليخضور أ و ب في أوراق هذه النبتة.

عرضت هذه النبتة لمختلف كميات النحاس (50، 500، 1000 و 2000 ميكرومولار) و أخذت العينات بعد 6 ، 24 و 48 ساعة. النتائج المتحصل عليها أظهرت أن كمية اليخضور انخفضت مع تزايد كمية معدن النحاس في الوسط . في المقابل انخفضت كمية البروتينات بعد 6 ساعات من بدأ الفحص الى 38 % بالنسبة إلى 2000 ميكرومولار، ثم بدأت في الارتفاع حتى 155% بالنسبة إلى 500 ميكرومولار بعد 48 ساعة. الفصل الكهربائي الغير المفسد على جل متعدد الأكريلاميد أظهر و جود ثلاث أشكال من الكتلانز، ثلاث أشكال من سوبارأكسيد ديستماز و خمسة أشكال من البيروكسيداز. تم ظهور شكل جديد من سوبارأكسيد ديستماز و شكلان للكتلانز استجابة لتزايد كمية النحاس في الوسط. و عرفت كثافة الأشرطة الموافقة لهذه الإنزيمات على الجل تزايد مع تزايد كمية النحاس في الوسط.

الكلمات المفاتيح: القطف "*Atriplex halimus*" ، النحاس، الإجهاد التأكسدي، سوبارأكسيد

ديستماز(SOD)، الكتلانز(CAT) و البيروكسيداز(POX)، الايزوانزيمات.

REMERCIEMENTS

En tout premier lieu je me dois de remercier **Allah** le tout puissant de m'avoir donnés les ressources morales, physiques, matériels et intellectuelles pour terminer ce travail.

Mes remerciements les plus forts vont à **M. LOTMANI B.**, Maître de conférences à l'Université de Mostaganem, qui m'a permis d'effectuer ma thèse sous leur direction et pour la confiance qu'il a su m'accorder.

J'adresse tous mes sincères remerciements à Monsieur le Docteur **BOUDEROUA K.**, qui me fait l'honneur de présider le jury de mon mémoire.

Je remercie vivement Monsieur le Docteur **BAKHTI A.**, je lui suis très reconnaissant d'avoir accepté d'être examinateur de mon travail.

Je tiens à remercier également Monsieur le Docteur **RGUEG YSSAAD H.A.**, pour avoir accepté de participer à mon jury.

Je ne voudrais pas oublier non plus l'aide, les conseils et les encouragements prodigués par Monsieur **MEDJAHED M.**

Ma reconnaissance s'adresse également à ma famille et à mes proches amis qui ont du supporter mes écarts de rythme de vie et d'humeur et qui m'ont toujours soutenu et encouragé, même dans les périodes les plus difficiles.

Abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction.....	1
Chapitre I : <i>Atriplex halimus</i>	2
I.1 Généralités.....	2
I.2 Systématique et répartition géographique.....	2
I.3 Description de l'espèce.....	3
I.4 Intérêts d' <i>A. halimus</i>	5
I.4.1 Intérêt fourrager.....	5
I.4.2 Intérêt écologique.....	5
I.4.2.1 Fixation des dunes.....	5
I.4.2.2 Phytoremédiation.....	6
I.5 Résistance d' <i>A. halimus</i> aux différents stress.....	6
I.5.1 Résistance à la salinité.....	7
I.5.2 Résistance au froid.....	7
I.5.3 Résistance aux métaux lourds.....	7
I.5.4 Résistance à la sécheresse.....	8
I.5.5 Résistance à l'ensoleillement accru.....	8
Chapitre II : Tolérance des plantes aux stress des métaux lourds.....	9
II.1 Quelques définitions.....	9
II.1.1 Éléments traces.....	9
II.1.2 Définition des métaux lourds, micro-polluants métalliques, oligo-éléments, contaminants stricts.....	9
II.2 Stratégies impliquée dans la tolérance.....	10
II.3 Les métaux lourds dans la plante.....	11
II.3.1 Pénétration des éléments traces par les parties aériennes.....	11

II.3.2 Absorption racinaire.....	12
II.3.3 Translocation.....	13
II.3.4 Accumulation.....	13
II.3.5 Les excréctions des éléments-traces par la plante.....	15
II.4 Toxicité et tolérance.....	15
II.4.1 La membrane plasmique.....	16
II.4.2 Système anti-oxydant.....	16
II.4.2.1 Les métaux lourds induisent l'accumulation de ROS.....	16
II.4.2.2 Le système anti-oxydant contrôle la production de ROS.....	17
II.4.3 La chélation et la compartimentation cellulaires.....	18
II.4.3.1 La chélation.....	18
II.4.3.2 La compartimentation.....	21
Partie expérimentale.....	22
Chapitre I : culture hydroponique.....	22
I.1 Prélèvement des semences.....	22
I.2 Mise en culture hydroponique.....	22
Chapitre II: caractérisation biochimiques.....	25
II.1. Electrophorèse.....	25
II.1.1. Extraction des enzymes.....	25
II.1.2. Extraction des protéines.....	25
II.1.3. Réalisation de l'électrophorèse:.....	25
II.1.3. Révélation.....	26
II.1.4. Numérisation et fixation.....	26
II.2. Dosage des protéines.....	27
II.3. Dosage de la chlorophylle.....	27
II.4. Analyse statistique.....	27
Résultats.....	29
Effet de cuivre sur la teneur en chlorophylle et protéines.....	29

Les isoenzymes de la peroxydase (POX).....	31
Les isoenzymes de la superoxyde dismutase (SOD)	32
Les isoenzymes de la catalase (CAT)	33
Discussion	35
Conclusion	39
Références bibliographiques	40
Annexes:	47

Abréviations

APX	ascorbate peroxydase
Asc	Acide ascorbique
CAT	Catalases
DHA	Déhydroascorbate
DHAR	Déhydroascorbate réductase
GR	Glutathion réductase
GSH	Glutathion
H₂O₂	Peroxyde d'hydrogène
HMW	High Molecular Weight
HSP	Protéines de choc thermique
LMW	Low Molecular Weight
MDHA	Monodéhydroascorbate
MDHA	monodéhydroascorbate
MDHAR	Monodéhydroascorbate réductase
MT	Métallothionéines
OH⁻	Anion hydroxyl
PC	Phytochélatines
PCS	phytochélatine synthase
POX	Peroxydases
ROS	Réactive Oxygen Species
SOD	Superoxyde-dismutases
•O₂⁻	Anion superoxyde
•OH	Radical hydroxyl
IRT1	Iron transporter 1
ZIP	Zinc transporter
SDS	Sodium-dodecyl-sulphate
PBS	Phosphate-buffered saline
FM	Front de migration

Liste des figures

Figure 01 : Touffe d'*Atriplex halimus*

Figure 02: Epis (a) et Graines avec bractées (b)

Figure 03 : Inflorescence et feuilles d'*Atriplex halims*

Figure 04: Mécanismes impliqués dans l'accumulation des métaux chez les plantes.

Figure 05 : Mécanismes et complexes possibles facilitant le transport et la séquestration des polluants toxiques.

Figure 06 : Plantules d'*A. halimus* de 3 semaines en chambre de culture.

Figure 07 : L'effet du cuivre sur les feuilles d'*A. halimus* après 48h de traitement.

Figure 08: SDS-PAGE des extraits protéiques des feuilles d'*A. halimus* après 48h de traitement par le cuivre.

Figure 09 : L'effet du cuivre sur les isoenzymes de la peroxydase (POD) des feuilles d'*A. halimus* après 2 jours de traitement. Les différents isoformes sont numérotés de la cathode vers l'anode. Approximativement 50 µl d'extrait par puits.

Figure 10 : L'effet du cuivre sur les isoenzymes de la superoxyde dismutase (SOD) des feuilles d'*A. halimus* après 2 jours de traitement. Les différents isoformes sont numérotés de la cathode vers l'anode. Approximativement 50 µl d'extrait par puits.

Figure 11: Profil densitométrique pour les isoenzymes de la Superoxyde dismutase (SOD) séparées dans le gel de polyacrylamide de la cathode vers l'anode. DO: Densité Optique.

Figure 12 : L'effet du cuivre sur les isoenzymes de la catalase (CAT) des feuilles d'*A. halimus* après 2 jours de traitement. Les différents isoformes sont numérotés de la cathode vers l'anode. Approximativement 50 µl d'extrait par puits.

Figure 13 : Profil densitométrique pour les isoenzymes de la Catalase (CAT) séparées dans le gel de polyacrylamide de la cathode vers l'anode. DO: Densité Optique.

Liste des tableaux

Tableau 01 : solution nutritive de base

Tableau 02 : L'effet du sulfate de cuivre (CuSO_4) sur le contenu en chlorophylle a et b d'*A. halimus* soumis en conditions hydroponiques.

Tableau 03 : L'effet du sulfate de cuivre sur la concentration des protéines d'*A. halimus* soumis en conditions hydroponiques.

Introduction

Les stress des plantes provoqués par la salinité, la sécheresse, la température, l'oxygène, et les métaux lourds... sont les principaux facteurs de la réduction du rendement. Ils mènent à la génération des espèces réactives de l'oxygène (ROS) tel que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), l'anion superoxide (O_2^-) et le radical hydroxyl ($OH\cdot$). Le rôle des métaux lourds dans la formation des ROS est lié à leur capacité à exister sous différents états d'oxydation. Dans les conditions normales la production de ces ROS est basse et étroitement contrôlée. Laisser s'accumuler, ces ROS peuvent endommager les composants cellulaires en perturbant sévèrement les fonctions métaboliques tels que l'inhibition de la biosynthèse de la chlorophylle, la peroxydation des lipides membranaires, l'oxydation des protéines, l'inhibition des enzymes et le dommage d'ADN et d'ARN.

Les plantes répondent au stress oxydant en activant leurs systèmes antioxydants, composés de molécules et enzymes antioxydantes. Ces systèmes jouent un rôle central dans la détoxification des métaux lourds ayant pénétrés dans la cellule. Ainsi, le pouvoir d'une plante d'améliorer la capacité de son système antioxydant peut être un élément essentiel dans la tolérance aux stress. Il est donc important de bien comprendre d'une part les événements conduisant à un stress oxydant et d'autre part les mécanismes biochimiques impliqués dans la réponse à ce stress.

Trois activités enzymatiques clefs occupent une place centrale dans les mécanismes de détoxification des ROS : il s'agit des superoxyde-dismutases (SOD, EC 1.15.1.1.), des catalases (CAT, EC 1.11.1.6.) et des peroxydases (POX, EC 1.11.1.7.). Ces enzymes ont une action complémentaire sur la cascade radicalaire au niveau de l'anion superoxyde et du peroxyde d'hydrogène, conduisant finalement à la formation d'eau et d'oxygène moléculaire.

Atriplex halimus (Chenopodiaceae) est un arbuste fourragère xérohalophyte, très abondant dans les steppes salines d'Algérie. Elle résiste bien aux conditions environnementales extrêmes des régions arides et semi-arides. Des études récentes ont rapporté que cette espèce est présente dans des sols pollués par les métaux lourds, et elle est capable de tolérer des doses élevées de : Cd, Zn, Pb et Cu. Cependant, peu de données sont disponibles concernant l'effet des métaux lourds, tel que le cuivre sur le système antioxydant de cette plante.

Par conséquent, l'objectif de cette étude étant d'examiner les effets du cuivre sur le système antioxydant, le contenu en chlorophylle et la teneur en protéines dans les feuilles d'*A. halimus* cultivée dans des conditions hydroponiques. Dans le cadre de cette approche, nous avons analysé quelques aspects biochimiques impliqués dans la réponse à différentes concentrations de Cu dans les feuilles de l'espèce. Nous avons analysé donc 03 systèmes enzymatiques essentiels dans la défense antioxydante ; SOD, POX et CAT, ainsi que la teneur en chlorophylle et en protéines.

Chapitre I : *Atriplex halimus*

I.1 Généralités

Dans les zones arides et semi arides, les plantes halophytes dominant souvent en raison de leur tolérance à la sécheresse et à la salinité (**Alazzeh et Abu-Zanat, 2004**). Parmi ces plantes, celles qui appartiennent au genre *Atriplex* sont connues pour être tolérantes à la sécheresse, et pouvoir se développer dans des conditions défavorables pour d'autres espèces (**Pasiecznik et al., 1996 ; Ferchichi, 2005**). Le genre *Atriplex* (famille des Chénopodiacées) compte environs 400 espèces réparties dans les zones tempérées, méditerranéennes et subtropicales (**Le Houérou, 1992**). La plupart de ces espèces se développent dans des régions arides et salines, bien que certaines soient implantées dans des marais salants ou des marais d'eau douce (**Kelley et al., 1982**).

Parmi les espèce d'*Atriplex* les plus étudiées se placent ; *A. nummularia*, *A. canescens*, *A. glauca*, et *A. halimus*. C'est à cette dernière que notre travail s'intéresse.

A. halimus est une espèce pérenne, spontanée des régions méditerranéennes arides et semi-arides. L'espèce constitue une source importante pour le cheptel, essentiellement en période de disette et présente une palatabilité et une appétibilité très satisfaisantes (**El-Shatnawi et Turuk, 2002**). Cet arbuste possède des caractéristiques qui en font une excellente espèce pour la réhabilitation des zones pastorales dégradées. Elle tolère bien les conditions extrêmes telles que ; la salinité (**Wong et Jager, 1978 ; Bajji et al., 1998**), l'ensoleillement accru (**Streb et al., 1997**), la sécheresse (**Martinez et al., 2004**) et le froid (**Salahas et al., 2002 ; Walker et al., 2008**), de plus, des études récentes ont montré son caractère de résistance aux stress des métaux lourds (**Lutts et al., 2004 ; Nedjimi et Daoud, 2008 ; Lefèvre et al., 2009 ; Manousaki et Kalogerakis, 2009**).

I.2 Systématique et répartition géographique

Règne : Plantae.

Sous règne: Tracheobionta ou Plantes vasculaires

Embranchement: Magnoliophyta ou Spermaphytes Angiospermes

Classe : Magnoliopsida ou Dicotylédones.

Sous classe: Caryophyllidae

Ordre : Caryophyllales

Famille : Chenopodiaceae

Genre : *Atriplex*

Espèce : *Atriplex halimus*

A. halimus est la plante indigène la plus représentée sur le pourtour méditerranéen et au Moyen Orient, couvrant pas moins de 80 000 ha en Syrie, Jordanie, Egypte, Arabie Saoudite, Libye et Tunisie (Martinez et al., 2003 ; Ortiz-dorda et al., 2005). Cette plante, se retrouve aussi en France, en Espagne, au Portugal, en Italie, en Grèce, en Albanie, à Malte, à Chypre, en Israël, en Algérie, au Maroc, et en Afrique du Sud à des altitudes comprises entre 0 et 1000 mètres (Le Houérou, 1992).

I.3 Description de l'espèce

A. halimus est un arbuste ramifié presque de la base, et peut atteindre jusqu'à 3 m de hauteur et 3 m de diamètre (Fig. 01).



Figure 01 : Touffe d'*Atriplex halimus*

Les graines d'*A. halimus* sont des akènes (Fig. 02), entourées par des bractées dures et persistantes. (Piotto et al., 2003). Elles arrivent à maturité et peuvent être récoltées du début d'hiver jusqu'au printemps. Leur ramassage est facile du fait que les fruits restent longtemps attachés à la plante. Leur dissémination se fait par le vent ou par des animaux. Elles présentent un polymorphisme morphologique et physiologique, ce dernier est souvent lié à la tolérance aux sels. Leur taille varie entre 0,6 à 2 mm, et un Kilogramme peut en contenir jusqu'à 2000000 graines. Elles se conservent généralement bien, si elles sont stockées au sec et au frais, elles peuvent conserver leur viabilité pendant 3 à 10 ans, et garder une faculté germinative estimée entre 50 et

90% (Piotto et al., 2003). Cependant, leur germination peut être entravée à cause des problèmes d'indéhiscence et d'imperméabilité à l'eau et aux gaz que représentent leurs bractées dures qui, de plus, contiennent des substances qui inhibent la germination et dont l'élimination peut l'augmenter de 35 à 98 % (Irwin et al., 2001).



A



B

Figure 02: Epis (a) et Graines avec bractées (b)

Les structures florales d'*A. halimus* présentent de grand polymorphisme. Elles sont de très petites tailles, de couleur jaunâtres (floraison de juillet à septembre), cachées entre les bractées, en long glomérule (**Fig. 03**). Cette espèce a été considérée comme monoïque ou dioïque, elle porte des types floraux, morphologiquement et fonctionnellement hermaphrodites, jamais décrits jusqu'à présent (Talamali et al., 2003). Il existerait deux types d'architecture florale de base: l'une est constituée de fleurs mâles pentamères et l'autre, de fleurs femelles munies d'un unique carpelle inséré entre deux bractées opposées. A partir de ces deux types, des fleurs bisexuées peuvent apparaître, conduisant à un nombre total de 6 types floraux dont les proportions et la distribution sur les rameaux sont fonction des conditions environnementales, en particulier de la durée du jour et de l'intensité lumineuse (Talamali et al., 2003).

Le feuillage persistant à semi persistant (suivant le climat). Les feuilles sont de formes ovales, alternées sur de petites tiges blanchâtres, coriace (**Fig. 03**), de couleur vert cendre à gris blanc ou gris argenté. Elles sont couvertes par une couche dense de poils (Migahid, 2003) et présentent un polymorphisme selon l'état physiologique de la plante et leurs positions sur l'axe. Elles peuvent être deltoïdo-orbiculaires à lancéolées avec un pétiole court.



Figure 03 : Inflorescence et feuilles d'*Atriplex halimus*

Le système racinaire pivotant présente un fort développement chez *A. halimus*, pouvant atteindre 10 mètres de profondeur (Le Houérou, 1992).

I.4 Intérêts d'*A. halimus*

I.4.1 Intérêt fourrager

Au vu de leur grande résistance à la sécheresse, à la salinité et à l'ensoleillement, les *Atriplex* constituent une réserve fourragère importante, utilisable par les ovins, les caprins et les camélidés. Sous des précipitations annuelles de 200 à 400 mm, *A. halimus* compte parmi les espèces les plus intéressantes, produisant de 2000 à 4000 kg de matière sèche par an et par hectare (Dutuit et al., 1991 ; Le Houérou, 1992). Les feuilles et les rameaux d'*A. halimus* ont un niveau élevé d'azote, et leur teneur en protéines est élevée (10 à 20 % de la MS) ce qui fait d'eux un bon fourrage source de protéines pour le bétail pendant les périodes de sécheresse d'été et d'automne (EL-Shatnawi et Munier, 2002).

I.4.2 Intérêt écologique

I.4.2.1 Fixation des dunes

Dans les régions méditerranéennes arides et semi-arides, le problème de la désertification se manifeste principalement par le recul de zones boisées et par la perte de végétation de zones steppiques à vocation pastorale. Le repeuplement à base de buissons fourragers constitue une excellente solution (Dutuit et al., 1991). En effet, *A. halimus* possède un système racinaire très

développé qui peut atteindre 10 m de profondeur (Le Houérou, 1992 ; Abbad et al., 2004), leur permettant ainsi d'utiliser les réserves d'eau du sol de façon exhaustive et de former un réseau dense susceptible d'agréger le sol et de le rendre résistant à l'érosion (Lutts et al., 2004). Ces caractéristiques font d' *A. halimus* un outil efficace et relativement peu coûteux dans la lutte contre l'érosion et la désertification et dans la réhabilitation des terres dégradées (Abbad et al., 2004).

I.4.2.2 Phytoremédiation

Les espèces d' *Atriplex* sont capable d'accumuler de grandes quantité de sélénium (Se), et certaines d'entre elles sont connues pour leur capacité d'accumulation du bore (B) et du molybdène (Mo). Des études récentes ont permis de souligner l'importance de l'espèce qui, soumise à de fortes doses de cadmium (Cd) ou de zinc (Zn), est capable d'en accumuler des quantités importantes (respectivement 830 et 440 mg/kg de matière sèche) sans présenter d'inhibition de croissance ou d'augmentation de la mortalité (Lutts et al., 2004). Cette tolérance au métaux lourds a été liée à la stimulation de la défense antioxydante et à la synthèse des composés osmoprotecteurs tels que la proline, le glycinebetaine, et les polyamines (Lutts et al., 2004). De ce fait elle peut être appréciée comme espèce prometteuse pour la phytostabilization et la phytoextraction des sols contaminés par, Cd, Zn et Pb (Lutts et al, 2004; Nedjimi et Daoud, 2008 ; Manousaki et Kalogerakis, 2009).

I.5 Résistance d' *A. halimus* aux différents stress

Les stress des plantes, provoqués par la salinité, la sécheresse, les températures extrêmes, l'oxygène, et les composés toxiques sont les principaux facteurs de la réduction du rendement. De même, l'ensoleillement accru mène à la génération des espèces réactives de l'oxygène, qui endommagent les cellules. Ces facteurs accroissent la menace du changement global de l'environnement qui exige le développement de nouvelles variétés résistantes aux conditions extrêmes (Rai et Takabe, 2006).

A. halimus est une espèce endémique des régions méditerranéennes arides et semi-arides fortement résistante aux différents stress tels que ; la salinité (Wong et Jager, 1978 ; Bajji et al, 1998), l'ensoleillement accru (Streb et al., 1997), la sécheresse (Martinez et al, 2004), les métaux lourdes (Lutts et al, 2004; Nedjimi et Daoud, 2008 ; Lefèvre et al, 2009 ; Manousaki et Kalogerakis, 2009) et le froid (Salahas et al., 2002 ; Walker et al, 2008).

I.5.1 Résistance à la salinité

A. halimus est particulièrement bien adapté aux régions arides affectées par la salinité. **Bajji et al, (1998)** ont démontré que cette espèce peut se développer en présence de 17,55g/l NaCl et peut survivre à une dose de 35,1 g /l NaCl, dose plus élevée que la concentration en sel de l'eau de mer. En outre, la croissance de ses pousses semble être stimulée en réponse à une dose de 8,7 g /l NaCl.

Chez cette espèce, la résistance à la salinité est souvent attribuée à la présence de vésicules en poils couvrant la surface des feuilles. De grandes quantités de sels se rassemblent dans ces sacs cellulaires pour être excrétées plus tard après éclatement (**Wong et Jager, 1978 ; Mozafar et Goodin, 1970**).

I.5.2 Résistance au froid

Les espèces d'*Atriplex* sont relativement tolérantes au froid et leur voie photosynthétique demeure active de 4 à 10 °C (**Walker et al, 2008**). Chez *A. halimus*, la phosphoenolpyruvate carboxylase et la pyruvate orthophosphate dikinase, deux enzymes de la voie photosynthétique des plantes en C4, peuvent être protégées du froid par des solutés compatibles, tels que la bétaine et la proline (**Salahas et al., 2002**).

Chez cette espèce la tolérance au froid semble dépendre de l'ajustement osmotique, conduit par l'accumulation vacuolaire de Na⁺ et K⁺, l'accumulation cytoplasmique des acides aminées, des composés d'ammonium quaternaire et en particulier, des sucres. Les populations diploïdes de cette espèce ont montré une plus grande acclimatation au froid que les tétraploïdes, ceci est apparemment dû à un plus grand ajustement osmotique et à des teneurs faibles en eau dans les feuilles (**Walker et al, 2008**).

I.5.3 Résistance aux métaux lourds

Des études récentes ont prouvé que l'arbuste méditerranéen *A. halimus* accumule de grandes quantités du Cd dans ses tissus (surtout dans les racines), suggérant la possibilité de leur utilisation dans la décontamination des sols pollués par le Cd (**Lutts et al, 2004 ; Nedjimi et Daoud, 2008**). **Lutts et al, (2004)**, rapportent cette tolérance à la fonction barrière de son système racinaire. Cette fonction implique la capacité d'accumuler des concentrations élevées du Cd dans les racines et de ce fait, de limiter sa translocation vers les organes aériens. Une autre méthode de la protection contre le Cd excessif consiste à la précipitation du Cd dans des cristaux d'oxalate dans les tiges (**Lutts et al, 2004**) et l'accumulation de la proline, un protecteur polyfonctionnel dans les cellules (**Nedjimi et Daoud, 2008**).

Dans les sols salins, la résistance de cet arbuste au Cd peut être améliorée de deux façons ; (i) en réduisant l'absorption et l'accumulation du Cd dans les pousses et (ii) en améliorant la tolérance au Cd accumulé par une plus grande synthèse des composés osmoprotecteurs (**Lefèvre et al, 2009**).

I.5.4 Résistance à la sécheresse

La résistance à la sécheresse est une caractéristique complexe impliquant plusieurs propriétés qui agissent l'une sur l'autre. Plusieurs espèces appartenant au genre *Atriplex* ont été étudiées pour leur résistance au stress hydrique et ont servi pour l'identification des mécanismes physiologiques et des gènes impliqués dans cette résistance. Il en découle que la forte résistance d'*A. halimus* à ce phénomène est assurée par la synthèse du glycinebetaine et de la proline, et par l'ajustement osmotique (**Martinez et al, 2004**).

I.5.5 Résistance à l'ensoleillement accru

Les populations d'*A. halimus* qui se développent dans les régions désertiques doivent s'adapter aux conditions extrêmes telle que l'intensité élevée du rayonnement solaire qui induit la photoinactivation de la catalase et du photosystème II chez différentes espèces végétales. La surface des feuilles chez cette espèce est recouverte par une couche non mouillable très réfléchissante, formée par des cristaux de sel et de cire, En outre, les feuilles verticales de cet arbuste interceptent considérablement moins de rayonnement solaire (**Streb et al, 1997**).

Chapitre II : Tolérance des plantes aux stress des métaux lourds

A des concentrations élevées, les micronutriments des plantes tels que le Fe, le Mn, le Cu et le Zn et d'autres métaux tels que l'Al, le Cd, le Pb et le Ni causent des effets phytotoxiques, qui incluent la réduction dans la croissance des racines, la réduction du contenu en chlorophylle et de la photosynthèse, l'inhibition des activités enzymatiques et des dommages aux chloroplastes et aux mitochondries. Ainsi, beaucoup d'espèces végétales se sont adaptées génétiquement et physiologiquement pour survivre dans des sols pollués par les métaux lourds. Il est commun de trouver des espèces de *Graminées*, de *Lamiacées*, de *Fabacées* et de *Brassicacées* largement distribués dans tous les écosystèmes contaminés à travers le monde (**Ramirez-Rodriguez et al ., 2005**).

II.1 Quelques définitions

II.1.1 Éléments traces

Les éléments sont dits traces par rapport à leur concentration massique dans un certain milieu. Lorsque leur teneur est inférieure à 1 pour mille en moyenne dans la croûte terrestre, ce sont des éléments traces de la croûte. Lorsque leur concentration est inférieure à 0,1 pour mille dans les êtres vivants (certains auteurs donnant une limite de 1 % dans les plantes), ils sont qualifiés d'éléments-traces des êtres vivants (**Tremel-Schaub et Feix, 2005**).

II.1.2 Définition des métaux lourds, micro-polluants métalliques, oligo-éléments, contaminants stricts

La dénomination élément-trace est parfois confondue avec celles de métal lourd, de micro-polluant métallique ou encore d'oligo-élément.

Le terme de micro-polluant métallique implique trois notions :

- élément-trace,
- qui pollue (c'est-à-dire dont l'accumulation, au-delà d'un certain seuil dans le milieu, revêt un danger pour les organismes),
- métallique.

Les oligo-éléments sont des éléments-traces indispensables aux êtres vivants. Ceux-ci sont carencés si la concentration de ces éléments dans leurs tissus est inférieure à un seuil. Les oligo-éléments ne sont pas les mêmes pour les animaux et pour les plantes.

Les métaux lourds sont des métaux formant des précipités insolubles avec les sulfures. D'autres définitions existent : métaux dont la masse volumique est supérieure à 6 g.ml⁻¹ (parfois la définition donne une limite de 4,5 ou 5,0 g.ml⁻¹) ; métal dont le numéro atomique est supérieur à 20 (Duffus, 2002 ; Polle et Schützendübel, 2004 ; Kvesitadze et al., 2006 ; Tremel-Schaub et Feix, 2005).

Dans le présent chapitre on utilise fréquemment les termes ; éléments-traces et métaux lourds pour relater la même notion.

II.2 Stratégies impliquée dans la tolérance

Le terme «**sensibilité**» décrit les effets du stress, qui peuvent aller jusqu'à la mort de la plante. Par opposition, le terme «**résistance**» fait référence à la réaction de la plante qui lui permet de survivre face au stress métallique et d'assurer sa descendance (Remon, 2006). Trois stratégies principales sont impliquées dans la tolérance des concentrations élevées des éléments traces par les plantes (Ramirez-Rodriguez et al., 2005 ; Leduc et Terry, 2006) :

- **La stratégie d'évitement** par laquelle les plantes se protègent du stress métallique en limitant leur absorption. Ceci peut être accompli par des moyens tel que l'excrétion des acides organiques chélateurs par les racines ou en changeant le pH dans la rhizosphère de sorte que les éléments traces soient convertis en forme moins bio-disponible (**fig. 04**). Dans plusieurs espèces des plantes, par exemple, la tolérance aux concentrations élevées d'aluminium est corrélée avec l'excrétion des acides organiques par la racine.

- **La stratégie d'emprisonnement** des métaux lourds dans les racines par la surproduction des molécules chélateurs (**fig. 04**). Cette stratégie est particulièrement efficace pour les métaux qui exercent leur toxicité dans les pousses, puisqu'ils sont empêchés de se transporter aux pousses.

- **La stratégie de détoxification** des métaux lourds ; par chélation, séquestration, ou le métabolisme aux formes moins toxiques (**fig. 04**).

Seulement cette dernière stratégie est utile pour la phytoextraction puisque les éléments traces sont accumulés dans des pousses facilement récoltables (Leduc et Terry, 2006).

II.3 Les métaux lourds dans la plante

Parmi l'ensemble des métaux lourds, une vingtaine d'entre eux sont indispensables aux processus physiologiques majeurs, en particulier la respiration, la photosynthèse ou l'assimilation des macronutriments (azote, soufre...) (**Kabata-Pendias et Pendias, 2001**). Nombre de ces métaux, Cu, Zn, Ni, Fe, Co, Se et Ba sont aussi impliqués au niveau de processus moléculaires tels que le contrôle de l'expression des gènes ; la biosynthèse des protéines, des acides nucléiques, des substances de croissance, de la chlorophylle et des métabolites secondaires ; le métabolisme lipidique ou la tolérance au stress. En outre, certains éléments trace peuvent se présenter sous différents états d'oxydation ($\text{Cu}^{2+} + e^- \rightarrow \text{Cu}^+$). Ils jouent ainsi un rôle d'accepteurs ou de donneurs d'électrons, très important dans les multiples systèmes enzymatiques mettant en jeu des réactions d'oxydoréduction (**Chaignon, 2001**). Pour autant, les métaux lourds n'ont pas tous une fonction connue à ce jour dans le métabolisme de la plante, et malgré la grande diversité des besoins et des niveaux de tolérance aux métaux lourds chez les plantes, certains restent considérés comme des poisons cellulaires pour lesquels les doses admissibles sont très faibles. On retrouve parmi les plus toxiques, Hg, Cr, Ni, Pb et Cd (**Kabata-Pendias et Pendias, 2001**).

Les plantes sont exposées de deux façons aux éléments-traces : par les parties aériennes et par les racines. Les éléments-traces peuvent être déposés à la surface des feuilles et des racines (dans ce cas un lavage à l'eau en enlève une partie) ou pénétrer dans la plante. Ils peuvent y pénétrer par les parties aériennes (feuilles, tiges, fruits), à partir de particules en suspension dans l'air, de composés gazeux (notamment pour le Hg et le Se) ou de composés dissous dans l'eau de pluie ou d'irrigation. Ils peuvent pénétrer par les racines à partir du sol (**Tremel-Schaub et Feix, 2005**).

II.3.1 Pénétration des éléments traces par les parties aériennes

La contamination par voie aérienne est généralement faible, sauf lorsque les retombées atmosphériques sont importantes dans certains lieux comme les zones industrielles ou pour certains éléments comme le Pb, à cause des résidus de combustion de l'essence plombée.

Les métaux lourds sous forme de poussière ou de gaz peuvent entrer directement par les stomates des feuilles. Une partie des retombées atmosphériques, solubilisée par l'eau de pluie ou d'irrigation, peut traverser la cuticule des feuilles et des fruits. Constituée d'un réseau imprégné de cires, la cuticule recouvre les organes aériens des plantes et n'existe pas sur les racines. Elle fonctionne comme un faible échangeur de cations. Un gradient de la plus basse à la plus forte densité de charge se met en place à partir de la surface externe vers les parois des cellules, la

pénétration des ions à travers la cuticule s'en trouvant favorisée le long de ce gradient. La perméabilité de la cuticule est ainsi supérieure pour les cations par rapport aux anions. Le passage des cations est inversement proportionnel à la taille du cation hydraté. La perméabilité de la cuticule est plus élevée au niveau des cellules stomatiques (**Tremel-Schaub et Feix, 2005**).

II.3.2 Absorption racinaire

Les éléments-traces sont prélevés sous des formes cationiques, sauf le Mo qui l'est sous forme d'anion (molybdate). Ils sont d'abord véhiculés dans l'apoplaste des racines, puis :

- une partie est transportée plus loin à l'intérieur des cellules (**fig. 04**),
- une partie est transportée plus loin dans l'apoplaste,
- une partie se fixe aux substances des parois cellulaires.

Les éléments-traces peuvent circuler dans la racine de deux façons, par la voie symplasmique et par la voie apoplastique (**Tremel-Schaub et Feix, 2005**).

Dans la voie symplastique, il s'agit d'une réelle absorption de l'élément par la cellule végétale, puisqu'il se trouve dans le milieu intérieur de la cellule. L'absorption se fait de trois manières (**Tremel-Schaub et Feix, 2005**) ; une absorption passive, une absorption passive demandant une dépense d'énergie de la part de la cellule, et la dernière est une absorption active (contre un gradient électrochimique). Certaines espèces végétales peuvent inhiber le transport des métaux à travers les membranes ou augmenter les mécanismes d'exclusion. *Silene vulgaris* et *Mimulus guttatus* montrent des capacités de résistance au Cu, dues à des changements structuraux dans la membrane plasmique, tandis que la détoxification par rapport au Zn a lieu à l'intérieur de la cellule (**Tremel-Schaub et Feix, 2005**).

Dans la voie apoplastique le transport des éléments métalliques se fait passivement à travers la paroi cellulaire par les pores du réseau de la cellulose, de l'hémicellulose et des glycoprotéines. Cependant, une partie des ions peut être adsorbés par les charges négatives de surface de l'acide polygalacturonique des pectines, qui agissent comme des échangeurs d'ions (**Briat et Lebrun, 1999**). La suite du transport vers les vaisseaux conducteurs de sève brute, le xylème, se fait donc par l'intérieur des cellules et nécessite donc une absorption réelle. Une fois dans le xylème, les éléments peuvent être transportés vers les parties aériennes de la plante (**Tremel-Schaub et Feix, 2005**). **Kabata-Pendias et Pendias, (2001)** ont rapporté que le plomb et le nickel sont absorbés passivement via certaines protéines de type porine, alors que le zinc et le cuivre sont absorbés activement par une protéine de transport sélective, nécessitant de l'énergie.

II.3.3 Translocation

Après leur absorption, le transport des éléments dans le xylème de la plante vers les parties aériennes, est appelé « translocation ». La sève xylémienne représente le principal moyen de transport des racines vers les parties aériennes pour les ions minéraux (**Tremel-Schaub et Feix, 2005**). Dans les vaisseaux xylémiens, les cations métalliques sont probablement transportés, au moins en partie, sous forme de composés cationiques ou anioniques de complexes organiques. Le Zn l'est sous forme chélatée à des acides organiques, le Cu l'est sous forme complexée à des acides aminés, tandis que le Cd l'est probablement sous forme d'ion bivalent et le Ni, sous forme d'un complexe Ni-peptide, voire d'un complexe Ni-histidine dans le cas des hyper-accumulateurs (**Prasad et Hagemeyer, 1999**).

Chez certaines espèces la translocation d'éléments toxiques est plus importante que chez d'autres, pouvant conduire à une accumulation des métaux dans les feuilles et les autres parties aériennes, sans que l'on sache avec rigueur si elle est due à un transport plus actif ou une absence d'immobilisation dans les racines.

Le transport des éléments-traces dans le phloème est probablement difficile car ce dernier est constitué de cellules vivantes contenant des substances et des ions sur lesquels il est facile de se fixer (**Tremel-Schaub et Feix, 2005**). Toutefois, certains auteurs suggèrent que la nicotinamide, qui a des propriétés de chélation vis-à-vis des métaux, pourrait servir de médiateur pour le chargement ou le déchargement des éléments-traces dans le phloème et prévenir leur précipitation dans la sève alcaline du phloème, et ainsi faciliter le transport des éléments-traces dans ce dernier (**Prasad et Hagemeyer, 1999**).

Les éléments-traces ont tendance à rester dans les racines, surtout quand l'apport est suffisant (pour les oligo-éléments). Il existe des « barrières physiologiques » empêchant le transfert de certains éléments (Cu, Zn, Co) des racines vers les parties aériennes. Le Pb est fortement immobilisé dans la paroi des cellules racinaires sous forme de pyrophosphate de Pb (**Tremel-Schaub et Feix, 2005**).

II.3.4 Accumulation

Certaines plantes accumulent des quantités exceptionnelles d'éléments métalliques ; plus de 100 fois que les autres espèces poussant dans le même environnement. Ces espèces sont alors qualifiées de plante «hyperaccumulatrice» (**Remon, 2006**). Les différents organes d'une même plante ont des teneurs contrastées. Généralement, les racines ont tendance à accumuler les éléments-traces, tels que Al, Cd, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb et Zn, et les parties reproductrices à les exclure. Par ailleurs, **Tremel-Schaub et Feix, (2005)** ont montré que les plantes herbacées dicoty-

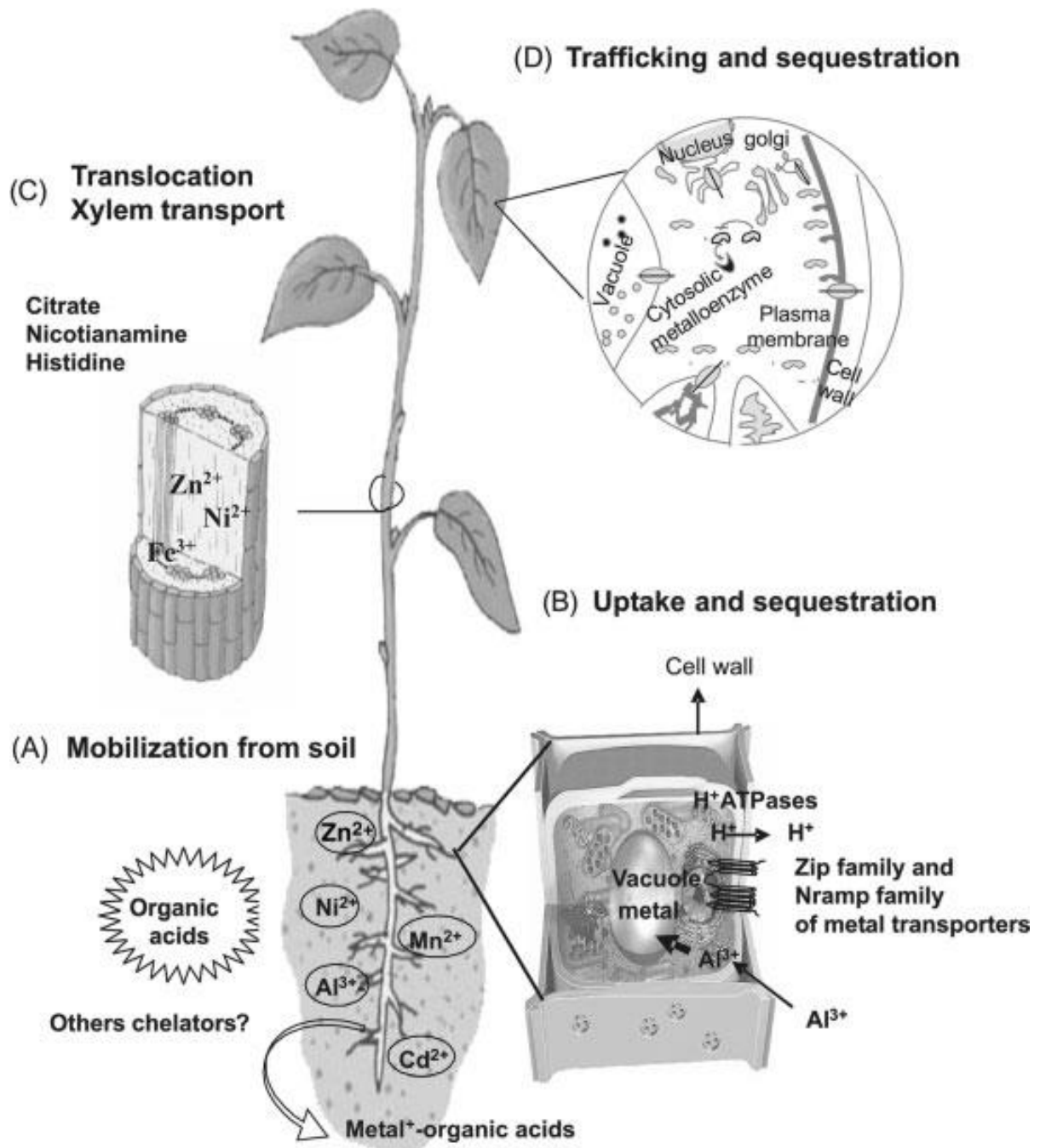


Figure 04: Mécanismes impliqués dans l'accumulation des métaux chez les plantes. (A) l'excrétion par les racines et l'acidification de la rhizosphère aident à la mobilisation des métaux dans le sol. (B) La prise des ions métalliques sous forme hydratées ou chélatées se fait à l'intermédiaire des protéines de la membrane plasmique. A l'intérieur de la cellule, les métaux sont chélatés par des acides organiques et l'excès de ces métaux est transporté à la vacuole, où ils sont accumulés. (C) Les métaux sont transportés de la racine à la tige par l'intermédiaire du xylem sous forme de chélates. (D) dans les apoplastes des feuilles, les métaux peuvent se déplacer de cellule à cellule à partir des plasmodesmes. La distribution intracellulaire des métaux essentiels se fait par l'intermédiaire des metallo-chaperons spécifiques et des transporteurs localisés dans les membranes (Ramirez-Rodriguez et al., 2005).

lédones accumulent plus d'éléments-traces dans leur biomasse aérienne que les plantes herbacées monocotylédones. Il est encore impossible d'attribuer ce phénomène à un avantage sélectif quelconque. Dans la cellule, les métaux ayant pénétré dans le cytoplasme sont pris en charge par diverses molécules afin de les stocker ou d'éviter tout dommage cellulaire (**Remon, 2006**).

II.3.5 Les excrétiions des éléments-traces par la plante

Les métaux peuvent être évacués de la vacuole vers le cytoplasme ou du cytoplasme vers l'apoplaste et à partir de là, leur relâchage est possible vers le milieu environnant. Ce relâchage est probablement non métabolique (passif). Les métaux relâchés dans la rhizosphère le sont sous forme complexée ou libre (**Prasad & Hagemeyer, 1999**).

Il peut se produire également, dans les feuilles, un relâchage des métaux de la couche cuticulaire pendant les pluies dites « acides ». Ceci est dû à des phénomènes d'échange cationique entre les ions hydrogène et métalliques. Les métaux sont alors entraînés, lors du « rinçage » des feuilles, vers le sol (**Prasad & Hagemeyer, 1999**). Les métaux sous forme gazeuse (Hg (g)) peuvent également fuir à travers les stomates des feuilles dans l'air, lorsque celles-ci sont ouvertes (**Prasad & Hagemeyer, 1999**).

II.4 Toxicité et tolérance

Le premier effet des métaux lourds observable chez les végétaux est une inhibition de la croissance. Celle-ci s'accompagne très souvent de nombreux autres indices de dysfonctionnement : chlorose foliaire, importantes lésions nécrotiques, jaunissement progressif, repliement ou dessèchement du feuillage... A l'heure actuelle, les bases moléculaires de ces perturbations sont encore mal connues, mais plusieurs auteurs admettent généralement qu'elles résultent d'un stress oxydatif, dû à la production d'espèces réactives de l'oxygène ou « Reactive Oxygen Species » (ROS). Les ROS altèrent toute une série de substrats biologiques importants, avec comme conséquence la modification des domaines fonctionnels des biomolécules : inhibition de l'activité enzymatique, perturbation du métabolisme végétal (notamment la photosynthèse et la respiration), oxydation de protéines, altération des membranes cellulaires via l'induction de phénomènes de peroxydation lipidique, apparition de cassures au sein de l'ADN, pouvant conduire à la mort cellulaire (**Remon, 2006 ; Slomkaa et al., 2008 ; Islam et al., 2009**).

Pour éviter ces inconvénients, des systèmes de stockage ou de détoxification des métaux accumulés ont été sélectionnés chez certains végétaux (**Fig. 04**). D'efficacité variée selon les espèces, il semble à l'heure actuelle que trois mécanismes, encore mal compris, soient largement prépondérants: la modification de la perméabilité membranaire, qui permet de réduire l'entrée des

métaux dans la cellule, le système anti-oxydant, qui limite les dégâts des espèces réactives de l'oxygène et la chélation intracellulaire, qui empêche l'activité de l'ion métallique (**Remon, 2006**).

II.4.1 La membrane plasmique

Le transport actif à travers la membrane plasmique des cellules racinaires est un processus important, car les ions ne peuvent pas diffuser librement à travers la double couche phospholipidique, même passivement. Le rôle du plasmalemme dans la régulation du transport métallique est donc primordial.

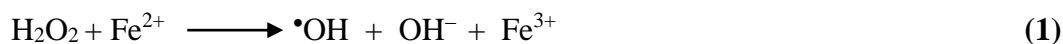
La membrane plasmique peut limiter l'accumulation des ions toxiques, soit en modifiant l'ensemble du flux ionique, soit en employant des systèmes ultra spécifiques autorisant un flux ionique qui ne transporterait pas les ions toxiques. Cependant, si la membrane plasmique apparaît comme étant la première barrière face à l'entrée des éléments métalliques dans le cytosol, elle constitue également une cible importante pour la toxicité métallique. En effet, il a été montré que le cuivre pouvait endommager la membrane par oxydation des protéines membranaires, peroxydation lipidique ou inhibition des ATPases. Par conséquent, l'imperméabilité n'est plus assurée et l'entrée des métaux toxiques par diffusion est facilitée (**Kabata-Pendias et Pendias, 2001**). Dès lors, la tolérance pourrait être due en partie à un renforcement de la protection de l'intégrité membranaire ou à la protection de la fonction des protéines associées au plasmalemme, tels que les transporteurs, les canaux ioniques et les pompes à protons. (**Remon, 2006**).

II.4.2 Système anti-oxydant

Le système anti-oxydant jouerait un rôle central dans la détoxification des métaux lourds ayant pénétrés dans la cellule. Il est donc important de bien comprendre d'une part les événements conduisant à un stress oxydant et d'autre part les mécanismes biochimiques impliqués dans la réponse à ce stress.

II.4.2.1 Les métaux lourds induisent l'accumulation de ROS

Le rôle des métaux lourds dans la formation des ROS est lié à leur capacité à exister sous différents états d'oxydation. En effet, les cations d'éléments comme Fe, Cu, Cr ou Mn sont capables de céder un ou plusieurs électrons susceptibles de réduire l'oxygène et ses dérivés. La plus connue de ces réactions est la réaction de Fenton (**1**) qui se produit en présence de fer ferreux et qui conduit à la réduction du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en radical hydroxyl ($\cdot OH$) et en anion hydroxyl (OH^-) (**Remon, 2006**):



Les radicaux libres sont des espèces chimiques qui possèdent un électron célibataire qui, parce qu'il n'est pas apparié à un autre électron de spin opposé, confère à la molécule une très forte réactivité. Le radical hydroxyle $\bullet\text{OH}$, produit au cours de cette réaction, est un puissant agent oxydant. D'autres réactions de ce type faisant intervenir des métaux réduits ont également été décrites, telle que la réaction d'Haber-Weiss (2) au cours de laquelle le peroxyde d'hydrogène réagit avec un radical superoxyde, comme l'anion superoxyde $\bullet\text{O}_2^-$, aboutissant, là encore, à la production du radical hydroxyle (Remon, 2006).



II.4.2.2 Le système anti-oxydant contrôle la production de ROS

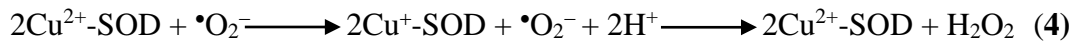
Les systèmes antioxydants des plantes incluent des enzymes telles que la superoxyde-dismutases (SOD) et l'ascorbate peroxydase (APX), et des composants non-enzymatiques tels que l'acide ascorbique et le glutathion. L'hypothèse que les enzymes antioxydantes sont les composants essentiels qui empêchent le stress oxydant est formulée comme suite ; (a) L'activité d'une ou de plusieurs de ces enzymes s'accroît chez les plantes exposées aux conditions stressantes, et cette activité élevée est corrélée avec la tolérance aux stress. (b) Le prétraitement des plantes soumises à une forme de stress peut augmenter la tolérance aux autres stress de nature différente. Ce phénomène est connu sous le nom de la tolérance croisée (Allen, 1995).

Trois activités enzymatiques clefs occupent une place centrale dans les mécanismes de détoxification des ROS : il s'agit des superoxyde-dismutases (SOD), des catalases (CAT) et des peroxydases (POX). Ces enzymes ont une action complémentaire sur la cascade radicalaire au niveau de l'anion superoxyde $\bullet\text{O}_2^-$ et du peroxyde d'hydrogène, conduisant finalement à la formation d'eau et d'oxygène moléculaire (Anderson *et al.*, 1995 ; Mittler, 2002 ; Remon, 2006).

Les superoxyde-dismutases, sont responsables de la dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (Allen, 1995), selon la réaction (3) :



Ces enzymes existent sous différentes isoformes : le repliement tridimensionnel forme un puits hydrophobe au centre de la protéine, dans lequel se glisse l'anion superoxyde. Le mécanisme réactionnel est catalysé par un métal bivalent situé au coeur de l'enzyme. Selon la nature de ce métal on distingue les superoxyde-dismutases à manganèse (Mn-SOD) localisées dans les mitochondries, les superoxyde-dismutases à cuivre-zinc (Cu/Zn-SOD), cytosoliques et enfin, les superoxyde-dismutases à fer ferreux (Fe-SOD), localisées dans le chloroplaste (Allen, 1995 ; Remon, 2006). L'équation (4) décrit la chaîne catalytique typique avec le cuivre :



Les catalases, CATs, sont contenues dans les peroxysomes et dans le cytosol. Elles agissent en synergie avec les SODs puisque leur rôle est de catalyser la réduction du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire selon la réaction suivante (Feierabend, 2005):



Les peroxydases, POX, permettent, comme les catalases, la réduction de H₂O₂ en eau et en oxygène moléculaire. Cependant, à la différence des catalases, les POX nécessitent la présence d'un substrat particulier pour réaliser leurs activités. Deux types principaux de « molécules antioxydantes » sont utilisés comme substrat par les peroxydases l'acide ascorbique (Asc) et le glutathion (GSH). (Mittler, 2002 ; Remon, 2006).

II.4.3 La chélation et la compartimentation cellulaires

II.4.3.1 La chélation

Une stratégie pour que les cellules neutralisent les ions non-essentiels et l'excès des ions essentiels, est la synthèse de ligands organiques ayant une grande affinité pour ces métaux (fig. 05), afin de supprimer la complexation de ceux-ci aux groupements fonctionnels physiologiques importants. Étant donné la réactivité élevée des ions métalliques avec les groupements thiols, aminés ou hydroxyles, ces groupes fonctionnels ont été décrits comme chélateurs de métaux. Chez les végétaux, quatre groupes principaux de ligands intracellulaires ont été caractérisés (Remon, 2006):

- **Les phytochélatines (PC)** c'est un groupe de chélateurs intracellulaires, uniquement rencontrés dans le règne végétal. De nature peptidique, ces molécules sont classées dans une petite famille apparentée aux MT, avec lesquelles elles partagent d'assez nettes similarités de structure et

de fonction (**Remon, 2006**). Les phytochélatines, qui sont des peptides riches en résidus cystéine, chélatent bien les métaux lourds, y compris le Cd, le Cu et le Zn sur leurs groupements thiol. Au contraire aux métallothionines, elles sont synthétisées enzymatiquement à partir du glutathion (GSH) par la phytochélatin synthase (PCsynthase). Les PCs ont une structure générale (Glu-Cys)_n-Gly (avec n = 2 à 11) et sont rapidement induits aux plantes par traitement de métaux lourds (**Zhang et al., 2005**). Néanmoins, plusieurs variantes structurales, par exemple, (g-Glu-Cys)_n-β-Ala et (g-Glu-Cys)_n-Ser, ont été identifiés dans quelques espèces (**Rausser, 1995**). Des études précédentes ont indiqué que la PC synthase a été exprimé constitutivement et que les niveaux de cette enzyme aux plantes étaient généralement inchangés par exposition au Cd (**Zhang et al., 2005**).

• **Les métallothionéines (MTs)** sont également des polypeptides riches en résidus cystéines, cependant, au contraire aux phytochélatins, ils sont codés par le génome, par une famille de gènes qui ont été largement cités chez les mycètes, les plantes, et des cyanobactéries (**Remon, 2006**). Les MTs des plantes sont supposées jouer un rôle important en maintenant l'homéostasie des métaux de transition essentiels, la désintoxication des métaux toxiques, et la protection contre les stress oxydants intracellulaire. Plusieurs auteurs ont prouvé que la séquestration des métaux par les MTs semble être la voie dominante de la désintoxication des métaux, et que la fonction des PC se produit seulement dans des conditions où les MTs sont déficients ou en cas d'incapacité d'expression de leurs gènes (**Saint-pierre, 1992**). Chez *Arabidopsis thaliana*, il a été démontré que la présence de cuivre stimule la biosynthèse de MT et que la variation écotypique de la tolérance à ce métal est corrélée au taux de transcription des gènes MT (**Remon, 2006**).

• **Les acides organiques** représentent un autre groupe de chélateurs naturels. Sous cette dénomination sont classées des molécules diverses tels que des acides dicarboxyliques (acides fumarique, malique, oxalique) ou des acides tricarboxyliques (comme l'acide citrique). Toutes ces petites molécules sont clairement impliquées dans les phénomènes d'accumulation. On observe souvent une stimulation de leur synthèse en présence de métaux lourds, ce qui laisse penser qu'elles assurent le transport xylémien des ions métalliques depuis les racines vers les parties aériennes de la plante. De plus, des observations récentes ont clairement montré que, au moins dans certains cas, des acides organiques pourraient être directement impliqués dans les mécanismes de tolérance. Ainsi, les capacités d'hyperaccumulation et de résistance de certaines variétés de blé noir (*Fagopyrum esculentum*) vis-à-vis de l'aluminium sont directement dépendantes de la synthèse d'acide oxalique. De même, une synthèse accrue de malate a été observée chez une population tolérante de *Festuca rubra* se développant sur des dépôts riches en Cu et Zn, par rapport à une population sensible provenant d'une prairie. Ces deux

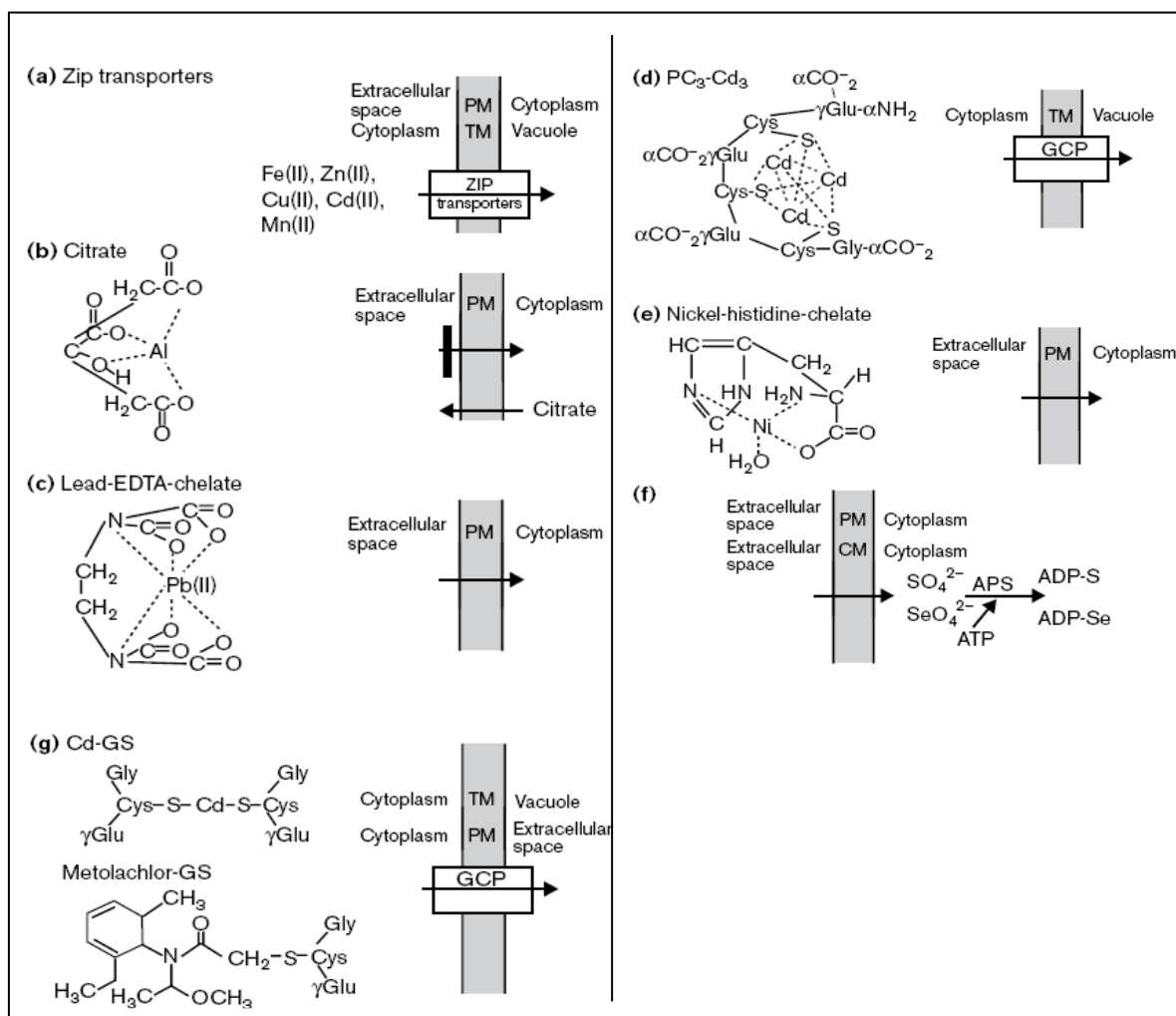


Figure 05 : Mécanismes et complexes possibles facilitant le transport et la séquestration des polluants toxiques. (a) La famille de transporteur ZIP peut apporter les ions nutritifs et des métaux toxiques à travers la membrane plasmique (PM) dans les racines et/ou à travers la tonoplaste (TM) dans les vacuoles. (b) Le citrate sécrété peut former des complexes tétraédriques avec les ions métalliques qui bloquent le transport d'Al (III) et probablement du Ni (II) dans des racines. (c) L'addition d'EDTA au sol peut former des complexes hexaédriques avec les ions métalliques (Pb [II], Fe [II]) qui augmentent la prise et la translocation dans toute la plante. Les acides organiques sécrétés naturellement, tels que les acides mugénique et avénique, peuvent utiliser le même mécanisme pour nettoyer les sols des métaux. (d) Phytochelatines (PC), dans ce cas-ci un PC₃ trimérique, forment des complexes tétraédriques avec les métaux qui réagissent aux groupements thiols comme le cadmium (Cd [II]) en augmentant la tolérance. Ces structures devraient faciliter le transport et la séquestration des métaux dans les vacuoles par l'intermédiaire de la pompe à glutathion (GCP). (e) L'histidine (His) peut participer à former des complexes tétraédriques avec des ions métalliques comme le Ni (II) en facilitant la prise, le transport, l'hyperaccumulation, et la tolérance. L'eau forme le quatrième ligand dans ce modèle. (f) Le transport du sulfate et du séléniate par la membrane plasmique ou la membrane plastidique (CM) est augmenté par la formation de l'adénosine phosphosulfate (ADP-S) et l'adénosine phosphosélénate (ADP-Se), respectivement, qui sont catalysés par l'ATP sulfurase (APS). (g) Des métaux toxiques et plusieurs produits organiques peuvent être complexés avec le glutathion, puis pompés par la GCP dans les vacuoles ou hors des racines (Meagher, 2000).

exemples suggèrent donc que la tolérance aux métaux chez quelques métallophytes hyperaccumulatrices serait acquise par une synthèse spécifique de petites molécules organiques à fortes capacités de chélation (**Ramirez-Rodriguez et al., 2005 ; Remon, 2006**).

- **Les acides aminés** libres, comme la proline, l'histidine et la cystéine, s'accumulent lors d'un stress métallique et pourraient être eux aussi impliqués dans la chélation de divers métaux lourds, notamment du zinc et du nickel. C'est ainsi que l'accumulation et la tolérance au nickel dans le genre *Alyssum* semblent principalement dues à une synthèse accrue d'histidine (**Remon, 2006**).

II.4.3.2 La compartimentation

La compartimentation des métaux dans la vacuole est également une partie du mécanisme de la tolérance aux métaux lourds adopté par certaines plantes hyperaccumulatrices. Chez *Thlaspi goesingens*, hyperaccumulatrice du Ni, la tolérance augmente par la compartimentation de la majeure partie du Ni intracellulaire des feuilles dans les vacuoles. L'expression élevée d'un transporteur vacuolaire TgMTP1 des ions métalliques dans *T. goesingense* est proposée pour expliquer la grande capacité d'accumuler des ions métalliques dans les vacuoles des feuilles (**Tong et al., 2004**). Chez *Rauvolfia serpentina*, le cadmium forme, avec les phytochélatines, des complexes de faible masse moléculaire (Low Molecular Weight (LMW)), qui s'agrègent les uns aux autres par des ponts sulfures pour former des complexes de masse moléculaire élevée (High Molecular Weight (HMW)). Les HMW pourraient alors être transportés par un complexe protéique spécifique dans la vacuole. Le pH vacuolaire provoquerait alors la dissociation du complexe, et les ions seraient pris en charge par les acides organiques présents, tels que le malate, le citrate ou encore l'oxalate (**Remon, 2006**).

Partie expérimentale

Chapitre I : culture hydroponique

I.1 Prélèvement des semences

Les graines d'*A. halimus* (Chénopodiacées) ont été récoltées pendant le mois de décembre 2008 à partir de la région de Mascara (0.3561110 longitude, 35.3194440 latitude).

Les graines, de très petite taille, enveloppées dans des bractées ont été obtenues par frottement contre un tamis afin de les séparer de la partie végétative et de faciliter leur germination.

I.2 Mise en culture hydroponique

Préparation du sol

Avant le repiquage, des pots en plastique de forme carré (10x10x10cm) ont été remplis à 2/3 de leur contenance par du sable déminéralisé.

Le substrat utilisé est le sable neutre qui était prélevé au bord de la mer, tamisé plusieurs fois afin d'éliminer les impuretés et lessivé plusieurs fois pour le déminéraliser, d'abord avec de l'eau abondante, puis avec une solution acide (esprit de sel commercial) et enfin plusieurs lavages à l'eau distillée. Le sable est passé de 500 μ S/cm de conductivité électrique à 45 μ S /cm après lessivage (**annexe 01**).

Ensemencement

Le semis se fait sur du sable déminéralisé dans des pots en plastiques, à raison de 36 graines d'*A. halimus* par pot. Les pots sont mis dans une étuve à 25° C pendant trois jours. Ensuite, après germination, ils sont transférés dans une chambre de culture dans des conditions contrôlées (photopériode de 14h d'éclairage et 10h d'obscurité, température de 24° C \pm 2° C, sous une lumière assurée par la combinaison de tubes fluorescents (Philips TLD 18W/83, Germany, et MAXIMA FL20T8D/18)). Les pots subissent des éclaircissements réguliers pour avoir au bout d'un mois 10 plants par pot. Au cours de la période de germination, les bacs sont arrosés à l'eau distillée, les plantules sont ensuite arrosées par une solution nutritive utilisée pour la culture hydroponique d'*A. halimus* (**Lutts et al., 2004**) (**Tab.01**):

Tableau 01 : solution nutritive de base (Lutts et al., 2004).

Éléments minéraux	Concentration	
KNO ₃	5	mM
MgSO ₄ .7H ₂ O	2	mM
Ca (NO ₃) ₂ .4H ₂ O	5.5	mM
KH ₂ PO ₄	1	mM
KCl	25	μM
MnSO ₄ .4H ₂ O	3	μM
H ₃ BO ₃	10	μM
ZnSO ₄ .7H ₂ O	1	μM
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.3	μM
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	1	μM
FeSO ₄	7.5	μM
EDTA	7.5	μM



Figure 06 : Plantules d'*A. halimus* de l'âge d'un mois en chambre de culture

La solution nutritive est tamponnée à pH 6.1, et après deux mois de culture, les plantules sont soumises à quatre concentrations différentes de cuivre (50, 500, 1000 et 2000 μM) préparées à partir du sulfate de cuivre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$).

Chapitre II: caractérisation biochimiques

II.1. Electrophorèse

II.1.1. Extraction des enzymes

Après 2 jours de contamination, 1g d'échantillon de feuilles est extrait au froid sur un mortier refroidi à la glace dans 1,5 ml de tampon 0,1M Tris-HCl pH 8 composé de : 70mM du β -mercaptoethanol, 26mM de métabisulfite de sodium, 11 mM d'acide ascorbique et 4% de PVP (polyvinylpyrrolidon) (**Kaplan et al., 2002**). Après centrifugation à 15000g pendant 20 min dans une centrifugeuse réfrigérée (Sigma 2K 15), les surnageants sont conservés à -20° C dans des tubes Eppendorf séparés pour servir ultérieurement à l'électrophorèse en conditions non dénaturantes (**Demirevska-Kepova et al., 2004**).

II.1.2. Extraction des protéines

L'échantillonnage est effectué après 6, 24 et 48 heures. Pendant le quel les protéines ont été extraites au froid sur un mortier refroidi à la glace dans 50 mM PBS (pH 7.8) (**annexe 03**) contenant 10 mM de b-Mercaptoéthanol et mélangées avec un volume égal du tampon de SDS : 10% glycérol (w/v), 5% Mercaptoehanol (v/v), 2.3% SDS, 62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8) et 0.01% Bleu de Bromophénol (**Wang et Fan, 2002**). Après l'extraction les échantillons ont été chauffés pendant 3 à 5 minutes dans un bain marie (100°C) puis centrifugées pendant 20 min à 15000 g, le surnagent est conservé dans des tubes Eppendorf pour servir ultérieurement à l'électrophorèse et au dosage des protéines.

II.1.3. Réalisation de l'électrophorèse:

Electrophorèse des enzymes

Il s'agit d'une électrophorèse verticale réalisée en conditions non dénaturantes sur gel de polyacrylamide (**PAGE**) selon la méthode de **Laemmli (1970)**.

50 μ l d'extrait protéique, sont introduits dans les puits à l'aide d'une seringue Hamilton. L'appareil utilisé est une cuve "OWI" dont les plaques mesurent 20x20cm et des espaceurs de 1.5mm d'épaisseur. La cuve de l'appareil est remplie de tampon jusqu'à ce que les deux extrémités du gel soient bien immergées. Les électrodes sont reliées au générateur qui fournit un courant continu de 10mA d'intensité et 100V de tension. Lors des manipulations, l'appareil est introduit

dans un réfrigérateur permettant de garder le gel à une température de 4° C et ce pour éviter la dénaturation des enzymes à cause de la chaleur générée par le passage du courant à travers le gel. Après 24 h lorsque le front de migration atteint l'extrémité inférieure du gel, l'opération est arrêtée et le gel est récupéré pour révélation.

Les solutions et les tampons utilisés dans l'électrophorèse en conditions non dénaturantes sont présentés dans **l'annexe 02**

SDS-PAGE

Dans la méthode SDS-PAGE la séparation des protéines se fait en présence de Sodium-Dodecyl-Sulfate (SDS), un détergent qui masque la charge des protéines par sa propre charge négative et permet donc de les faire migrer selon leurs poids moléculaires. Dans cette méthode on a utilisé deux types de gels : Un gel de séparation (12% Polyacrylamide) à pH 8,8 qui permet de fractionner les différentes protéines et les sous-unités protéiques selon leurs poids moléculaires et un gel de concentration (6% Polyacrylamide) à pH 6,6 permettant de retenir les impuretés et de tasser les protéines (**annexe 03**).

II.1.3. Révélation

A la fin de migration, les gels sont trempés dans différentes solutions de révélations pendant des durées variables selon le type d'enzyme à révéler (**annexe 4.1**). On obtient des zymogrammes présentant des bandes à différents niveaux de migration.

Les protéines ont été détectées par le bleu de Coomassie brillant R250 (**Sean et al., 2008**). Brièvement le gel est trempé dans une solution de coloration contenant le bleu de coomassie et agité pendant 30 min, puis la solution de coloration est éliminée et changée par une solution de décoloration (**annexe 4.2**) et laissé agité pendant une nuit.

II.1.4. Numérisation et fixation

Après l'apparition des bandes les gels sont numérisés par un appareil photo d'une résolution de 7,2 Mega pixel, puis ils sont fixés dans des solutions appropriées qui annulent l'effet de diffusion des bandes, stoppent l'évolution progressive des couleurs et permettent leur fixation pendant une longue période (**annexe 05**)

Les photos sont traitées par un logiciel **PhotoFiltre** puis la densité optique des bandes est analysée par un autre logiciel **Mesurim_pro_02_08**.

II.2. Dosage des protéines

Les protéines ont été prélevées dans trois temps différents (6, 24 et 48^h), et leur teneur a été déterminée en utilisant une gamme d'étalon **BSA** (Bovin Serum Albumin) (**annexe 06**) comme décrit par **Bradford (1976)**. Le réactif d'analyse des protéines a été préparé comme suit : 100 mg de bleu de coomassie brillant **G250** est dissous dans 50 ml d'alcool éthylique absolu (99.5 %) puis sont ajoutés 100 ml de d'acide phosphorique à 85 %. Le mélange est complété jusqu'à 600 ml avec de l'eau distillée, puis filtré. Juste après filtration, 100 ml de glycérol à 87 % sont ajoutés et complétés jusqu'à 1000 ml avec de l'eau distillée. Ce réactif est employé dans le dosage des protéines dans les extraits. Pour le dosage des protéines solubles, la solution témoin 50 µL de l'extrait des protéines et 2 ml de réactif d'analyse de protéine ont été mélangés ensemble. Après agitation du mélange, la couleur produite a été mesurée à 595 nm par un spectrophotomètre JENWAY 6305 UV/Vis contre le blanc de réactif.

II.3. Dosage de la chlorophylle

Les prélèvements en vue de la détermination de la chlorophylle a et b a été effectuée après 48 h de la contamination, le dosage est réalisé selon la méthode décrite par **Arnon (1949)**, qui mesure l'absorption de la lumière par les extraits aqueux de la chlorophylle dans l'acétone à 80%.

Un échantillon de 250 mg de feuilles sert à la préparation d'une solution homogénéisée de chlorophylle dans 5 ml d'acétone à 80%, qui par suite conservée pendant 24 heures à 4°C. L'absorption a été enregistrée à 663 et 645 nm pour la chlorophylle a et b respectivement par un spectrophotomètre JENWAY 6305 UV/Vis et la quantité de chlorophylle est calculée selon les équations suivantes :

$$D_{663} = 82.04 C_a + 9.27 C_b \quad (1)$$

$$D_{645} = 16.75 C_a + 45.6 C_b \quad (2)$$

Où C_a et C_b sont les concentrations en grammes par litre (g/l) de chlorophylle a et b respectivement, et D les valeurs de densité aux longueurs d'onde respectives.

II.4. Analyse statistique

Le protocole expérimental est conduit selon le procédé des blocs randomisés avec trois répétitions. Toutes les analyses sont effectuées sur les feuilles de même âge et les données ont été analysées statistiquement, par ANOVA et le teste de Newman-Keuls, pour déterminer les

différences entre les moyennes, en utilisant le logiciel StatBox 6.40. Le seuil de signification a été choisi à $p = 0,05$.

Résultats

Effet de cuivre sur la teneur en chlorophylle et protéines

Après 2 jours de contamination par le Cu, des jaunissements et dessèchements apparaissent visibles sur les feuilles des plantes traitées par de fortes doses (2000 μM), surtout autour des nervures (**Fig. 07**). L'effet du Cu sur la teneur en pigment d'*A. halimus* a été représenté dans le **tableau 02**. La teneur en chlorophylle a et b des feuilles d'*A. halimus* diminue significativement avec l'augmentation de la dose du Cu, soit 45% et 50% de chlorophylle a et b respectivement par rapport au témoin après 48^h de traitement. Cette diminution confirme l'observation visuelle de la toxicité du Cu aux doses élevées.

Par ailleurs, les concentrations en protéines des différents échantillons varient après 2 jours de traitement. Une légère diminution apparaît après 6 heures de traitement (38,54% à 2000 μM) (**Tab. 03**), puis une reprise dans leur biosynthèse apparaît après 24^h et qui devient plus importante après 48^h.

L'analyse des extraits protéiques des feuilles d'*A. halimus* par électrophorèse sur SDS-PAGE après 48^h a indiqué l'apparition d'une nouvelle bande de front de migration $\text{FM}=0,79$ dans les plantes traitées par 500 et 1000 μM par rapport au témoin et les autres doses (50 et 2000 μM) (**fig. 08**).

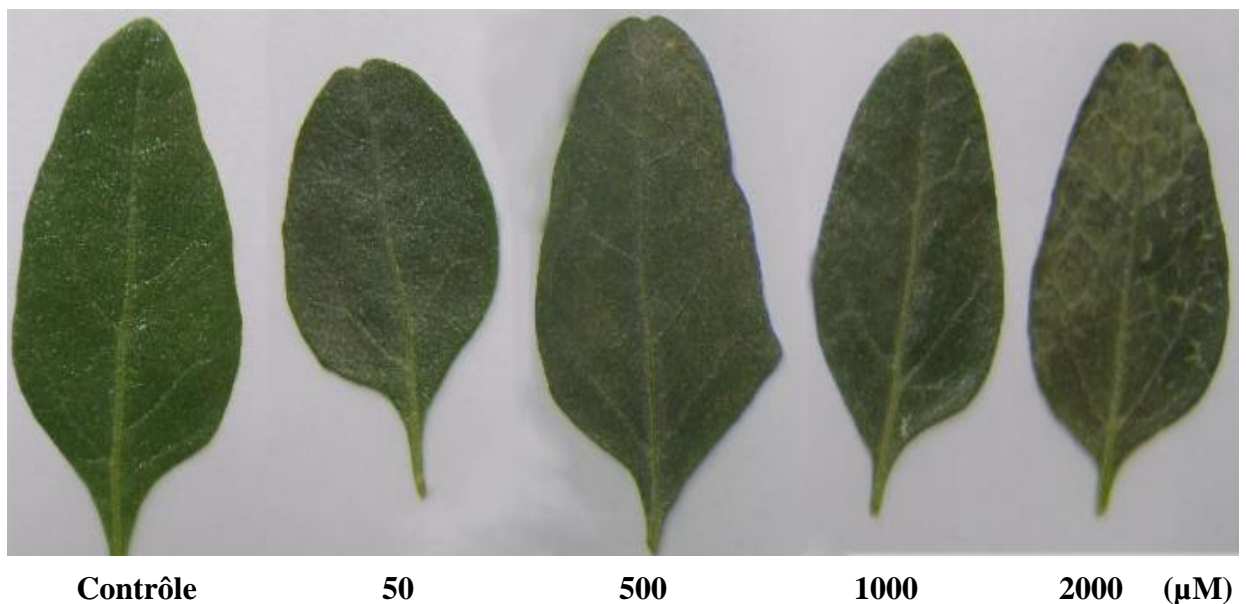


Figure 07 : L'effet du cuivre sur les feuilles d'*A. halimus* après 48^h.

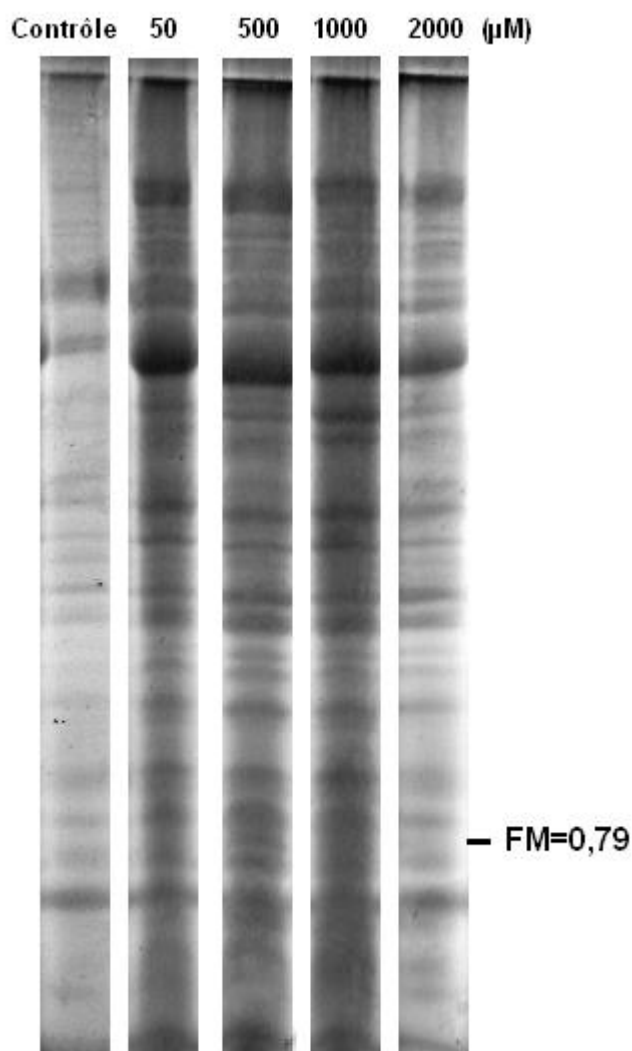


Figure 08: Electrophorèse verticale sur SDS-PAGE des extraits protéiques des feuilles d'*A. halimus* après 48^h de traitement par le cuivre.

Tableau 02 : L'effet du sulfate de cuivre sur le contenu en chlorophylle a et b d'*A. halimus* soumis en conditions hydroponiques.

CuSO ₄ (µM)	Chlorophylle (mg g ⁻¹ FW)	
	Chl. a	Chl. b
0	1,89 ± 0,089 ^A	1,36 ± 0,043 ^A
50	1,81 ± 0,114 ^{A,B}	1,32 ± 0,018 ^B
500	1,71 ± 0,028 ^B	1,14 ± 0,008 ^C
1000	1,46 ± 0,046 ^C	0,98 ± 0,022 ^D
2000	1,03 ± 0,068 ^D	0,68 ± 0,026 ^E

Les différentes lettres dans la même colonne indiquent une différence significative à 5% selon le test de Newman-Keuls. Les valeurs représentent la moyenne ± l'erreur standard (n=3).

Les isoenzymes de la peroxydase (POX)

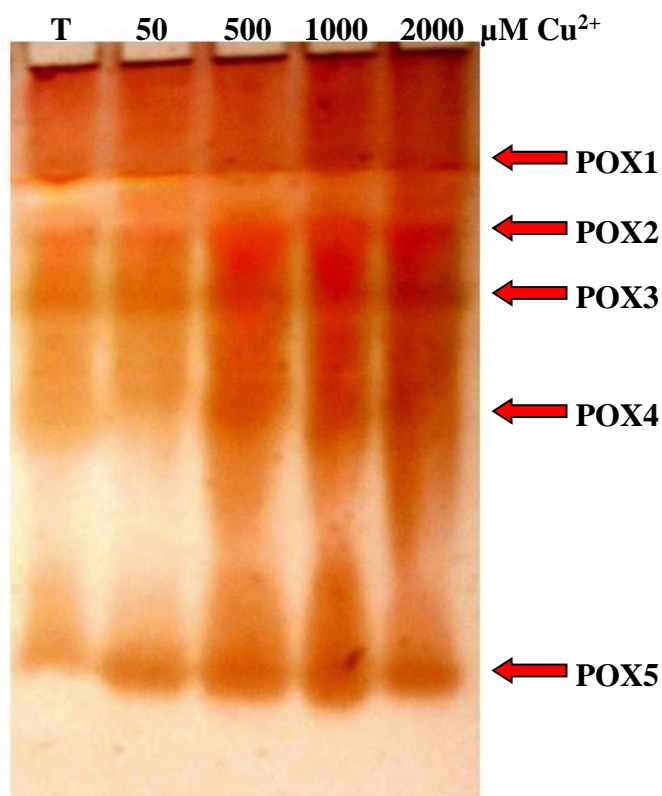


Figure 09 : L'effet du cuivre sur les isoenzymes de la peroxydase (POD) des feuilles d'*A. halimus* après 2 jours de traitement. Les différents isoformes sont numérotés de la cathode vers l'anode. Approximativement 50 µl d'extrait par puits.

L'activité POX des extraits des plantes traitées par le cuivre pendant 2 jours a été déterminée en se basant sur la séparation de ses isoenzymes par l'électrophorèse non-dénaturante sur le gel de polyacrylamide (PAGE). La coloration de gel a indiqué l'existence de 05 bandes qui correspondent à 05 isoenzymes dans les feuilles (fig. 09), dont la POX5 est la plus rapide. L'analyse densitométrique montre une augmentation dans l'intensité des bandes 2, 3 et 4 à partir de 500 µM Cu, indiquant l'augmentation de l'activité enzymatique de ces isoenzymes. Cependant l'accroissement de l'activité de POX 5 est manifesté à partir de 50 µM Cu.

Tableau 03 : L'effet du sulfate de cuivre sur la concentration des protéines d'*A. halimus* soumis en conditions hydroponiques.

CuSO4 (µM)	Concentration des protéines (mg/g FW)					
	Après 6 h		Après 24 h		Après 48 h	
		%		%		%
0	24,68 ± 01,95		26,06 ± 01,81		33,00 ± 03,85	
50	23,81 ± 03,41	-3,53	30,84 ± 03,28	18,34	95,85 ± 14,77	154,88
500	19,30 ± 0,40	-21,78	29,65 ± 04,09	13,75	95,99 ± 31,62	155,25
1000	18,89 ± 02,49	-23,46	29,46 ± 0,74	13,05	92,82 ± 20,88	146,82
2000	15,17 ± 02,06	-38,54	28,54 ± 01,38	9,52	73,74 ± 08,67	96,08

Les isoenzymes de la superoxyde dismutase (SOD)

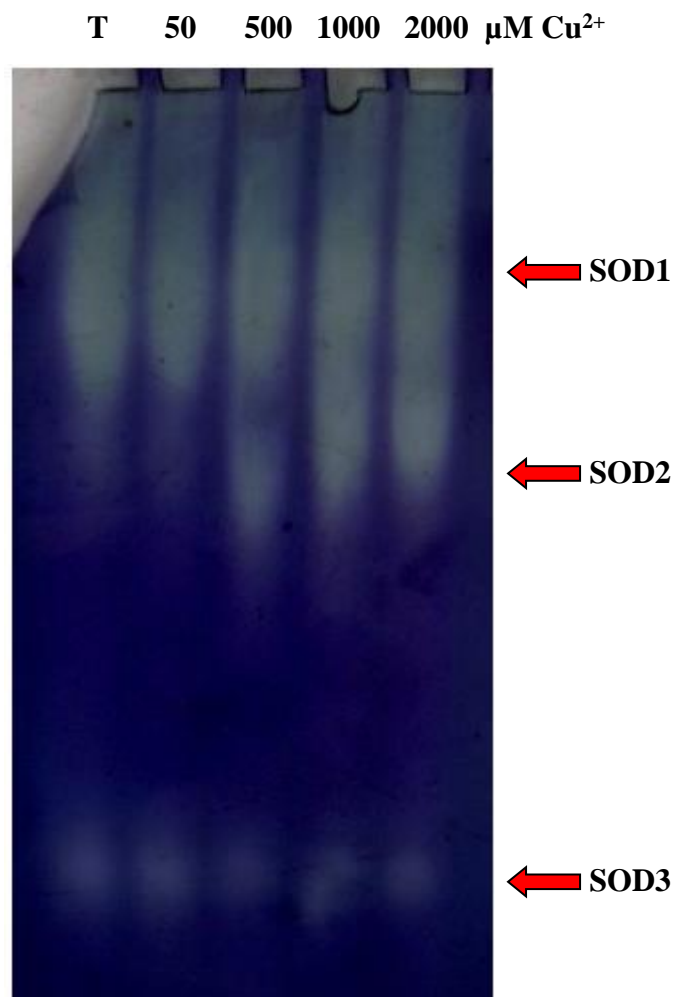


Figure 10 : L'effet du cuivre sur les isoenzymes de la superoxyde dismutase (SOD) des feuilles d'*A. halimus* après 2 jours de traitement. Les différents isoformes sont numérotés de la cathode vers l'anode. Approximativement 50 μl d'extrait par puits.

Après 2 jours de contamination par le cuivre, l'analyse de profil isoenzymatique de la SOD par l'électrophorèse en conditions non dénaturantes a indiqué l'apparition d'une nouvelle bande sur les échantillons traités par le Cuivre (**fig. 10**). SOD 2 nouvelle bande qui apparaît à partir de 500 $\mu\text{M Cu}$ indiquant l'expression d'un nouveau gène et d'après l'analyse densimétrique son activité est augmentée à 1000 $\mu\text{M Cu}$ puis elle subit une faible diminution à 2000 $\mu\text{M Cu}$ (**fig. 11**). L'analyse densimétrique montre aussi une diminution progressive de l'activité SOD3 avec l'accroissement de la dose du Cuivre.

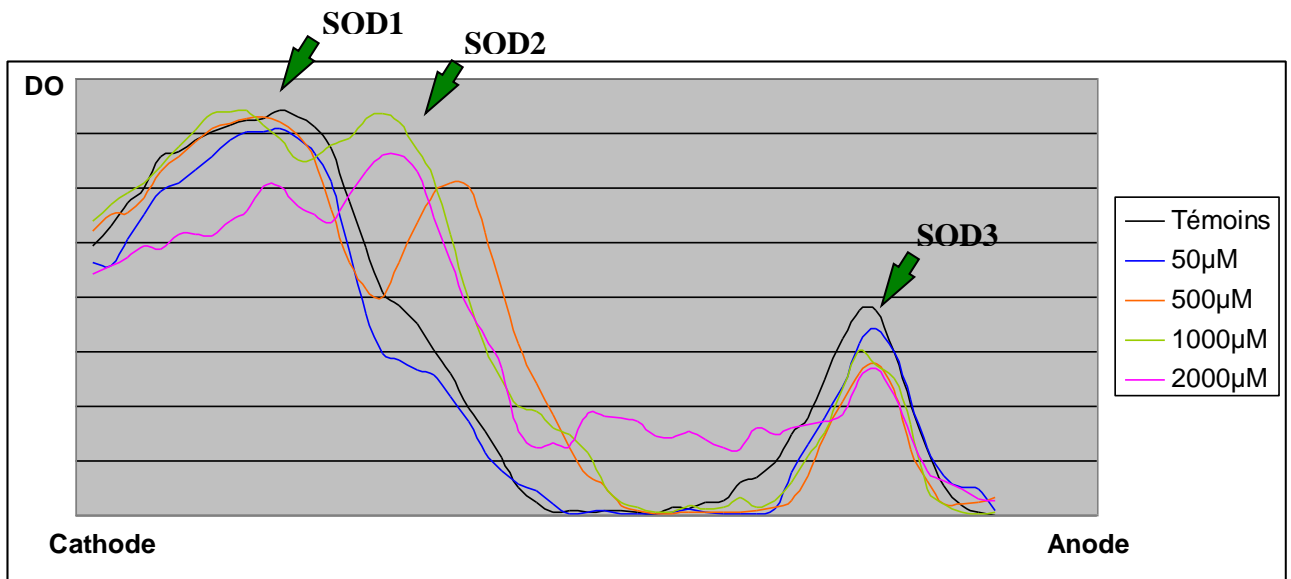


Figure 11 : Profil densitométrique pour les isoenzymes de la Superoxyde dismutase (SOD) séparées dans le gel de polyacrylamide de la cathode vers l'anode. DO: Densité Optique.

Les isoenzymes de la catalase (CAT)

Trois isoformes de CAT ont été visualisés dans le gel après une électrophorèse PAGE; CAT1, CAT2 et CAT3 (fig. 13). CAT1 est la plus lente et se présente dans tous les traitements, l'analyse densimétrique montre que son activité est presque la même dans tous les traitements de Cu (fig. 12). A partir de 50 µM Cu, deux nouvelles isoformes sont apparues, CAT2 et CAT3 montrant l'expression de deux nouveaux gènes en réponse au stress provoqué par le cuivre. Ces deux nouvelles isoformes ont des activités faibles par rapport au CAT1, cependant ses activités augmentent avec la dose de Cu.

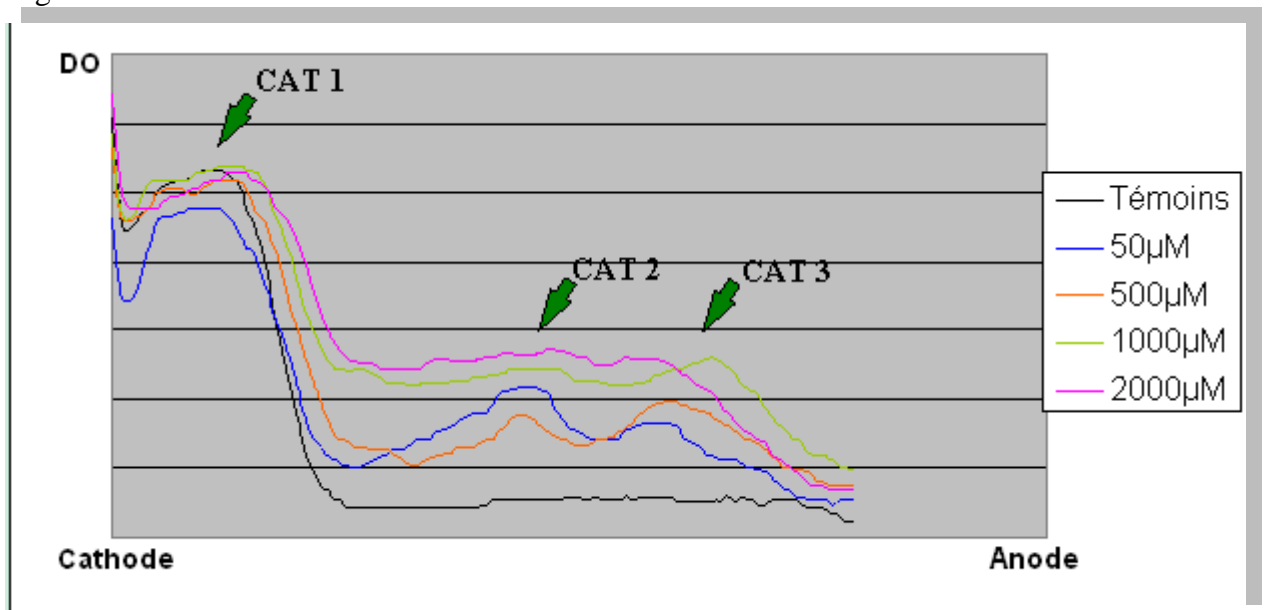


Figure 12 : Profil densitométrique pour les isoenzymes de la Catalase (CAT) séparées dans le gel de polyacrylamide du cathode vers l'anode. DO: Densité Optique.

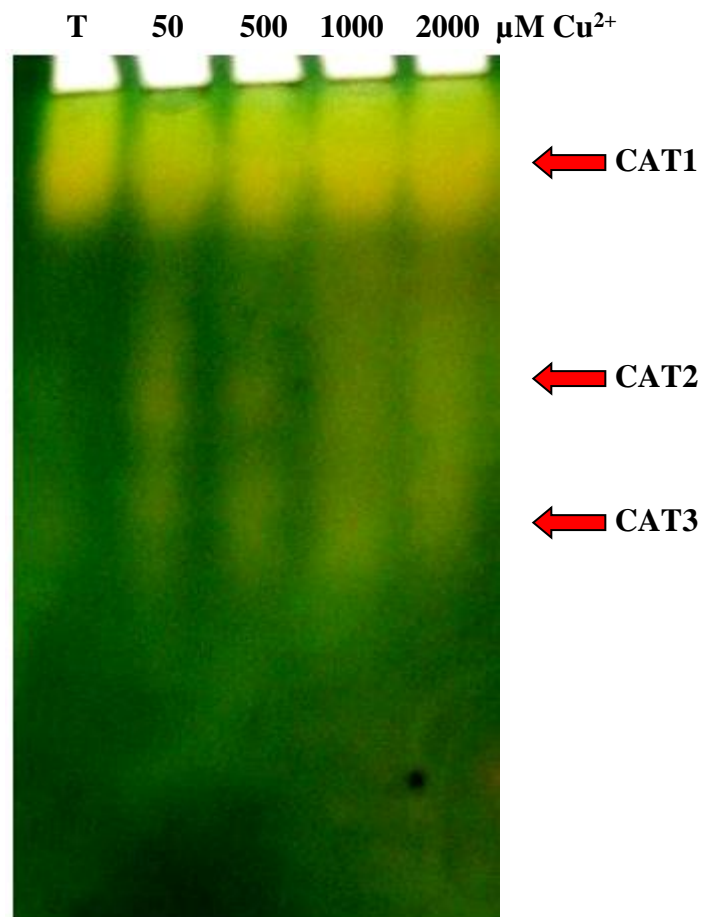


Figure 13 : L'effet du cuivre sur les isoenzymes de la catalase (CAT) des feuilles d'*A. halimus* après 2 jours de traitement. Les différents isoformes sont numérotés de la cathode vers l'anode. Approximativement 50 μl d'extrait par puits.

En générale l'analyse densimétrique des images montre l'augmentation de l'activité totale de la CAT (fig. 12).

Discussion

Quand une plante est soumise à n'importe quel facteur de stress biotique ou abiotique, tel que le stress des métaux lourds, la première réponse observée est une diminution de ses activités métaboliques normales, avec comme conséquence, une réduction dans la croissance. Dans cette « phase d'alarme », la synthèse de protéine est l'un des processus anaboliques le plus affecté ainsi que la photosynthèse, le transport des métabolites, et la prise et translocation des ions (**Lichtenthaler, 1996 ; Bonjoch et Tamayo, 2003**).

Le cuivre est un micro-élément essentiel pour la croissance et le développement des plantes puisque c'est un composant structural et catalytique de beaucoup de protéines et enzymes impliquées dans diverses voies métaboliques (**Fernandes et Henriques, 1991 ; Teisseire et Guy, 2000**). Cependant à des fortes doses il constitue un élément toxique (**Maksymiec et al., 1994**). Nos résultats ont prouvé une légère diminution après 6 heures de traitement puis une reprise dans la biosynthèse des protéines.

Chez les plantes qui n'ont pas ou ont des mécanismes de tolérance limités vis à vis des stress en général, des dommages graves apparaissent rapidement (chlorose) suivi de la sénescence et la mort de la plante. De plus une perte de chlorophylle, ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase et d'autres protéines de chloroplaste sont hydrolysés et exportés par l'intermédiaire du phloème, suivi de l'hydrolyse des protéines mitochondriales et des tissus vasculaires (**Bonjoch et Tamayo, 2003**). Par conséquent, des concentrations pauvres en protéine devraient être interprétées comme symptôme clair de dommages liés aux stress des plantes (**Bonjoch et Tamayo, 2003**).

Cependant, en réponse aux conditions défavorables la plupart des plantes activent des mécanismes de défense tels que le changement des flux métaboliques, l'activation des processus de réparation, et des adaptations métaboliques et morphologiques, qui forment ce qu'on appelle l'adaptation général aux syndromes (**Lichtenthaler, 1996**). De tels mécanismes incluent la synthèse *de novo* des protéines avec des fonctions adaptatives spécifiques, l'ajustement osmotique et la défense antioxydante (**Bonjoch et Tamayo, 2003**).

La diminution de contenu en chlorophylle dans les plantes exposées aux métaux lourds tel que le Cu^{2+} est peut être dû à des facteurs tels que : l'inhibition des enzymes liées à la biosynthèse de chlorophylle, telles que l'acide δ -aminolevulinique déshydratase et protochlorophyllide réductase (**John et al., 2009**), l'affaiblissement de l'approvisionnement en éléments essentiels à la biosynthèse de la chlorophylle tel que, Mg^{2+} , Fe^{2+} et Zn^{2+} par l'effet antagoniste (**Jayakumaret al., 2009**) et la peroxydation des lipides de la membrane de

chloroplaste. Des diminutions semblables du contenu de chlorophylle sous le stress des métaux lourds ont été rapportées chez les cyanobactéries, chlorophytes unicellulaires (*Chlorella*), gymnospermes, tels que *Picea abies* et des angiospermes, tels que *Zea mays*, *Quercus palustris* et *Acer rubrum* (John et al., 2009). La diminution du contenu de chlorophylle a été également rapportée dans *Triticum aestivum* cv. cultivée sur des sols riches en cuivre (Zengin and Munzuroglu 2005).

Les résultats obtenus démontrent aussi une stratégie de défense d'*A. halimus* contre le stress oxydant induit par le cuivre, qui se traduit par un changement dans l'expression des enzymes antioxydantes. Des résultats pareils ont été trouvés chez d'autres plantes après un état de stress provoqué par Cu (Demirevska-Kepova et al., 2004), ou des métaux différents tel que Mn, Pb, Ni et Cd (Kopyra et Gwozdz, 2003 ; Demirevska-Kepova et al., 2004 ; Sobkowiak et al., 2004 ; Gomes-Junior et al., 2006), ces mêmes résultats se produisent également pour des stress différents, tels que le froid (Anderson et al., 1995) ou l'agression des pathogènes (Morkunas et al., 2008).

Le taux de dommages des cellules sous le stress des métaux lourds dépend du taux de formation de ROS et de l'efficacité et la capacité des mécanismes de désintoxication et de réparation. Soumettre à un état de stress qui perturbe l'homéostasie cellulaire, y compris la toxicité des métaux lourds, peut augmenter la production des ROS et accroître le niveau de H₂O₂ jusqu'à trente fois (Mittler, 2002). Le rôle des métaux lourds dans la formation des ROS est lié à leur capacité à exister sous différents états d'oxydation (Remon, 2006). L'autoxydation du cuivre (Cu⁺) "libre" abouti à la formation des anions superoxydes (O₂⁻) et plus tard comme conséquence à la production de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et le radical hydroxyle (OH^{*}) par l'intermédiaire de la réaction de Fenton (Teisseire et Guy, 2000 ; Polle et Schützendübel, 2004). Bien que nous n'avons pas mesuré le H₂O₂ ou tout autre ROS dans cette étude, néanmoins l'augmentation est susceptible d'être produite basé sur les réponses des enzymes antioxydantes qui ont été mesurées (Gratao et al., 2008).

Comme déjà indiqué dans l'introduction, les enzymes évaluées dans cette étude sont importantes dans les réponses antioxydantes des plantes aux différents stress. De telles réponses au cuivre et à d'autres métaux lourds ont suscité beaucoup d'attention ces dernières années et ont été montrées de changements considérables selon l'espèce de plantes, l'organe et le tissu étudié, et dépendent de la concentration en métal et de la durée de l'exposition (Sobkowiak et al., 2004 ; Demirevska-Kepova et al., 2004 ; Gratao et al., 2008).

Une nouvelle isoenzyme de SOD est apparue dans le gel (PAGE) après électrophorèse des extraits des feuilles *A. halimus*. L'apparition des nouvelles isoenzymes indique l'expression de

nouveaux gènes (Tibayrenc, 1979 ; Micales et Bonde, 1995). Gomes-Junior et al. (2006) ont rapporté que l'activité et l'expression des gènes codant les enzymes antioxydantes de certaines plantes sont changées quand ces plantes sont soumises dans des conditions environnementales extrêmes. Le changement de l'activité SOD suggère que le cuivre induit des radicaux superoxyde (O_2^-) dans les feuilles d'*A. halimus*. Ceci a été trouvé chez les plantes (Xu et al., 2001, 2003) et les animaux (Lijun et al., 2005). L'activité SOD accroît dans le gel d'électrophorèse avec l'augmentation de la concentration en cuivre, suggérant que SOD est stimulé pour nettoyer les radicaux O_2^- afin de protéger les feuilles d'*A. halimus* contre la toxicité du cuivre (Lijun et al., 2005). SODs existent sous différentes isoformes, qui contiennent Cu/Zn, Fe, ou Mn dans leurs centres réactifs (Allen, 1995). On a observé trois isoenzymes, mais le nombre d'isoenzymes de chaque type de SOD change considérablement d'une plante à une autre (Gomes-Junior et al. 2006). Ces isoenzymes jouent un rôle majeur en empêchant la toxicité du métal : d'une part ils nettoient les radicaux O_2^- . De ce fait, maintenant les ROS à basses concentrations, et d'autre part elles semblent être impliquées en empêchant l'accumulation des métaux libres tels que le cuivre en les utilisant comme cofacteurs (Allen, 1995).

L'accroissement rapide de l'activité CAT à 50 μ M $CuSO_4$, se traduit par l'apparition de deux nouvelles isoenzymes, qui peut être un autre mécanisme principal dans la protection contre les ROS induites par le cuivre et peut être associée à l'augmentation du taux H_2O_2 résultant de l'activité élevée de SOD (Gomes-Junior et al. 2006). Des effets stimulants du cuivre sur l'activité CAT ont été rapportés également dans l'haricot et le lupin (Weckx et Clijsters, 1996 ; Teisseire et Guy, 2000). D'autres métaux lourds tel que Pb et Hg et pesticides tel que paraquat et oxyfluorfen ont été également rapportés pour stimuler cette enzyme (Teisseire et Guy, 2000). La mobilisation rapide de CAT, était une adaptation cellulaire pour faire face à la surproduction de H_2O_2 produite par les ions cupriques comme il a été montré par Weckx et Clijsters, (1996). Le taux H_2O_2 dans les cellules des plantes est sous le contrôle de la CAT et la POX, qui peuvent abaisser sa concentration s'il est produit en excès (Słomka et al., 2008). CAT élimine le H_2O_2 en le décomposant directement pour former l'eau et l'oxygène moléculaire (Zhang et al., 2007). Chez les plantes à fleurs, il y a trois gènes qui codent les isoformes de CAT. Les facteurs externes stimulent la transcription de ces gènes de différentes façons (Słomka et al., 2008).

Cinq isoenzymes de POX ont été trouvées, et leurs activités corrèlent avec la dose du cuivre. L'induction de cette enzyme a été observée comme réponse générale chez les plantes supérieures aux métaux lourds (Demirevska-Kepova et al., 2004), et dans notre étude son activité est corrélée avec la dose élevée du cuivre dans les feuilles. POX est largement distribuée dans le règne végétal et est l'une des principales enzymes impliquées dans l'élimination des ROS. Elle

nettoie le H₂O₂ plus efficacement que la CAT en raison de sa grande affinité au substrat (**Zhang et al., 2007**). De plus, la POX participe à la biosynthèse de la lignine de la paroi qui peut construire une barrière physique contre les métaux lourds comme le Cuivre (**Zhang et al., 2007**).

Les données présentées dans cette étude ont démontré une augmentation coordonnée et corrélée des activités de ces trois enzymes avec la dose du cuivre. Beaucoup d'études ont démontré que l'exposition aux concentrations élevées de métaux lourds aboutit à la diminution (et non pas à l'augmentation) des activités des enzymes antioxydantes (**Schutzendubel et Polle, 2002**). Mais la conclusion que l'activité enzymatique augmente dans des petites concentrations en métaux lourds et diminue quand elles deviennent plus hautes est généralement acceptée (**Slomka et al., 2008**).

Conclusion

Chez les végétaux, l'effet le plus directement visible des métaux lourds est une inhibition de la croissance qui s'accompagne très souvent d'une chlorose et d'importantes lésions nécrotiques. A l'heure actuelle, les bases moléculaires de ces perturbations sont encore mal connues, mais les auteurs admettent généralement qu'elles résultent d'un stress oxydatif qui conduit finalement à l'inhibition de certaines activités physiologiques comme la photosynthèse et la respiration. Dans le cadre de ce travail, la réponse chez *Atriplex halimus* au stress oxydant induit par le cuivre a été estimée par l'analyse sur le gel (PAGE) des activités des principales enzymes limitant l'action des ROS ; La superoxyde-dismutase, la catalase et la peroxydase, aussi que le contenu en protéines et chlorophylle. Ces enzymes permettent la désintoxication de l'excès des ROS et gardent l'équilibre entre leurs formations et leurs suppressions. L'apparition de nouvelles formes de catalase et de superoxyde-dismutase, et l'accroissement des activités de ces enzymes observées dans cette étude sont supposés pour limiter les dommages cellulaires et pour augmenter la capacité antioxydante d'*A. halimus* de faire face au stress provoqué par le cuivre.

Références bibliographiques

- Abbad, A., Cherkaoui, M., Benchaabane, A., 2003. Morphology and allozyme variability of three natural populations of *Atriplex halimus* L. *Ecologica Mediterranea* 29: 99–109.
- Abbad, A., Cherkaoui, M., Wahid, N., El Hadrami, A., Benchaabane, A., 2004. Variabilités phénotypique et génétique de trois populations naturelles d'*Atriplex halimus*. *C. R. Biologies* 327: 371–380.
- Alazzeah, A.Y., Abu-Zanat, M.M., 2004. Impact of feeding saltbush (*Atriplex* sp.) on some mineral concentrations in the blood serum of lactating Awassi ewes. *Small Ruminant Research* 54 : 81–88.
- Allen, R.D., 1995. Dissection of Oxidative Stress Tolerance Using Transgenic Plants. *Plant Physiol.* 107: 1049-1 054
- Anderson, M.D., Prasad, T.K., Stewart, C.R., 1995. Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase, and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotyls of maize seedlings. *Plant Physiol.* 109: 1247-1 257
- Arnon, D., 1949. Copper enzymes in isolated chloroplast: polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.* 24, 1–15.
- Bajji, M., Kinet, J.M., Lutts, S., 1998. Salt stress effects on roots and leaves of *Atriplex halimus* L. and their corresponding callus cultures. *Plant Sci.* 137:131–42.
- Ben Salem, H., Abdouli, H., Nefzaoui, A., El-Mastouri, A., Ben Salem, L., 2005. Nutritive value, behaviour, and growth of Barbarine lambs fed on oldman saltbush (*Atriplex nummularia* L.) and supplemented or not with barley grains or spineless cactus. *Small Ruminant Research* 59 : 229–237.
- Bonjoch, N.P., Tamayo, P.R., 2003. Protein content quantification by Bradford method. *Handbook of Plant Ecophysiology Techniques*, 283–295.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Anal Biochem* ; 72:248–54.
- Brewer, G.J., Achromatic regions of tetrazolium stained starch gels: inherited electrophoretic variation, *Am. J. Hum. Genet.* 19, 674, 1967.
- Briat, J.F., Lebrun, M., 1999. Plant responses to metal toxicity. *Plant Biology and Pathology* 322, 43-54.

- Chaignon, V., 2001. Biodisponibilité du cuivre dans la rhizosphère de différentes plantes cultivées. Cas de sols viticoles contaminés par des fongicides. Thèse : Ecole doctorale, Sciences de l'Environnement : Système Terre, Université d'Aix-Marseille.
- Demirevska-Kepova, K., Simova-Stoilova, L., Stoyanova, Z., Hölzer, R., Feller, U., 2004. Biochemical changes in barley plants after excessive supply of copper and manganese. *Environmental and Experimental Botany* 52: 253–266.
- Duffus, J.H., 2002. “Heavy metals” a meaningless term? *Pure Appl. Chem.*, Vol. 74, No. 5, pp. 793–807.
- E Saint-Pierre., 1992. Mise en évidence d'un mécanisme de tolérance chez *Scenedesmus quadricauda* suite à une intoxication à long term au cuivre. These ; B.Sc. en Biologie. Université du Quebec.
- El-Shatnawi, M.J., Mohawesh, Y., 2000. Seasonal chemical composition of saltbush in semiarid grasslands of Jordan. *Journal of Range Management* 53: 211–214.
- El-Shatnawi, M.J., Turuuk, M., 2002. Dry matter accumulation and chemical content of saltbush (*Atriplex halimus*) grown in Mediterranean desert shrublands, *New Zealand Journal of Agricultural Research*. Vol. 45: 139–144
- Feierabend, J., 2005. Catalases in plants: molecular and functional properties and role in stress defence. *Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants*. 101- 140.
- Ferchichi, O.H., 2005. Effect of mineral concentration of culture media without growth substances on the callogenesis of *Atriplex halimus* L. *African Journal of Biotechnology* Vol. 4 (9), pp. 960-962.
- Fernandes, J.C., Henriques, F.S., 1991. Biochemical, physiological, and structural effects of excess copper in plants. *Bot. Rev.* 57 (3), 246–273.
- Gomes-Juniora, R.A., Moldesa, C.A., Delitea, F.S., Gratãoa, P.L., Mazzaferab, P., Leac, P.J., Azevedoa, R.A., 2006. Nickel elicits a fast antioxidant response in *Coffea arabica* cells. *Plant Physiology and Biochemistry* 44: 420–429.
- Graham, R.C., Lundholm, U., Karnovsky, M.J., 1964. Cytochemical demonstration of peroxidase activity with 3-amino-9- ethylcarbazole, *J. Histochem. Cytochem.*, 13, 150.
- Gratao, P.L., Monteiro, C.C., Antunes, A.M., Peres, L.E.P., Azevedo, R.A., 2008. Acquired tolerance of tomato (*Lycopersicon esculentum* cv. Micro-Tom) plants to cadmium-induced stress. *Ann Appl Biol* 153: 321–333.
- Gwozdz, E.A., Pryzymusonski, R., Rucinska, R., Deckert, J., 1997. Plant cell responses to heavy metals: molecular and physiological aspects, *Acta Physiol. Plant.* 19: 459–465.

- Irwin, U., Ajmal, K., 2001. Effect of Bracteoles on Seed Germination and Dispersal of Two Species of *Atriplex*. *Annals of Botany* 87: 233-239.
- Islam, M.M., Hoque, A., Okuma, E., Banu, N.A, Shimoishi, Y., Nakamura, Y., Murata, Y., 2009. Exogenous proline and glycinebetaine increase antioxidant enzyme activities and confer tolerance to cadmium stress in cultured tobacco cells. *Journal of Plant Physiology*. 1-11.
- Jayakumar, K., Abdul Jaleel, C., Vijayarengan, P., 2009. Effect of Different Concentrations of Cobalt on Pigment Contents of Soybean. *Botany Research International* 2 (3): 153-156.
- John, R., Ahmad, P., Gadgil, K., Sharma, S., 2009. Heavy metal toxicity: Effect on plant growth, biochemical parameters and metal accumulation by *Brassica juncea L.* *International Journal of Plant Production*. 3(3): 65-76.
- Kabata-Pendias, A., Pendias, H., 2001. Trace elements in soils and plants. 3rd CRC Press, Boca Raton, London, New-York, Washington D.C.
- Kaplan, Z., Plackove, I., Stepenek, J., 2002. *Potamogeton xfluitans* (*P. natans* × *P. lucens*) in the Czech Republic. II. Isozyme analysis. – *Preslia, Praha*, 74: 187–195.
- Kelley, B.D., Goodin, J.R., Miller, D.R., 1982. Biology of *Atriplex*. In : Contribution to the ecology of Halophytes. Ed. Dr W. Junk, London, pp. 79-107.
- Kinet, J.M., Benrebiha, E., Bouzid, S., Laihacar, S., Dutuit, P., 1998. Biodiversity study on *Atriplex halimus* for in vitro and in vivo detection of plants resistant to harsh environmental conditions and for potential micropropagation, *Cah. Agric.* 7 (6) : 505–509.
- Kopyra, M., Gwozdz, E.A., 2003. Nitric oxide stimulates seed germination and counteracts the inhibitory effect of heavy metals and salinity on root growth of *Lupinus luteus* *Plant Physiology and Biochemistry* 41: 1011–1017.
- Laemmler, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Laouar, S., 1977. Caractéristiques écophysiological et aspects de l'économie de l'eau de l'olivier (*Olea europaea L.*) et de l'oranger (*Citrus sinensis L. Osbeck*). Thèse de Doctorat d'Etat Es-Science, Université Paris VII, 247.
- Le Houérou, H.N., 1992. The role of saltbushes (*Atriplex spp.*) in arid land rehabilitation in the Mediterranean Basin: a review. *Agroforestry Systems* 18: 107–148.
- Leduc, D. Terry, N., 2006. Genetic engineering stress tolerant plants for phytoremediation. *Abiotic Stress Tolerance in Plants-Toward the Improvement of Global Environment and Food*. 121-134.

- Lichtenthaler, H.K., 1996. Vegetation stress: An introduction to the stress concept in plants. *J Plant Physiol*; 148:4-14
- Lijun, L., Xuemei, L., Yaping, G., Enboa, M., 2005. Activity of the enzymes of the antioxidative system in cadmium-treated *Oxya chinensis* (*Orthoptera Acridoidae*). *Environmental Toxicology and Pharmacology* 20: 412–416.
- Lutts, S., Lefèvre, I., Delperee, C., Kivits, S., Dechamps, C., Robledo, A., Correal, E., 2004. Heavy metal accumulation by the halophyte species Mediterranean Saltbush. *J. Environ. Qual.* 33, 1271–1279.
- Maksymiec, W., Ryszard, R., Urbanik-Sypniewska, T., Baszyński, T., 1994. Effects of Cu on the photosynthetic apparatus of runner bean leaves treated at two different growth stages. *Physiol. Plant* 91, 715–721.
- Manchenko, G P., 2003. Handbook of detection of enzymes on electrophoretic gels. CRC Press LLC. Pp 158-162; 168; 169.
- Manousaki. E., Kalogerakis, N., Phytoextraction of Pb and Cd by the Mediterranean saltbush (*Atriplex halimus* L.): metal uptake in relation to salinity. *Environ Scie and Pollu Res.* Cost action 859 • Phytoremediation research action • Research article DOI10.1007/s11356-009-0224-3. 2009
- Martínez, J.P., Ledent, J.F., Bajji, M., Kinet, J-M., Lutts, S., 2003. Effect of water stress on growth, Na⁺ and K⁺ accumulation and water use efficiency in relation to osmotic adjustment in two populations of *Atriplex halimus* L.. *Plant Growth Regulation* 41, 63-73.
- Martinez, J.P., Lutts, S., Schank, A., Bajji, M., Kinet, J.M., 2004. Is osmotic adjustment required for water stress resistance in the Mediterranean shrub *Atriplex halimus* L.? *J. Plant Physiol.* 161, 1041–1051.
- Meagher, R. B., 2000. Phytoremediation of toxic elemental and organic pollutants. *Current Opinion in Plant Biology*, 3, 153–162.
- Micales, A., Bonde, M., 1995. *Isozymes: Methods and Applications* .By CRC Press, Inc. pp 115-130.
- Migahid, M.M., 2003. Effect of salinity shock on some desert species native to the northern part of Egypt. *Journal of Arid Environments.* 53: 155–167
- Mittler, R., 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance .*TRENDS in Plant Science* Vol.7 No.9 ; 405-410
- Morkunas, I., Bednarski, W., Kopyra M., 2008. Defense strategies of pea embryo axes with different levels of sucrose to *Fusarium oxysporum* and *Ascochyta pisi*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 72: 167–178

- Mozafar, A., Goodin, J.R., 1970. Vesiculated hairs: a mechanism for salt tolerance in *Atriplex halimus* L. *Plant Physiology* 45, 62–65.
- Nedjimi, B., Daoud, Y., 2008. Cadmium accumulation in *Atriplex halimus subsp. schweinfurthii* and its influence on growth, proline, root hydraulic conductivity and nutrient uptake. *Flora* (2008), oi:10.1016/j.flora.2008.03.004
- Ortiz-Dorda, J., Martinez-Mora, C., Correal, E., Simon, B., Cenis, J.L., 2005. Genetic structure of *Atriplex halimus* populations in the Mediterranean basin. *Ann. Bot.* 95, 827–834.
- Pasiecznik NM, Vera Cruz MT, Harris PJC., 1996. The current status of *Atriplex* on the Cape Verde Islands. *J Arid Environ* 34: 512.
- Piotto, B., Bartolini, G., Bussotti, F., García, A. A. C., Chessa I, Ciccarese C., Ciccarese L., Crosti R., Cullum F. J., Noi A.D., García-Fayos P, Lambardi M., Lisci M., Lucci S, Melini M., Reinoso J. C. M., Murrancia S., Nieddu G., Pacini E, Pagni G., Patumi M., García F. P., Piccini C., Rossetto M., Tranne G. and Todeusz Tytkowski T., 2003. Fact sheets on the propagation of Mediterranean trees and shrubs from seed. Seed propagation of Mediterranean trees and shrubs. APAT - Agency for the protection of the environment and for technical services Via Vitaliano Brancati, 48 - 00144 Roma – Italy. April 2003.
- Polle, A., Schützendübel, A., 2004. Heavy metal signalling in plants: linking cellular and organismic responses. *Plant Responses to Abiotic Stress*. 187-216.
- Prasad, M.N.V., Hagemeyer J., 1999. Heavy metal stress in plants. From molecules to ecosystems. Springer. 401.
- Rai, A.K., Takabe, T. *Abiotic Stress Tolerance in Plants*, Springer. Printed in the Netherlands 2006; 123-133.
- Ramirez-Rodriguez, V., Lopez-Bucio, J., Herrera-Estrella, L., 2005. Adaptive responses in plants to nonoptimal soil pH. *Plant Abiotic Stress*. 145- 170.
- Rausser, W.E., 1995. Phytochelatins and related peptides. Structure, biosynthesis and function, *Plant Physiol.* 109, 1141–114
- Remon, E., 2006. Tolérance et accumulation des métaux lourds par la végétation spontanée des friches métallurgiques: vers de nouvelles méthodes de bio-dépollution. Thèse : Faculté des sciences et techniques. Université Jean Monnet.
- Salahas, G., Cormas, E., Zervoudakis, G., 2002. Cold inactivation of phosphoenolpyruvate carboxylase and pyruvate orthophosphate dikinase from the C4 perennial plant *Atriplex halimus*. *Russ. J. Plant Physiol.* 49, 211–215.
- Schützendübel, A., Polle, A., 2002. Plant responses to abiotic stress: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *J Exp Bot.* 53(372): 1351–65.

- Sean, R., Gallagher, Emily, A., 2008. Current Protocols Essential Laboratory Techniques. John Wiley & Sons, Inc. 143-154 ; 288-323 ; 610-621.
- Słomka, A., Libik-Konieczny, M., Kutaa, E., Miszalski, Z., 2008. Metalliferous and non-metalliferous populations of *Viola tricolor* represent similar mode of antioxidative response. *Journal of Plant Physiology* 165 : 1610—1619
- Sobkowiak, R., Rymer, K., Rucińska, R., Deckert, J., 2004. Cadmium-induced changes in antioxidant enzymes in suspension culture of soybean cells. *Acta biochimica polonica*. Vol. 51 No. 1. 219–222.
- Streb, P., Tel-Or E., Feierabend, J., 1997. Light stress effects and antioxidative protection in two desert plants. *Ecological Society. Functional Ecology*. 11, 416–424
- Talamali, A., Bajji, M., Le Thomas, A., Kinet, J.M., 2003. Dutuit P. Flower architecture and sex determination: how does *Atriplex halimus* L. play with floral morphogenesis and sex genes? *New Phytol.* 157 : 105–113.
- Talamali, A., Dutuit, P., Le Thomas, A. and Gorenflot, R., 2001. Polygamie chez *Atriplex halimus* L. (*Chenopodiaceae*). *C.R. Acad. Sci. Paris, Sciences de la Vie* 324, 107-113.
- Teisseire, H., Guy, V., 2000. Copper-induced changes in antioxidant enzymes activities in fronds of duckweed (*Lemna minor*). *Plant Science* 153, 65–72.
- Tibayrenc, M., 1979. Les isoenzymes et l'entomologie médicale. *Cal!. O.R.S.T.O.M., sér. Ent. tnéd. et Parasitol.*, vol. XVII, no 4 : 249-256
- Tong, Y.P., Kneer, R., Zhu, Y.G., 2004. Vacuolar compartmentalization: a second-generation approach to engineering plants for phytoremediation. *Trends Plant Sci*; 9:7–9.
- Tremel-Schaub, A., Feix, I., 2005. Contamination des sols Transferts des sols vers les plantes. *EDP Sciences/ADEME*. 09-11 ; 18-56.
- Walker, D.J., Monino, I., Gonzalez, E., Frayssinet, N., Correal, E., 2005. Determination of ploidy and nuclear DNA content in populations of *Atriplex halimus* (*Chenopodiaceae*). *Botanical Journal of the Linnean Society* 147, 441–448.
- Walker, D.J., Romero, P., Hoyos, A., Correal, E., 2008. Seasonal changes in cold tolerance, water relations and accumulation of cations and compatible solutes in *Atriplex halimus* L. *Environmental and Experimental Botany* 64 : 217–224
- Wang, J.Z., Fan, M., 2002. *Hand Book of Protein Technology*. Science Press, Beijing.
- Weckx, J.E.J., Clijsters, H.M.M., 1996. Oxidative damage and defense mechanisms in primary leaves of *Phaseolus vulgaris* as a result of root assimilation of toxic amounts of copper, *Physiol. Plant.* 96: 506–512.

- Wong, C.H, Jager, H.J., 1978. Salt-induced vesiculation in mesophyll cells of *Atriplex* species. *Plant Science Letters*, 12 : 63-68
- Xu, Q., Chen, H., Cheng, J., Gao, H., 2001. Injure of cadmium on cell membrane of rape leaf and its protection mechanism. *Agro-environ. Protect.* 20 (4), 235–237.
- Xu, Q., Shi, G., Zhou, H., Xu, N., Zhang, X., Zeng, X., 2003. Effect of Cd and Zn combined pollution on chlorophyll content and scavenging system of activated oxygen in leaves of *Ottelia alismoides* (L.) pers. *Chin. J. Ecol.* 22 (2), 5–8.
- Zengin, F.K., Munzuroglu, O., Effects of some heavy metals on content of chlorophyll, praline and some antioxidant chemicals in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedlings. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica* 47/2: 157–164.
- Zhang, F.Q., Wang, Y.S., Lou, Z.P., Dong, G.D., 2007. Effect of heavy metal stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of two mangrove plant seedlings (*Kandelia candel* and *Bruguiera gymnorrhiza*) . *Chemosphere* 67: 44–50.
- Zhang, H., Xu, W., Guo, J., He, Z., Ma, M., 2005. Coordinated responses of phytochelatins and metallothioneins to heavy metals in garlic seedlings, *Plant Sci.* 169 ; 1059-1065.

Annexes:

Annexe 01:

Pour mesurer la conductivité du sable on prépare une solution de 20% du sable, on agite pendant quelle minutes puis on mesure la conductivité du surnagent dans un conductimètre.

Annexe 02:

2.1. Solutions utilisées dans électrophorèse en conditions non dénaturantes

2.1.1. Solution de polyacrylamide 100 ml

30 g acrylamide

0,8 g bis-acrylamide

Ajouter l'eau distillée jusqu'à 100 ml

2.1.2. Tampon de séparation 100 ml

1,5 M tris-HCl (pH 8,8)

18,2 g Tris dans 40 ml H₂O

Ajouter HCl jusqu'au pH 8,8

Ajouter H₂O jusqu'à 100 ml

2.1.3. 10% Ammonium persulfate, 5 ml

0,5 g Ammonium persulfate

5 ml H₂O

2.1.4. Tampon d'électrophorèse

3 g Tris 25 mM

14,4 g glycine 192 mM

H₂O jusqu'à 1 litre (pH finale doit être 8,8)

2.2. Composition et méthode de calcul le pourcentage (X%) de polyacrylamide dans

le gel

Solution de polyacrylamide	X/3 ml
Solution de séparation	2,5 ml
H ₂ O	(7,5 - X/3) ml
10% persulfate d'ammonium	50 µl
TEMED	5 µl (10 µl si X < 8%)

 Volume total 10 ml

Annexe 03:**Solutions utilisées pour la SDS-PAGE****1. Tampon phosphate salin (PBS; Phosphate-buffered saline)**

0,23 g NaH₂PO₄ (anhydre; 1,9 mM)

1,15 g Na₂HPO₄ (anhydre; 8,1 mM)

9,00 g NaCl (154 mM)

Ajouter H₂O jusqu'à 900 ml

Ajuster jusqu'au pH (7,2 à 7,4) en utilisant 1 M NaOH ou 1 M HCl

Ajouter H₂O jusqu'à 1 litre

2. Solution de polyacrylamide 100 ml

30 g acrylamide

0,8 g bis-acrylamide

Ajouter l'eau distillée jusqu'à 100 ml

3. Tampon de séparation 100 ml

1,5 M tris-HCl (pH 8,8)

0,4% SDS

Ajouter H₂O jusqu'à 100 ml

4. Tampon d'empilement, 100 ml

0,5 M tris-HCl (pH 6,8)

0,4% SDS

Ajouter H₂O jusqu'à 100 ml

5. 10% Ammonium persulfate, 5 ml

0,5 g Ammonium persulfate

5 ml H₂O

6. Tampon d'électrophorèse

3 g Tris 25 mM

14,4 g glycine 192 mM

1 g SDS

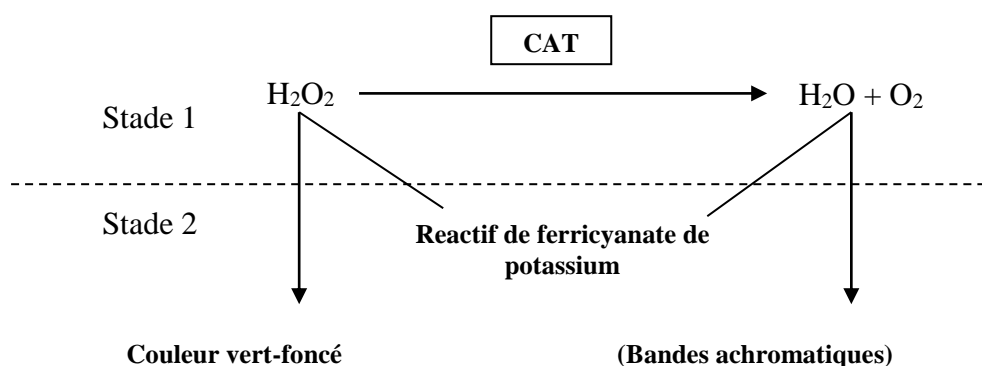
H₂O jusqu'à 1 litre (pH finale doit approximativement être 8,3)

Annexe 04:

4.1. Solution de révélation des enzymes

4.1.1. Catalase; CAT (1.11.1.6)

Schémas de réaction (Manchenko, 2003)



Solution de révélation (Manchenko, 2003)

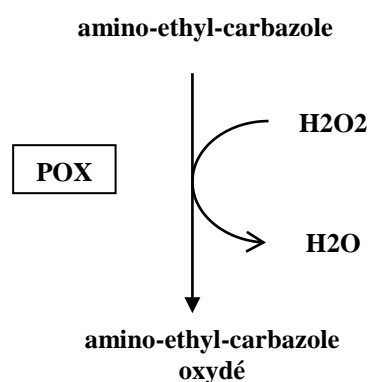
- A. 3% H_2O_2
- B. 2% ferricyanate de potassium
- C. 2% chlorure Ferrique

Procédure

L'activité de CAT est visualisée après électrophorèse sur gel de polyacrylamide de 8%. Le gel est incubé en solution A pendant environ 15 minutes. Il est ensuite retiré et rincé avec de l'eau, puis immergé dans un mélange de 1:1 des solutions B et C. Le plateau contenant le gel est doucement agité pendant quelques minutes. Des bandes jaune représentant l'activité de CAT apparaissent sur un fond bleu-vert. Enfin, le gel est lavé dans de l'eau.

4.1.2. Peroxidase; POX (1.11.1.7)

Schémas de réaction (Manchenko, 2003)



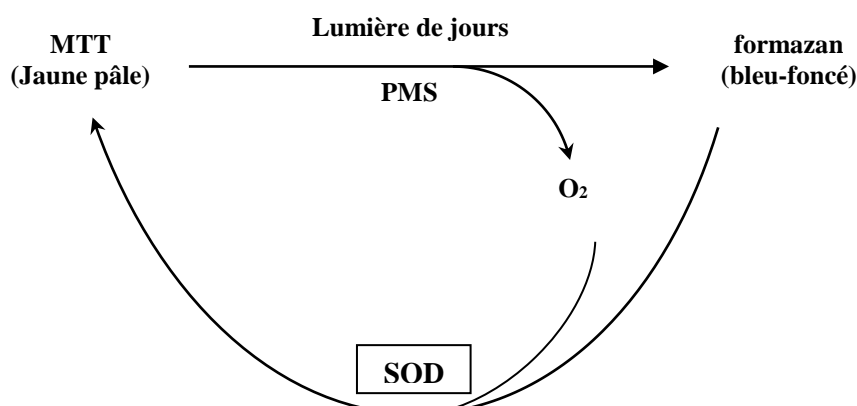
Solution de révélation (Graham et al., 1964)

50 mM Tampon acétate de sodium, pH 5.0	100 ml
3-Amino-9-ethyl-carbazole (dissous dans une petite quantité d'acétone)	50 mg
3% H ₂ O ₂ (récemment préparée)	0.75 ml

Procédure

Les bandes de POX sont détectées sur gel de polyacrylamide de 10% comme suit :

Le gel est incubé en solution de révélation dans l'obscurité à une température ambiante ou à 4°C jusqu'à ce que des bandes rouge-brun apparaissent. Il est ensuite lavé avec de l'eau puis fixé en glycérol 50%.

4.1.2. Superoxyde Dismutase; SOD (1.15.1.1)**Schémas de réaction (Manchenko, 2003)****Solution de révélation (Brewer, 1967)**

50 mM Tampon tris-HCl, pH 8.5	80 ml
MTT	10 mg
PMS	6 mg
MgCl ₂ .6H ₂ O	15 mg

Procédure

Les bandes de SOD sont détectées sur gel de polyacrylamide de 10% comme suit :

Le gel est incubé dans la solution de révélation dans la lumière. Les bandes d'enzymes sont vues en tant que zones pâles sur un fond bleu-foncé.

4.2. Solution de révélation des protéines

4.2.1. Solution de coloration, 1 litre

1 g Blue de Coomassie

450 ml methanol

450 ml H₂O

100 ml acide acétique glacial

4.2.2. Solution de décoloration, 1 litre

100 ml methanol

100 ml acide acétique glacial

800 ml H₂O

Annexe 05:

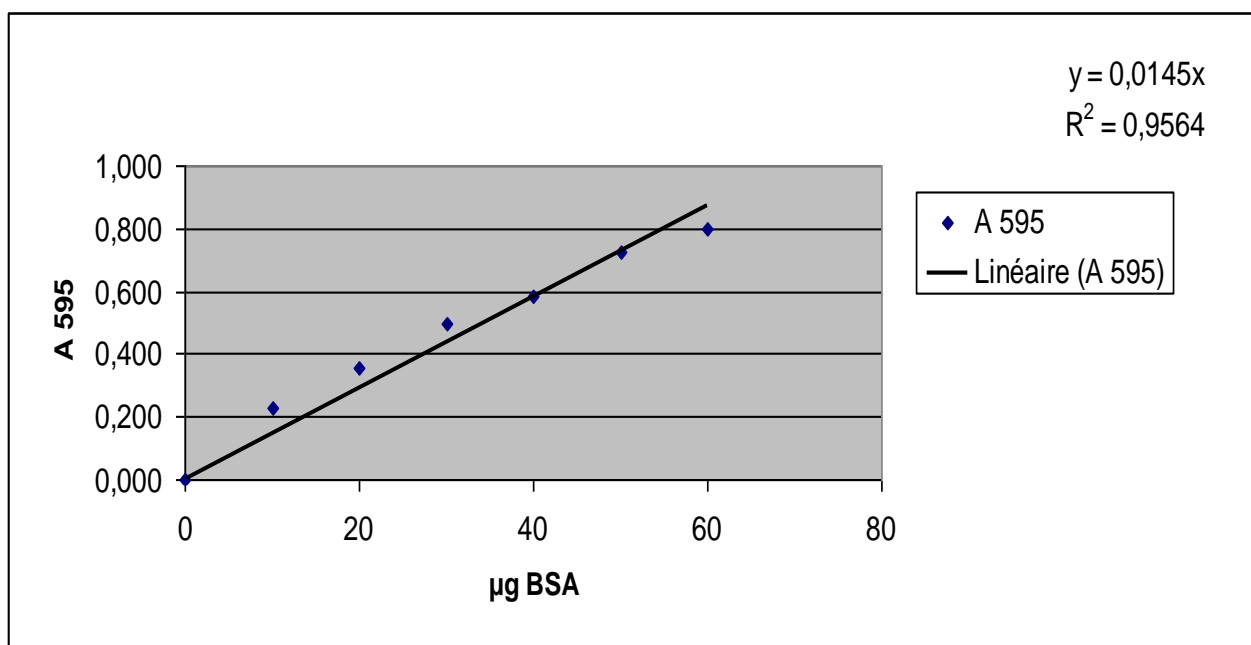
Fixation des gels

Le gel est rincé puis fixé dans une solution de 50% de glycérol.

Pour la catalase et la superoxyde-dismutase la fixation se fait dans une solution 25% d'éthanol.

Annexe 06:**Tableau :** courbe d'étalonnage

Echantillon N°	protéine (µg)	solution standard (1mg\1ml BSA µl)	Tampon expérimental (µl)	réactif de Bradford (ml)	A595	moyenne
1	0	0	200	2	0	0
2	0	0	200	2	0	
3	10	10	190	2	0,218	0,2275
4	10	10	190	2	0,237	
5	20	20	180	2	0,361	0,359
6	20	20	180	2	0,357	
7	30	30	170	2	0,496	0,497
8	30	30	170	2	0,498	
9	40	40	160	2	0,58	0,5865
10	40	40	160	2	0,593	
11	50	50	150	2	0,738	0,725
12	50	50	150	2	0,712	
13	60	60	140	2	0,785	0,797
14	60	60	140	2	0,809	

**Fig. courbe d'étalonnage des protéines**

Résumé

Notre étude porte sur l'effet des métaux lourds (cas du Cu) sur la plante d'*Atriplex halimus* cultivée en condition hydroponique. L'objectif de cette étude est d'analyser un certains nombres de systèmes enzymatiques de la plante en réponse aux stress provoqués par le cuivre (sous forme de CuSO₄).

Les analyses portent sur les profils enzymatiques, sur la teneur en protéines et le contenu en chlorophylle dans les feuilles *A. halimus*.

La plante a été soumise à différentes concentrations en CuSO₄ (50, 500, 1000 et 2000 µM). Les échantillons sont prélevés pour analyse après 6, 24 et 48 heures. Les résultats montrent que le contenu en chlorophylle diminue significativement avec l'accroissement de la dose en Cu, et à l'inverse la teneur en protéine subit une légère diminution après 6^h (38%) à 2000 µM Cu, puis une augmentation jusqu'à 155% à 500 µM après 48^h. Le gel d'électrophorèse en condition non dénaturante (PAGE) a révélé trois isoformes CAT, trois isoformes SOD et cinq isoformes POX. Une nouvelle isoforme SOD et deux nouvelles isoformes CAT par rapport au témoin ont été trouvées suite au traitement en Cu. La densité des bandes de ces trois enzymes s'accroît avec l'augmentation de la concentration du Cu.

Mots clés : *Atriplex halimus*; Cuivre (Cu); Stress oxydant; Superoxyde dismutase (SOD); Catalase (CAT); Peroxydase (POX); Isoenzyme.

Abstract

Our study showed the effect of heavies metals (Cu) on *Atriplex halimus* grown in hydroponics conditions. The aim of this work was to investigate some enzymatic systems response of this plant to copper stress.

Analyses were carried in enzymatic profiles, protein tenor and chlorophyll content in *A. halimus* leaves.

This plant was subject to different concentrations of CuSO₄ (50, 500, 1000 and 2000 µM) and samples were analyse after 6, 24 and 48hour. Results demonstrate that chlorophyll content declined progressively with increasing concentrations of copper. In contrast, protein content decreased after 6 hour to 38% at 2000 µM CuSO₄, and then increased after 48 hour to 155% at 500 µM CuSO₄. Non-denaturing PAGE revealed three CAT isoformes, three SOD isoformes and five POX isoformes. One new SOD isoforme and two news CAT isoformes were found as respond to high concentration of Cu. The bands density of these enzymes increased with increasing of Cu-dose.

Keywords: *Atriplex halimus*, Copper (Cu); Oxidative stress; Superoxyde dismutase (SOD); Catalase (CAT); Peroxydase (POX); Isoenzyme.