



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche
Scientifique



Université Abdelhamid Ben Badis-Mostaganem
Faculté des sciences de la nature et de la vie
Département des sciences agronomiques

Thèse de doctorat en sciences

Filière : sciences agronomiques

Option : biotechnologie végétale

Présenté par :

Mohammed MESNOUA

**Stress abiotiques sur *Atriplex halimus* L : Effet des métaux lourds et caractérisation
des biomarqueurs et bioindicateurs.**

La composition du Jury de soutenance :

Nom et Prénom	Grade	Qualité	Appartenance administrative
Abdellah BERKANI	Pr.	Président	Université de Mostaganem
Ahmed ADDA	Pr.	Examineur	Université de Tiaret
Moulay BELKHODJA	Pr.	Examineur	Université d'Oran
Ali MILOUDI	Pr.	Examineur	Université de Mascara
Kaddour BOUDEROUA	Pr.	Examineur	Université de Mostaganem
Brahim LOTMANI	Pr.	Directeur de thèse	Université de Mostaganem

Année universitaire 2016-2017

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 Monsieur Brahim LOTMANI, Professeur à l'Université de Mostaganem, qui m'a permis d'effectuer ma thèse sous sa direction et pour la confiance qu'il a su m'accorder.

Je suis particulièrement reconnaissant à Monsieur Abdellah BERKANI, Professeur à l'Université de Mostaganem pour l'honneur qu'il m'a fait d'avoir accepté de présider le jury de ma thèse. Qu'il soit assuré de ma respectueuse considération.

Je remercie énormément Monsieur Moulay BELKOHDA, Professeur à l'Université d'Oran, Monsieur Ahmed ADDA, Professeur à l'Université de Tiaret et Monsieur Ali MILOUDI, Professeur à l'Université de Mascara qui ont bien voulu accepter d'examiner ce mémoire.

Mes remerciements s'adressent aussi à Monsieur Kaddour BOUDEROUA, Professeur à l'Université Abdelhamid Ibn Badis-Mostaganem d'avoir accepté d'être parmi les examinateurs de ce manuscrit.

J'adresse tous mes sincères remerciements également à Susana Redondo Gómez et Enrique, professeur à l'Université de Seville Mateos Naranjo, professeur à l'Université de Seville pour leurs conseils d'experts. J'ai bien profité de leurs expériences qui m'ont permis d'acquies excellentes connaissances de mettre à jour mes connaissances et compétences.

Mes remerciements s'adressent aussi à Madame la Directrice du Centre de Recherche Scientifique et Technique sur les Régions Arides pour ses encouragements.

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

Liste des Abréviations

A_N	Photosynthèse nette
APX	Ascorbate peroxydase
BF	Facteur de bioaccumulation
BFC	facteur de bioconcentration
CAT	Catalase
Ch a	Chlorophylle a
Ch b	Chlorophylle b
C_i	Concentration intercellulaire en CO_2
EL	Fuite d'électrolytes
ETM	Élément trace métallique
F	Fluorescence variable induite par une illumination actinique continue
F_0	Rendement de fluorescence minimal
F_m	Rendement de fluorescence maximal
F_m'	Rendement maximal de fluorescence sous éclaircissement
F_s	Fluorescence stationnaire
F_v	Fluorescence variable
F_v/F_m	Rendement quantique maximal du photosystème II
GPx	Gaiacol peroxydase
Gs	Conductance stomatique

Gs	Conductance stomatique
iWUE	Efficiencce de l'utilisation de l'eau intrinsèque
MEA	quantité d'extraction des métaux (Metal extraction amount)
Φ_{NPQ}	<i>Quenching</i> non-photochimique
PFA, PFR	Poids frais des parties aériennes, racinaires
PI _{chr}	Photoinhibition chronique
PI _{dyn}	Photoinhibition dynamique
PQ	Plastoquinone
PS I, II	Photosystèmes I, II
PSA, PSR	Poids sec des parties aériennes, racinaires
qP	Quenching photochimique
RGR	Vitesse relative de croissance (relative growth rate)
ROS	Espèces réactives de l'oxygène (Reactive Oxygen Species)
SLA	Surface spécifique foliaire (specific leaf area)
SOD	Superoxyde dismutase
T0	Temps en jours pour la germination de la première graine
T50	Nombre de jours nécessaires pour que 50% des graines puissent germer

TF	Facteur de translocation
Φ PSII	Rendement quantique du photosystème II

Table des Matières

Introduction générale.....	1
Chapitre I : Synthèse Bibliographique	6
I : Interaction entre les métaux lourds et les plantes.....	6
I.1. Généralité sur les métaux lourds	6
I.2. Origine et phytodisponibilité ETM étudiés :.....	6
I.2.1. Origine	6
I.2.2. Phytodisponibilité.....	7
I.3 Absorption, transport, accumulation et excrétion des ETM par les plantes.....	9
I.3. 1. Pénétration des éléments traces par les parties aériennes	9
I.3. 2. Absorption racinaire	9
I.3. 3. Translocation	10
I.3. 4. Accumulation.....	12
I.3. 5. Les excrétions des ETM par la plante	12
I.4. Toxicité des ETM et stratégies de tolérance des plantes	13
I.4. 1. Les principaux effets des ETM sur les plantes	13
I.4. 1. 1. Effet des ETM sur la germination	13
I.4. 1. 2. Effet des ETM sur la croissance et la nutrition minérale.....	13
I.4. 1. 3. Effet des ETM sur la photosynthèse	14
I.4. 1. 4. Les ETM induisent la surproduction des espèces réactives de l'oxygène (ROS)	14
I.4.2. Stratégies et mécanismes de tolérance des plantes	15
I.4.2.1. La paroi cellulaire et la membrane plasmique	15
I.4.2.2. Système anti-oxydant.....	16
I.4.2.3. La chélation et la compartimentation cellulaire	16
I.4.2.3.1. La chélation des ETM.....	16
I.4.2.3.2. La compartimentation des ETM	17
I.4.4. Autre mécanismes.....	18
I.5. Classification des plantes selon leur interaction avec les ETM	19
II. Stress oxydant et notion des biomarqueurs	20
II. 1. Le stress oxydatif	20

II. 1. 1. Les Espèces Réactives de l'Oxygène	21
II. 1. 1. 1. Les principales espèces réactives de l'oxygène	21
II. 1. 1. 2. Sources des espèces réactives de l'oxygène.....	22
II. 1. 2. Les métaux lourds induisent la production de ROS.....	24
II. 1. 3. Les systèmes antioxydants enzymatiques	24
II. 1. 3. 1. Les superoxydes dismutases (SOD)	24
II. 1. 3. 2. Les catalases (CAT).....	25
II. 1. 3. 3. Les peroxydases (GPx)	25
II. 1. 3. 4. Autres enzymes et molécules antioxydantes	26
II. 2. Stress oxydant et notion des biomarqueurs	26
III. Interaction des ETM avec l'appareil photosynthétique	27
III. 1. Photosynthèse	27
III.1.1. La structure du photosystème II.....	29
III.1.1.1. Les antennes collectrices de lumière du photosystème II	29
III. 1. 2. 2. Le centre réactionnel du photosystème II.....	30
III. 1. 1. 2. Pigments photosynthétiques et l'absorption de l'énergie lumineuse	32
III. 1. 2. Structure et fonctionnement du photosystème I.....	33
III. 2. La fluorescence chlorophyllienne comme biomarqueur du stress	34
IV. <i>Atriplex halimus</i> L.....	35
IV.1. Introduction	35
IV.2. Répartition géographique et de l'habitat.....	35
IV.3. Botanique et génétique d' <i>A. halimus</i>	35
IV.4. Résistance d' <i>A. halimus</i> aux différents stress	36
IV.4.1. Résistance à la température et la lumière	36
IV.4.2 Résistance à la salinité	36
IV.4.3. Résistance aux métaux lourds.....	38
IV.4.4. Résistance à la sécheresse	38
Chapitre II : Effet de quelques métaux lourds sur la germination et la croissance des plantules d' <i>Atriplex halimus</i> L.....	40
1. Introduction.....	40
2. Matériels et Méthodes.....	42
2.1. Récolte et préparation des graines	42
2.2. Matériel végétal et conditions de germination.....	42

2.3. Calcule des paramètres de la germination et de la croissance	43
2.4. Analyse statistique	44
3. Résultats	45
3.1. Les effets des métaux lourds sur la germination des semences	45
3.2. Les effets des métaux lourds sur le développement des plantules d' <i>A. halimus</i>	45
4. Discussion	50
5. conclusion.....	51
Chapitre III : caractéristique d'accumulation et de tolérance au cadmium chez <i>Atriplex halimus</i>	
L.	54
1. Introduction.....	54
2. Matériels et Méthodes.....	56
2.1. Condition de culture.....	56
2.2. Solution nutritive.....	57
2.3. Application du Cadmium	57
2.4. Analyses des biomarqueurs morphologiques et physiologiques	57
2.4.1. vitesse relative de croissance	58
2.4. 2. Surface spécifique foliaire (SLA)	58
2.4. 3. Mesure des échanges gazeux photosynthétiques.....	58
2.4. 4. Mesure de la fluorescence chlorophyllienne	61
2.4. 5. Mesure de la fuite d'électrolytes.....	66
2.5. Analyses des biomarqueurs biochimiques	66
2.5.1. Dosage des pigments chlorophylliens	66
2.5.2. Activités enzymatiques antioxydantes.....	67
2.5.3. Dosage du cadmium et éléments minéraux dans la plante	71
2.5.4. Facteur de translocation et bioaccumulation et teneur en ETM	72
2.6. Analyse statistiques.....	72
3. Résultats	73
3.1. Effet du cadmium sur la survie des plantules.....	73
3.2. Effet du cadmium sur la production en biomasse des plantules	73
3.3. L'effet du stress du Cd sur les échanges gazeux.....	74
3.4. L'effet du stress du Cd sur le contenue en pigments	77
3.5. Effet du stress du Cd sur la fluorescence chlorophyllienne	78
3.6. Effet du stress du Cd sur la fuite d'électrolytes.....	81

3.7. Effet du stress du Cd sur la teneur en protéines et les activités des enzymes antioxydantes	82
3.8. Effet du stress du Cd sur l'accumulation et la translocation de Cd au sein des plantules d' <i>A. halimus</i>	84
3.9. Effet du stress du Cd sur la nutrition en éléments minéraux.....	85
4. Discussion	91
4.1. Effet du stress du Cd sur la survie et la production en biomasse d' <i>Atriplex halimus</i> L.....	91
4.2. Effet du stress du Cd sur les paramètres photosynthétiques	92
4.3. Effet du stress du Cd sur la fuite d'électrolytes.....	94
4.4. Effet du stress par le Cd sur la teneur en protéines et les activités des enzymes antioxydantes	94
4.5. Effet du stress par le Cd sur l'accumulation du Cd et la nutrition minérale	95
5. Conclusion	97
Conclusion générale	98
Références bibliographiques	99
Résumé	121
Abstract	122

Liste des Figures

- Figure 1 : Transport latéral dans les racines. (1) Les poils absorbants absorbent l'eau et les sels minéraux, qui se déplacent le long des parois (voie apoplasmique). (2) Les minéraux et l'eau qui traversent les membranes plasmiques des poils absorbants entrent dans le cytosol (voie symplasmique). (3) Le long de la voie apoplasmique un peu d'eau et de minéraux sont transportées dans le cytosol des cellules, puis se déplacent via la voie symplasmique. (4) La bande Casparian, une bande d'une matière cireuse, ne permet que des minéraux dans le symplaste de passer dans le cylindre vasculaire à travers la membrane plasmique des cellules endodermiques. (5) Les cellules dans les vaisseaux vasculaires transportent l'eau et les minéraux à travers la plante.** 11
- Figure 2 . Diagramme illustrant les mécanismes impliqués dans la chélation et la compartimentation du cadmium dans la vacuole. Les PCs sont synthétisés à partir de la glutathion par la PC-synthase. L'exposition au cadmium stimule la synthèse des phytochélatines, qui forment rapidement avec le cadmium des complexes à " masse moléculaire faible " (LMW) puis complexes à "masse moléculaire moyenne" (MMW). Au niveau de tonoplaste, ces complexes acquérir le soufre (S₂⁻) et forment des complexes à "masse moléculaire élevé" (HMW) ayant une plus grande affinité envers des ions de cadmium. Ainsi, en particulier le complexe HMW semble être décisif dans la détoxification du cadmium. org. ac., acides organiques (Manske et Hilbi, 2014).** 18
- Figure 3 : classification des plantes en fonction de leurs concentrations en éléments traces métalliques.** 20
- Source (Ernst, 2006)** 20
- Figure 4. Structure schématique d'un chloroplaste (Buchanan, 2000).** 28
- Figure 5 : Modèle structurel du PSII** 31
- Figure 6 : (A) Plantes d'*Atriplex halimus* : subsp. *schweinfurthii* (à gauche) et *halimus* (à droite). Hauteur totale = 1,10 m (B) Les fruits et les graines d'*A. halimus* subsp. *schweinfurthii*. (C) Les fruits et les graines d'*A. halimus* subsp. *halimus*. (D) Graine d'*A. halimus* subsp. *schweinfurthii*. Diamètre = 1,2 mm. (E) Feuilles d'*A. halimus* subsp. *halimus* (Walker et al., 2014).** 37

Figure 7 : Germeoir contrôlé des semences	43
Figure 8 : Photo représentant les concentrations du Cd et du Cu qui inhibe la croissance des graines d' <i>Atriplex halimus</i> L	47
Figure 9 : Effet du cadmium sur la croissance de plantules d' <i>Atriplex halimus</i> L	48
Figure 10 : Effet des métaux lourds sur la croissance des semis d' <i>Atriplex halimus</i> L. Valeur moyenne \pm erreur standard (n = 6). Les différentes lettres indiquent des différences significatives entre les traitements et le témoin. Teste Newman Keuls ($p < 0,01$).	49
Figure 11 : <i>Atriplex halimus</i> L en serre contrôlée	56
Figure 12 : Présentation du Licor 6400. Cet instrument est composé d'une console (conditionnement des gaz), et d'une tête (comprenant la chambre foliaire et les IRGA). Source : Licor, notice technique	60
Figure 13 : Mini-PAM Fluorometer	64
Figure 14 : Schéma de la technique de mesure de l'émission de la fluorescence modulée de la chlorophylle d'une feuille. La lumière modulée émise par une LED à une longueur d'onde inférieure à 680 nm. Il lui correspond une fluorescence modulée qui, seule, est amplifiée par un amplificateur sélectif accordé sur la fréquence de modulation de la lumière modulée. La lumière actinique produit aussi une émission de fluorescence par la feuille. Cette émission n'est pas amplifiée. Une source de lumière sursaturante non modulée ferme tous les centres et produit aussi de la fluorescence non modulée qui n'est donc pas amplifiée. La lumière sursaturante est aussi une lumière actinique (Rzigui, 2011).	64
Figure 15 : poids sec (A), longueur des tiges (B), vitesse relative de croissance, RGR (C), et surface spécifique foliaire (D) d' <i>Atriplex halimus</i> L. après 22 jours de traitement avec différentes concentrations du Cd. Chaque valeur représente la moyenne de sept répétitions \pm SE. Pour chaque paramètre, les petites lettres différentes indiquent une différence significative (test de Tukey, $P < 0.05$).	74
Figure 16 : Poids frais (PF) des tiges et des racines d' <i>Atriplex halimus</i> L. après 22 jours de traitement avec différentes concentrations du Cd. Chaque valeur représente la moyenne de sept répétitions	

- ± SE. Pour chaque paramètre, les petites lettres différentes indiquent une différence significative (test de Tukey, $P < 0.01$). 75
- Figure 17 : l'effet du cadmium sur la morphologie des feuilles d'*Atriplex halimus* L. 75
- Figure 18. Nombre de feuilles vivantes (A) et mortes (B) chez *Atriplex halimus* L. après 22 jours de traitement avec différentes concentrations du Cd. Chaque valeur représente la moyenne de sept répétitions ± SE. Pour chaque paramètre, les petites lettres différentes indiquent une différence significative (test de Tukey, $P < 0.05$). 76
- Figure 19 : (A) photosynthèse nette (A_N), (B) conductance stomatique (g_s), (C) concentration intercellulaire en CO_2 (C_i) et (D) Efficience de l'utilisation de l'eau intrinsèque ($iWUE$) d'*Atriplex halimus* L. après 22 jours de traitement avec différentes concentrations du Cd. Chaque valeur représente la moyenne de sept répétitions ± SE. Pour chaque paramètre, les petites lettres différentes indiquent une différence significative (test de Tukey, $P < 0.05$). 77
- Figure 20 : (A) Chlorophylle *a* (Chl *a*), (B) chlorophylle *b* (Chl *b*) et (C) caroténoïdes ($Cx+c$) d'*Atriplex halimus* L. après 22 jours de traitement par différentes concentrations du Cd. Chaque valeur représente la moyenne de cinq répétitions ± SE. Pour chaque paramètre, les petites lettres différentes indiquent une différence significative (test de Tukey, $P < 0.05$). 78
- Figure 21 : (A) rendement quantique maximal du PSII (F_v/F_m), (B) rendement quantique du PSII (Φ_{PSII}) et (C) rendement quantique de quenching non-photochimique (Φ_{NPQ}) à midi (◆) et à aube (■) d'*Atriplex halimus* L. après 22 jours de traitement par différentes concentrations du Cd. Chaque valeur représente la moyenne de cinq répétitions ± SE. Pour chaque paramètre, les petites lettres différentes indiquent une différence significative (test de Tukey, $P < 0.05$). 80
- Figure 22 : Pourcentage de la photoinhibition chronique et dynamique d'*Atriplex halimus* L. après 22 jours de traitement par différentes concentrations du Cd. 81
- Figure 23 : la fuite d'électrolytes des feuilles d'*Atriplex halimus* L. après 22 jours de traitement par différentes concentrations du Cd. Chaque valeur représente la moyenne de trois répétitions ± SE. Pour chaque paramètre, les petites lettres différentes indiquent une différence significative (test de Tukey, $P < 0.05$). 82

Figure 24 : Les activités de ; (A) la guaiacol peroxidase (GPx), (B) la catalase (CAT) et (C) la superoxide dismutase (SOD) dans les feuilles d'*Atriplex halimus* L. après 22 jours de traitement par différentes concentrations du Cd. Chaque valeur représente la moyenne de (3-5) répétitions \pm SE. Pour chaque paramètre, les petites lettres différentes indiquent une différence significative (test de Tukey, $P < 0.05$). 83

Figure 25 : la teneur en protéines totale ($\mu\text{g}/\text{ml}$) dans les feuilles d'*Atriplex halimus* L. après 22 jours de traitement par différentes concentrations du Cd. Chaque valeur représente la moyenne de trois répétitions \pm SE. Pour chaque paramètre, les petites lettres différentes indiquent une différence significative (test de Tukey, $P < 0.05$). 84

Figure 26 : Concentration du (A) cadmium, (B) phosphore, (C) manganèse, (D) potassium, (E) fer et (F) magnésium dans les pousses (\blacklozenge) et les racines (\blacksquare) d'*Atriplex halimus* L. après 22 jours de traitement par différentes concentrations du Cd. Chaque valeur représente la moyenne de trois répétitions \pm SE. Pour chaque paramètre, les petites lettres différentes indiquent une différence significative (test de Tukey, $P < 0.05$). 87

Figure 27 : Concentration du calcium (Ca) et du Molybdène (Mo) dans les pousses (\blacklozenge) et les racines (\blacksquare) d'*Atriplex halimus* L. après 22 jours de traitement par différentes concentrations du Cd. Chaque valeur représente la moyenne de trois répétitions \pm SE. Pour chaque paramètre, les petites lettres différentes indiquent une différence significative (test de Tukey, $P < 0.05$). 89

Figure 28 : Concentration du sodium (Na) et de l'azote total (N) dans les pousses (\blacklozenge) et les racines (\blacksquare) d'*Atriplex halimus* L. après 22 jours de traitement par différentes concentrations du Cd. Chaque valeur représente la moyenne de trois répétitions \pm SE. Pour chaque paramètre, les petites lettres différentes indiquent une différence significative (test de Tukey, $P < 0.05$). 90

Liste des tableaux

Tableau 1 : pourcentage de la germination finale après 7 jours, T0 et T50 d' <i>Atriplex halimus L</i> soumis sous différentes concentrations de Zn, Cu et Cd.	46
Tableau 2 : Effet du Zn, Cu et Cd sur le poids frais des plantules d' <i>Atriplex halimus L</i>	48
Tableau 3 : Composition de la solution nutritive de Hoagland (Hoagland and Arnon, 1950)	57
Tableau 4 : Effet du Cd sur le facteur de translocation, facteur de bioaccumulation et la quantité d'extraction des métaux (MU) d' <i>A. halimus L.</i> après 22 jours de traitement par différentes concentrations du Cd. Chaque valeur représente la moyenne de trois répétitions \pm SE. Pour chaque paramètre, les petites lettres différentes dans la même ligne indiquent une différence significative (test de Tukey, $P < 0.05$).	86
Tableau 5 : Effet du Cd sur le facteur de translocation des éléments minéraux d' <i>A. halimus L.</i> après 22 jours de traitement par différentes concentrations du Cd. Chaque valeur représente la moyenne de trois répétitions \pm SE. Pour chaque paramètre, les lettres minuscules indiquent les groupes homogènes (test de Tukey, $P < 0.05$).	86
Tableau 6: Coefficients de corrélation (Pearson) entre Cd et les éléments minéraux dans <i>A. halimus L.</i> après 22 jours de traitement par différentes concentrations du Cd.	88

Introduction générale

Depuis quelques décennies, l'accroissement des activités humaines s'est accompagné de la dispersion dans l'environnement de quantités considérables de polluants comme les métaux lourds. L'accumulation des métaux lourds dans les écosystèmes a conduit, au fil des années, à la détérioration de la qualité de l'environnement, au déclin des forêts et à la diminution de la productivité agricole (Chappelka et Samuelson, 1998; Wahid, 2006). De ce fait, la pollution des écosystèmes par les métaux lourds a pris un grand intérêt sur les plans environnemental et scientifique. Les activités humaines constituent la source principale de pollution des écosystèmes par les métaux lourds. Les industries (métallurgiques et minières par exemple) et le transport urbain ont été à l'origine de la pollution de la biosphère par les métaux (comme le cadmium, le cuivre et le zinc). À la différence des polluants organiques, les métaux ne sont pas biodégradables; ils sont uniquement transformés d'un état d'oxydation à un autre ou ils forment des complexes avec les matières organiques (Wade et al., 1993).

L'évaluation des risques liés à la pollution par les métaux lourds nécessite de disposer d'outils biologiques permettant d'apprécier l'impact des polluants sur les êtres vivants. En effet, si la typologie de la pollution par les métaux lourds est globalement bien définie par les analyses physico-chimiques, les questions récurrentes posées lors des évaluations de risque concernent la biodisponibilité des polluants du sol, leurs interactions possibles, et les effets potentiels de la pollution non caractérisée.

La toxicité des métaux lourds est intimement liée à leurs propriétés oxydo-réductrices et à la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), tels que l'anion superoxyde ou le radical hydroxyle, qui possèdent un électron non apparié. Au niveau cellulaire, les principales cibles des ROS sont l'ADN, les phospholipides membranaires et les acides aminés (Remon, 2006). L'activité de l'appareil photosynthétique représente également une cible importante pour les contaminants métalliques parce que l'inhibition des processus biochimiques et biophysiques de la photosynthèse affectent en entier la physiologie des plantes.

Les plantes possèdent des systèmes de stockage ou de détoxification qui leur permettent de diminuer les effets néfastes des métaux lourds. Selon les espèces, ces systèmes sont plus ou moins développés, mais, il semble à l'heure actuelle que trois

mécanismes sont prépondérants: la modification de la perméabilité membranaire, qui permet de réduire l'entrée des métaux dans la cellule, le système antioxydant, qui limite les dégâts des ROS et la chélation intracellulaire, qui empêche l'activité de l'ion métallique (Remon, 2006).

La compréhension des mécanismes de toxicités et de tolérance des plantes exposés au stress métallique peut constituer un apport majeur à la compréhension et le développement des marqueurs biologiques ou biomarqueurs. Selon Weeks (1995), un biomarqueur est une réponse biologique à un produit chimique (comme les métaux lourds) qui induit un stress et peut donner une estimation de l'exposition ou une mesure des effets toxiques potentiels. Le biomarqueur peut aussi être défini comme tout changement observable et/ou mesurable au niveau moléculaire, biochimique, cytologique, physiologique, biologique ou comportemental qui révèle l'exposition présente ou passée d'un organisme à au moins une substance chimique à caractère polluant (Lagadic et Caquet, 1996).

Atriplex halimus L (*Amaranthaceae*) est un arbuste xérohalophyte, très abondant dans les steppes salines d'Algérie. Elle résiste bien aux conditions environnementales extrêmes des régions arides et semi-arides comme la salinité et la sécheresse (Bajji et al., 1998b; Le Houerou, 2000). 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 concentrations élevées de cadmium, de zinc et de cuivre (Lefèvre et al., 2009; Lotmani et Mesnoua, 2011; Lotmani et al., 2011; Mateos-Naranjo et al., 2013; Nedjimi et Daoud, 2009). Cependant, les mécanismes de toxicité des métaux lourds et les caractéristiques de tolérance d'*A. halimus* ne sont pas encore claires.

Au cours de ce travail de thèse, nous avons choisi tout d'abord d'étudier les effets de Cd, de Zn et de Cu sur la germination et la croissance des plantules d'*Atriplex halimus* L. Après avoir déterminé le métal le plus toxique, qui est le Cd, nous avons ensuite ; (1) Déterminé l'effet de ce métal sur la réponse du système photochimique d'*A. halimus*, en particulier la fluorescence chlorophyllienne et les échanges gazeux comme biomarqueurs susceptibles aux changements dans les processus photochimiques au sein du PSII étroitement liés à la photosynthèse et influencés par la présence du Cd (2) Analyser les marqueurs de stress (teneur en pigments photosynthétiques, la fuite d'électrolytes et les activités des enzymes antioxydantes qui sont des marqueurs indirects

du stress oxydatif) (3) Examiner l'absorption du Cd et sa translocation vers les parties aériennes, ainsi son effet sur l'alimentation et la translocation des ions minéraux.

Trois chapitres composent ce mémoire.

Le premier chapitre présente une synthèse bibliographique, et il est composé de quatre parties ; dans la première partie on discute l'interaction entre les métaux lourds et les plantes, dans la deuxième partie on parle sur le stress oxydant et les biomarqueurs. L'interaction des métaux lourds avec l'appareil photosynthétique est discutée dans la troisième partie. Alors que, le matériel végétal utilisé est présenté dans la quatrième partie.

Le deuxième chapitre représente la première étude intitulée ; Effet de quelques métaux lourds sur la germination et la croissance des plantules d'*Atriplex halimus* L.

Le troisième chapitre présente la deuxième étude intitulée ; caractéristique d'accumulation et de tolérance du cadmium chez *Atriplex halimus* L.

Chapitre I :

Synthèse Bibliographique

Chapitre I : Synthèse Bibliographique

I : Interaction entre les métaux lourds et les plantes

I.1. Généralité sur les métaux lourds

Les métaux lourds sont généralement définis comme des éléments traces métalliques ETM. Cependant, la classification en métaux lourds est souvent discutée car certains métaux toxiques ne sont pas particulièrement « lourds » (par exemple le zinc), tandis que certains éléments toxiques ne sont pas des métaux (c'est le cas de l'arsenic qui est un métalloïde). Ce terme générique désigne donc indistinctement des métaux et métalloïdes réputés toxiques. Pour ces différentes raisons, l'appellation « éléments traces métalliques » (ETM) ou par extension « éléments traces » est préférable à celle de métaux lourds (Burnol et al., 2006).

Tous les ETM sont potentiellement toxiques pour les végétaux en fonction de leur concentration dans un milieu et de leur caractère essentiel ou non pour la plante. Ainsi, si un manque en oligoélément entraîne une déficience plus ou moins sévère pour les végétaux, un excès de cet élément engendrera un phénomène de toxicité (Lotmani et Mesnoua, 2011).

Les éléments traces sélectionnés pour ce travail sont parmi les polluants métalliques les plus fréquemment rencontrés dans les sols : le zinc et le cuivre, oligoéléments essentiels au développement des végétaux mais qui s'avère toxique à des fortes concentrations, le cadmium pour sa phytodisponibilité et sa toxicité élevée.

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

I.2. Origine et phytodisponibilité ETM étudiés :

I.2.1. Origine

L'origine des ETM dans les sols peut être naturelle, provenant de l'altération de la roche mère (Muschitz, 2009). Cependant, la majorité des ETM retrouvés dans l'environnement est d'origine anthropique. Ces deux derniers siècles, les activités

humaines ont largement contribué à l'enrichissement des sols en ETM. Les principales sources de contamination des sols sont l'épandage agricole, le trafic routier et surtout les activités industrielles (Muschitz, 2009).

I.2.2. Phytodisponibilité

La phytodisponibilité d'un ETM peut être définie comme son aptitude à passer dans un compartiment du sol ou substrat dans lequel il sera directement assimilable par une plante. Elle résulte d'un ensemble de processus successifs qui contribuent au transfert de l'élément de la phase solide du sol à la solution du sol puis aux tissus de la plante (Tremel-Schaub et Feix, 2005). Le prélèvement des ETM par la plante (les racines) est donc sous l'influence de facteurs liés au sol, à la faune du sol, à la plante, et aux interactions entre les éléments eux-mêmes.

Parmi les facteurs liés au sol, le pH, la capacité d'échange cationique (CEC) et le taux de matière organique sont les plus importants (Tremel-Schaub et Feix, 2005). Un pH faible augmente généralement la phytodisponibilité des ETM car les protons (ions H^+) ont une plus grande affinité pour les charges négatives des colloïdes du sol et entrent alors en compétition avec les ETM vis-à-vis de ces sites, ce qui induit un relargage des ETM dans l'eau des pores du sol (Muschitz, 2009).

Un taux élevé de matière organique dans les sols favorise l'immobilisation des éléments traces par leur complexation avec les acides humiques ou fulviques, par exemple. La CEC du sol est un paramètre global qui représente la quantité maximale de cations qu'un poids déterminé de sol peut retenir, autrement dit, le total des charges négatives du sol disponibles pour la fixation de cations métalliques ou d'ions H^+ . Les cations dissous dans la solution du sol sont attirés par des composants chargés négativement (principalement les argiles, les oxydes de métaux et la matière organique) qui sont les contributeurs les plus importants à la CEC du sol (Bargagli, 1998). Plus la CEC du sol est élevée, plus les cations métalliques sont adsorbés ou complexés par ses constituants et donc moins assimilables par les plantes.

Certaines plantes sont capables de modifier la composition physico-chimique et microbienne du sol de la rhizosphère (zone définie comme proche de la racine et en interaction avec elle) en absorbant des nutriments ou en excréant certains produits. Cependant, la capacité des plantes à émettre des exsudats racinaires dépend des espèces (Muschitz, 2009).

Les racines peuvent ainsi libérer des acides organiques ou aminés, des mucilages, des cellules mortes, de l'O₂ et du CO₂ dans leur entourage, ce qui a pour effet de changer les propriétés du sol comme une diminution de son pH, par exemple, qui permet alors d'accroître la biodisponibilité des ETM du sol et donc leur prélèvement par la plante (Bargagli, 1998).

Le zinc a une masse atomique de 65,409 g.mol⁻¹. Dans les sols, il est exclusivement présent sous l'état d'oxydation (II) (ZnSO₄, ZnHCO₃⁺, ZnCO₃) (Tremel-Schaub et Feix, 2005) et dans la solution du sol sous la forme Zn²⁺ ou plus souvent sous la forme de complexes solubles ou insolubles avec les matières organiques (Barber, 1995). La proportion de Zn complexé dans la solution de sol augmente avec le pH ; ainsi, la concentration en solution de zinc (Zn échangeable) augmente fortement pour des pH < 6 (Tremel-Schaub et Feix, 2005). Un chaulage, un apport d'argile, de fer ou de phosphore diminuent le transfert du zinc vers les plantes. Dans le sol, en présence de fortes concentrations en sulfates (SO₄²⁻), il y a formation de ZnSO₄ soluble. Par contre, le P forme avec le Zn du Zn₃(PO₄)₂ solide dans le sol et diminue donc sa phytodisponibilité. De plus, le P perturbe l'assimilabilité physiologique de zinc dans les tissus végétaux (Muschitz, 2009).

Le cuivre, de masse molaire 63,5 g.mol⁻¹. Dans les sols il est sous forme (II) (Cu²⁺, CuCO₃), la fraction mobile ou aisément mobilisable du cuivre est souvent très faible, bien inférieure à celle du cadmium (Tremel-Schaub et Feix, 2005). La biodisponibilité du Cu dépend étroitement des propriétés physicochimiques (pH), de la granulométrie et de la composition des sols. Un pH acide favorise sa mobilité et sa biodisponibilité (Ross, 1994). De plus, l'absorption est d'autant plus importante que la CEC du sol diminue. La biodisponibilité des ions Cu²⁺ est limitée par sa fixation sur les acides humiques et sa complexation avec les oxydes de fer et de manganèse (Tremel-Schaub et Feix, 2005). La présence de calcium dans les sols freinerait également l'absorption des ions de cuivre par les végétaux (Ross, 1994).

Le cadmium, de masse atomique 112,411 g.mol⁻¹ se trouve dans la nature sous la forme oxydée (+II) de manière stable (Cd²⁺, CdSO₄, CdS, CdCl₂, CdCO₃, CdHCO₃⁺ ou Cd(PO₄)₂) (Ross, 1994). Le cadmium peut être retenu par la matière organique et les hydroxydes de fer. Sa mobilité dans les sols, essentiellement pH dépendante, est supérieure à celle du zinc, bien que limitée par son affinité vis-à-vis de la matière organique (Muschitz, 2009). Sa concentration dans la solution du sol augmente

fortement pour des $\text{pH} < 6$. Il est alors sous forme Cd^{2+} ou de chélats d'acides fulviques (Ross, 1994). Le chaulage, un apport de Cu ou de Zn peuvent diminuer le transfert du Cd vers les plantes (Tremel-Schaub et Feix, 2005).

I.3 Absorption, transport, accumulation et excrétion des ETM par les plantes

Les plantes sont exposées de deux façons aux ETM : par les parties aériennes (à partir de particules en suspension dans l'air ou de composés dissous dans l'eau de pluie ou d'arrosage) et par les racines (Muschitz, 2009) .

I.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 (Tremel-Schaub et Feix, 2005). 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).

I.3. 2. Absorption racinaire

Les ETM en solution sont transférés vers la rhizosphère par deux processus, simple diffusion et/ou le flux de masse. La diffusion est la voie principale d'absorption des métaux au travers de l'apoplaste du cortex racinaire et de l'endoderme (voie apoplastique) (**Figure 1**). Cependant, ce transport s'exerce sur de petites distances (0,1-

15 mm) (Tremel-Schaub et Feix, 2005). Cependant, les charges négatives de surface comme les acides polygalacturoniques des pectines peuvent agir comme des échangeurs d'ions, et adsorber une partie des ETM (Muschitz, 2009). Au niveau de l'endoderme (voie symplastique) (**figure 1**), le transport des ETM vers les autres organes de la plante peut devenir actif pour qu'ils soient ensuite dirigés vers les vaisseaux conducteurs de sève brute (xylème) puis distribués dans les différentes parties aériennes de la plante (Muschitz, 2009). Ce type de transport est encore mal connu, et certains auteurs considèrent l'existence intervention de canaux ou transporteurs membranaires facilitant le transport passive ou active des ETM (Remon, 2006). A l'intérieur de l'endoderme les ETM se déplacent de cellules en cellules par l'intermédiaire des plasmodesmes (Muschitz, 2009).

I.3. 3. Translocation

Après leur absorption, le transport des éléments dans le xylème de la plante vers les parties aériennes, est appelé « translocation ». Le tissu conducteur du xylème représente le principal moyen de transport des racines vers les parties aériennes pour les ions minéraux (Tremel-Schaub et Feix, 2005). Dans les vaisseaux du xylème, 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 (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).

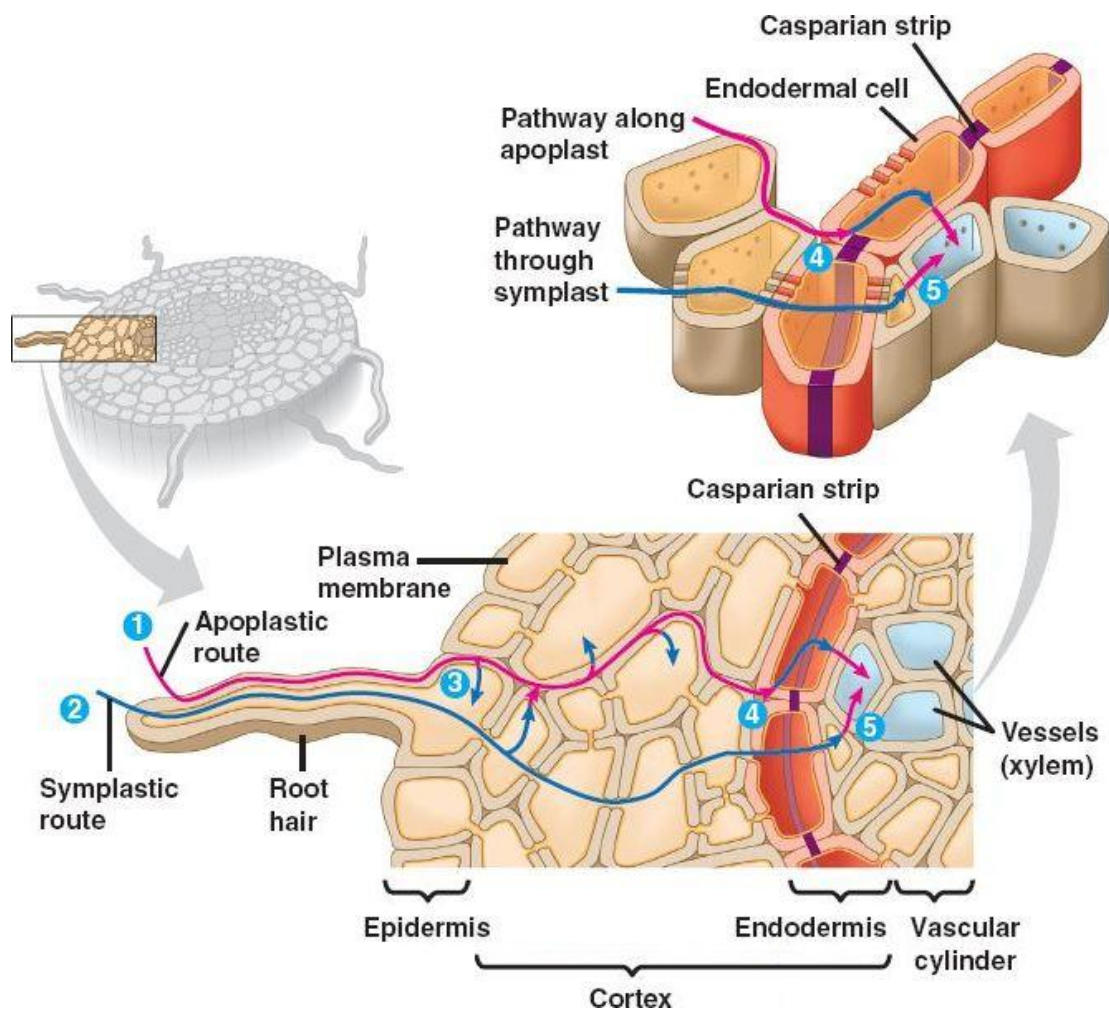


Figure 1 : Transport latéral dans les racines. (1) Les poils absorbants absorbent l'eau et les sels minéraux, qui se déplacent le long des parois (**voie apoplasmique**). (2) Les minéraux et l'eau qui traversent les membranes plasmiques des poils absorbants entrent dans le cytosol (**voie symplasmique**). (3) Le long de la voie apoplasmique un peu d'eau et de minéraux sont transportées dans le cytosol des cellules, puis se déplacent via la voie symplasmique. (4) La bande Casparian, une bande d'une matière cireuse, ne permet que des minéraux dans le symplaste de passer dans le cylindre vasculaire à travers la membrane plasmique des cellules endodermiques. (5) Les cellules dans les vaisseaux vasculaires transportent l'eau et les minéraux à travers la plante.

Source : http://bio1903.nicerweb.com/Locked/media/ch36/root_transport.html

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) 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).

I.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 en (2005) ont rapporté que les plantes herbacées dicotylédones 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).

I.3. 5. Les excréctions des ETM 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 et 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 et Hagemeyer, 1999). Les métaux sous forme gazeuse comme le mercure peuvent également fuir à travers les stomates des feuilles dans l'air, lorsque celles-ci sont ouvertes (Prasad et Hagemeyer, 1999).

I.4. Toxicité des ETM et stratégies de tolérance des plantes

I.4. 1. Les principaux effets des ETM sur les plantes

I.4. 1. 1. Effet des ETM sur la germination

La germination et les plantules sont les stades physiologiques le plus sensible d'une plante et ils sont régulés par plusieurs interactions hormonales et facteurs environnementaux. De plus, ces stades sont plus sensibles à la pollution métallique en raison du manque de certains mécanismes de défense (Liu et al., 2012). Il est bien documenté que les processus de germination est fortement perturbé par le stress de métal, cependant, il n'y a pas beaucoup d'explications sur le mécanisme moléculaire de l'inhibition de la germination des semences causée par le stress métallique (Ahsan et al., 2007).

I.4. 1. 2. Effet des ETM sur la croissance et la nutrition minérale

L'effet toxique des ETM sur la croissance de la plante se manifeste par une réduction de la croissance des parties aériennes et des racines affectant ainsi dramatiquement la production de la biomasse (Zorrig, 2011). Ces effets s'accompagnent très souvent de nombreux autres indices de dysfonctionnement tel que la perturbation de l'équilibre de certaines hormones de croissance, notamment l'auxine, la perturbation de l'alimentation en éléments minéraux essentiels pour la croissance des plantes (Wang et al., 2009; Xu et al., 2012), ainsi qu'à des perturbations de la machinerie photosynthétique, notamment la structure des chloroplastes et la biosynthèse de la chlorophylle (He et al., 2008; Ran et al., 2014).

Il est toutefois important de noter que les ETM n'affectent pas la croissance de toutes les plantes avec la même sévérité. En effet, certaines plantes dites hyperaccumulatrices comme *Arabidopsis halleri* et *Thlaspi caerulescens* sont capables de croître, se développer, et se reproduire à la présence des concentrations élevées de ETM (Zorrig, 2011)

Les effets néfastes des ETM pourraient aussi être liés à une altération de l'absorption et de la distribution des éléments minéraux indispensables pour le fonctionnement de la plante (Zorrig, 2011). Ceci peut être lié à la diminution de la transpiration et, en conséquence, limitation de l'absorption racinaire de la solution de

sol. Des perturbations de la nutrition potassique en présence de cadmium ont été rapportées dans plusieurs études (Küpper et Kochian, 2010; Redondo-Gómez et al., 2010). Une perturbation dans la nutrition en Ca, Fe et Zn sous le stress du cadmium a été aussi observée chez *Brassica juncea* (Jiang et al., 2004).

I.4. 1. 3. Effet des ETM sur la photosynthèse

La photosynthèse est le processus bioénergétique qui permet aux plantes et à certaines bactéries de synthétiser de la matière organique en exploitant la lumière du soleil. La photosynthèse est un processus complexe faisant intervenir de nombreuses étapes qui sont affectées de manière différente par les facteurs de l'environnement comme la pollution par les ETM.

En raison de l'importance du sujet et pour mieux comprendre l'effet des ETM sur la photosynthèse, un chapitre détaillé a été consacré sur la photosynthèse et la fluorescence chlorophyllienne

I.4. 1. 4. Les ETM induisent la surproduction des espèces réactives de l'oxygène (ROS)

Lors du métabolisme aérobie des plantes, la réduction de l'oxygène par les cytochromes de la chaîne respiratoire s'accompagne inévitablement d'une production des molécules intermédiaires radicalaires, très réactifs connus sous le nom espèces réactives de l'oxygène (ROS). Les espèces réactives de l'oxygène sont de puissants agents oxydants capables d'altérer toute une série de cibles biologiques importantes, avec comme conséquence la modification des domaines fonctionnels des biomolécules : inhibition de l'activité enzymatique, perturbation du métabolisme (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 (Muschitz, 2009). A l'état normal les cellules des plantes possèdent un système antioxydant capable d'annuler l'effet des ROS. Cependant, à des concentrations élevées des ETM, le taux des ROS augment et dépasse les capacités du système antioxydant.

Le rôle direct des ETM dans la formation des ROS peut être relié à leur capacité à exister sous différents états d'oxydation. En effet, certains cations (comme le fer, le cuivre, le manganèse ou le plomb) sont capables de céder un ou plusieurs électrons

susceptibles de réduire l'oxygène et ses dérivés (Remon, 2006). Cependant, les métaux qui n'existent que sous un seul état d'oxydation, comme le cadmium et le zinc peuvent induire une accumulation de ROS en perturbant certaines voies métaboliques ou en inactivant des enzymes du système anti-oxydant, contribuant ainsi à l'épuisement de la réserve cellulaire de molécules anti-oxydantes (Muschitz, 2009).

I.4.2. Stratégies et mécanismes de tolérance des plantes

Les plantes possèdent des systèmes de stockage ou de détoxification qui leurs permettent de diminuer les effets néfastes des ETM. Selon les espèces, ces systèmes sont plus ou moins développés, mais, il semble à l'heure actuelle que trois mécanismes sont prépondérants: la modification de la perméabilité membranaire, qui permet de réduire l'entrée des métaux dans la cellule, le système antioxydant, qui limite les dégâts des espèces réactives de l'oxygène et la chélation intracellulaire, qui empêche l'activité de l'ion métallique (Remon, 2006). Il a été observé chez *Atriplex halimus* soumis à un stress métallique une augmentation sensible des peroxydases et de catalase, enzymes faisant partie du système antioxydant (Lotmani et Menoua 2011).

I.4.2.1. La paroi cellulaire et la membrane plasmique

La paroi cellulaire est une véritable structure dynamique capable d'agir efficacement pour la défense des organismes végétaux face aux agressions extérieures (Freshour et al., 1996). La paroi cellulaire contient diverses molécules comme des protéines, des pectines et des celluloses possèdent des groupements hydroxyles, carboxyles, amines, aldéhydes, phosphates, thiols, ... qui peuvent jouer un rôle de ligand assurent une complexation et donc la détoxification de nombreux ETM. Il a été démontré qu'une production accrue de biomasse pariétale avec une modification de la composition de la fraction pariétale cellulaire des cellules de la tomate soumis aux concentrations croissantes du zinc (Muschitz, 2009). Les différents groupements chimiques de la paroi peuvent, en effet, participer à différentes réactions incluant les échanges ioniques, l'adsorption, la complexation, la précipitation ou la cristallisation, permettant ainsi la séquestration des ETM dans la paroi lors d'un stress métallique (Mullen et al., 1992).

La membrane plasmique peut aussi 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 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).

I.4.2.2. Système anti-oxydant

Le système antioxydant joue un rôle primordial dans la neutralisation des espèces réactives de l'oxygène issues du stress des ETM. 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. Dans le deuxième chapitre on va parler en détail sur ce sujet.

I.4.2.3. La chélation et la compartimentation cellulaire

I.4.2.3.1. La chélation des ETM

Une stratégie pour que les cellules neutralisent les ions non-essentiels et l'excès des ions essentiels, est la synthèse de ligands organiques intracellulaire, qui assurent la complexation et donc la détoxication de nombreux ions métalliques. Chez les plantes, il existe plusieurs types de ligands : acides organiques, acides aminées et polypeptides (Remon, 2006).

Les acides organiques représentent un groupe de chélateurs naturels comme les acides dicarboxyliques (acides fumarique, malique, oxalique) ou des acides tricarboxyliques (acide citrique). Toutes ces petites molécules sont capables d'établir des liaisons stables avec les ETM. 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. La synthèse de la malate a été également observée chez *Festuca rubra* sous stress du Cu et Zn (Ramírez-Rodríguez et al., 2007).

Les acides aminés libres, comme la proline, l'histidine et la cystéine, s'accumulent lors d'un stress métallique et pourraient aussi être impliqués dans la

chélation de divers métaux lourds, notamment du zinc et du nickel (Briat et Lebrun, 1999).

Les phytochélatines (PC) sont de petits polypeptides intracellulaires possédant la séquence d'acides aminés (γ -Glu-Cys) $_n$ -Gly, où $n = 2-11$, et une très grande affinité pour les métaux grâce à leurs fonctions thiol (SH) et carboxyle (COOH) (Remon, 2006). Ils sont produits par les plantes, les champignons et les algues à partir du glutathion (GSH) (**figure 02**), thiol prédominant dans les cellules de tout organisme, en réponse à une augmentation de la concentration en métaux dans leur environnement. Des études précédentes ont indiqué que les ions métalliques Cu^{2+} , Hg^{2+} , CH_3Hg^+ , Pb^{2+} et Zn^{2+} , tous inducteurs de la synthèse de phytochélatines (Patra et al., 2000)

Les métallothionéines (MTs) jouent également un rôle essentiel dans la complexation des métaux comme Cd(II), Zn(II), Cu(I). Ce sont des petites protéines, de faible masse moléculaire (4 à 8 kDa), riches en cystéines (environ 30 %). Cependant, à la différence des phytochélatines, 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 (Pourrut, 2008; Remon, 2006).

I.4.2.3.2. La compartimentation des ETM

Les plantes peuvent opérer une détoxification cytosolique par rapport au Zn, au Cd et au Pb, en les transportant dans certains compartiments de la cellule telle que les vacuoles, où ils ne peuvent plus interférer avec les processus métaboliques essentiels (Prasad et Hagemeyer, 1999). Les molécules solubles dans le cytoplasme telles que des acides organiques ou des polypeptides riches en S (comme les phytochélatines) forment des complexes avec les métaux et peuvent également fonctionner comme des «navettes» (transporteurs) pour faciliter le transport des métaux au travers le tonoplaste jusqu'à la

vacuole (Tremel-Schaub et Feix, 2005). Par exemple, les phytochélatines forment, avec le cadmium, des complexes, qui s'agrègent les uns aux autres par des ponts sulfures pour former des complexes de masse moléculaire élevée (Figure 2). Ces derniers 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 (Sanità Di Toppi et Gabbrielli, 1999).

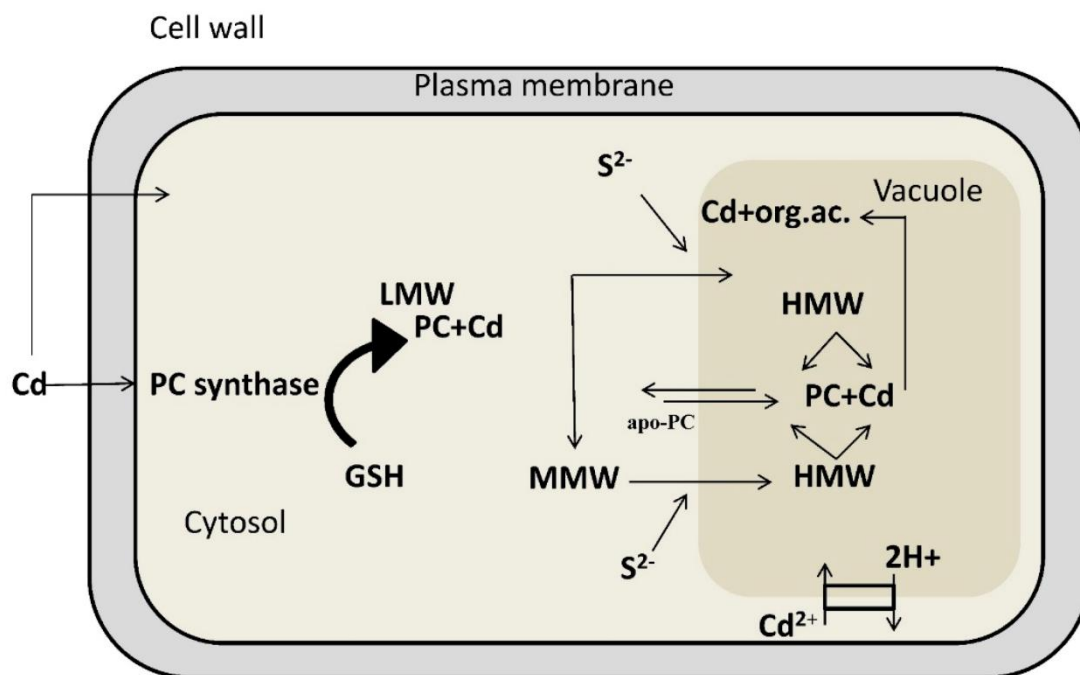


Figure 2 . Diagramme illustrant les mécanismes impliqués dans la chélation et la compartimentation du cadmium dans la vacuole. Les PCs sont synthétisés à partir de la glutathion par la PC-synthase. L'exposition au cadmium stimule la synthèse des phytochélatines, qui forment rapidement avec le cadmium des complexes à "masse moléculaire faible" (LMW) puis complexes à "masse moléculaire moyenne" (MMW). Au niveau de tonoplaste, ces complexes acquièrent le soufre (S^{2-}) et forment des complexes à "masse moléculaire élevée" (HMW) ayant une plus grande affinité envers des ions de cadmium. Ainsi, en particulier le complexe HMW semble être décisif dans la détoxification du cadmium. org. ac., acides organiques (Manske et Hilbi, 2014).

I.4.4. Autre mécanismes

D'autres mécanismes peuvent intervenir suite à un stress métallique, comme par exemple la production de protéines de stress telles les protéines HSP (Heat Shock

Proteins). Néanmoins ceci n'est pas spécifique aux stress métalliques, car des stress variés, ayant en commun de dénaturer les protéines (stress protéotoxique), sont capables d'induire cette réponse de type « choc thermique » (Remon, 2006).

I.5. Classification des plantes selon leur interaction avec les ETM

Face au stress déclenché par une biodisponibilité excessive en ETM, les plantes peuvent suivre deux mécanismes de résistance de nature différente mais non exclusifs (Prasad, 2004; Remon, 2006). Certaines plantes sont programmées pour l'évitement : capacité d'un organisme à éviter une absorption importante des ETM. D'autres sont adaptées à la tolérance, ce qui correspond à : « la capacité d'une plante à survivre et à se reproduire sur des sites toxiques ou hostiles, pour la plupart des autres plantes, parce que le sol contient des quantités élevées d'un ou plusieurs métaux » (Memon et al., 2001; Vanobberghen, 2011).

En fonction du facteur de transfert sol-plante des éléments traces métalliques, les plantes peuvent être classées en trois groupes : les excluantes, les indicatrices et les accumulatrices ou hyperaccumulatrices (**Figure 3**) (Baker et al., 1990; Memon et al., 2001).

Les excluantes (rejectors) : ces plantes sont capables de maintenir la concentration des métaux dans leurs parties aériennes à un niveau faible jusqu'à ce qu'une concentration critique dans le sol soit atteinte. Au-delà de cette concentration critique, le métal est massivement transporté dans les parties aériennes de la plante et provoque des dégâts liés à sa toxicité (Memon et al., 2001; Vanobberghen, 2011).

Les indicatrices (indicators) : ces plantes accumulent les ETM dans les tissus de leurs parties aériennes, et les concentrations internes reflètent exactement les concentrations externes (milieu) (Memon et al., 2001; Vanobberghen, 2011).

Les accumulatrices (accumulators) : ces plantes sont capables d'accumuler des concentrations élevées des ETM dans leurs tissus aériennes, dépassant les concentrations du sol et les espèces non accumulatrices croissantes à proximité. Ces plantes sont largement utilisés dans la phytoremédiation (Memon et al., 2001; Vanobberghen, 2011). Selon la concentration des ETM dans les parties aériennes, Brooks et al. (1979) ont classé les plantes en tant que des accumulatrices ou hyperaccumulatrices. Ce dernier groupe est caractérisé par une concentration de métal défini arbitrairement par kg de

feuilles sèches: pour Cd > 100 mg, pour Co, Cu et Ni > 5000 mg et pour Mn et Zn > 10000 mg (Brooks, 1998). Cependant, le mécanisme qui permet à ces végétaux de stocker les ETM dans leurs parties aériennes reste encore à élucider.

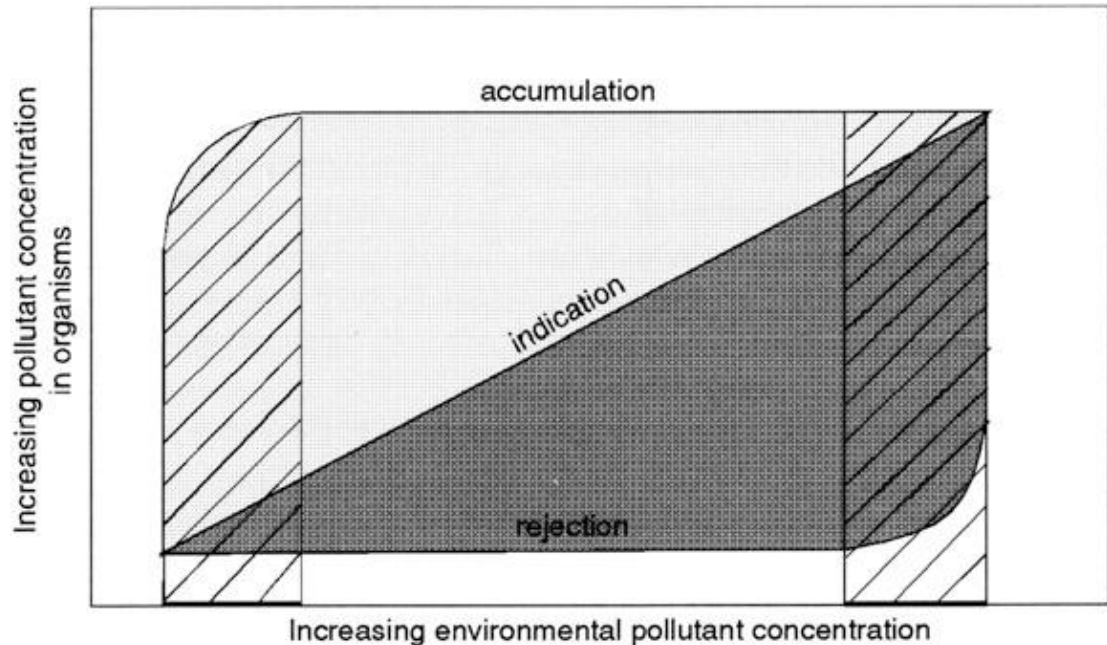


Figure 3 : classification des plantes en fonction de leurs concentrations en éléments traces métalliques. Source (Ernst, 2006)

II. Stress oxydant et notion des biomarqueurs

II. 1. Le stress oxydatif

Le stress oxydatif chez les plantes fait l'objet de très nombreuses revues bibliographiques (Apel et Hirt, 2004; A. Arora et al., 2002; Bartosz, 1997; Bhattacharjee, 2012; Grene, 2002; Inz, 1995; Mittler et al., 2004; Pitzschke et al., 2006; Schützendübel et Polle, 2002; Tripathy et Oelmüller, 2012). Ainsi, le but de ce chapitre n'est pas de faire un point totalement exhaustif sur ce vaste sujet, mais de réaliser un aperçu des différents processus prooxydants et antioxydants se déroulant dans les cellules végétales, permettant de comprendre les mécanismes conduisant à la génération d'un stress oxydatif.

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

- la diminution du niveau des antioxydants et/ou
- l'augmentation de la production des molécules toxiques dérivées de l'oxygène (ROS)

Lorsque la quantité des ROS générée dépasse les capacités antioxydantes de l'organisme, la toxicité des ROS s'exprime par de nombreux aspects, et en particulier par la perturbation de nombreux processus physiologiques comme la photosynthèse (Pourrut, 2008; Sies, 1997). Cette toxicité s'explique par la réactivité des ROS envers les macromolécules biologiques.

II. 1. 1. Les Espèces Réactives de l'Oxygène

Le terme, espèce réactive de l'oxygène (ROS) est souvent associé au radical libre. Un radical libre est une molécule ou un atome ayant un ou plusieurs électrons non appariés, ce qui le rend extrêmement réactif (Halliwell, 2006). L'appellation « espèce réactives de l'oxygène » n'est pas restrictive. Elle inclut les radicaux libres de l'oxygène proprement dit, mais aussi certains dérivés oxygénés réactifs non radicalaire dont la toxicité est importante tel le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), peroxyneutre ($ONOO^-$) (Apel et Hirt, 2004).

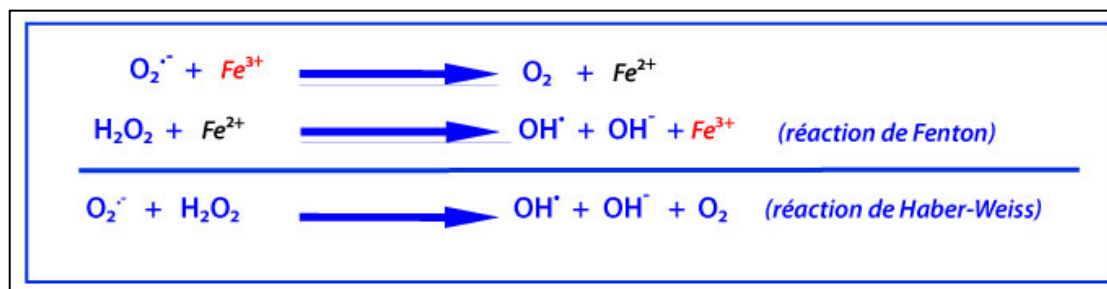
II. 1. 1. 1. Les principales espèces réactives de l'oxygène

Les radicaux superoxydes ($O_2^{\cdot-}$): Ils ont une faible réactivité avec les composés biologiques et ne réagissent ni avec les acides nucléiques et leurs constituants, ni avec les protéines et leurs acides aminés, ni avec les lipides et leurs acides gras. Par contre, ils ont une demi-vie relativement longue (supérieure à quelques dizaines de secondes) ; ils peuvent donc diffuser vers leurs cibles, en particulier les superoxyde dismutases, les ions Fe^{2+} , ou encore la vitamine C. Toutefois, la présence de la charge électrique négative sur cette molécule bloque leur diffusion au travers des membranes biologiques. En fait, ils sont indirectement toxiques en réagissant avec le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le monoxyde d'azote (NO), produisant respectivement des radicaux hydroxyles ($\cdot OH$) et des peroxyneutres ($ONOO^-$). Inversement la dismutation spontanée des anions

superoxydes aboutit à la formation de peroxyde d'hydrogène selon la réaction de Haber-Weiss (Gardès-albert et al., 2003).

Les peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) : est une espèce stable, non radicalaire, mais toxique en raison de son pouvoir oxydant. Sa production peut également résulter de la réduction biélectronique de l'oxygène en présence d'oxydases (aminoacides oxydases, glycolate oxydase, urate oxydase...) qui se trouvent principalement dans des organites cellulaires bien individualisés comme les peroxysomes (Gardès-albert et al., 2003). Dans l'organisme, H₂O₂ peut diffuser à travers les membranes plasmique, mitochondriale, chloroplastique ou peroxysomale favorisant ainsi des perturbations à distance (Pourrut, 2008). Le peroxyde d'hydrogène généré peut suivre la réaction de Haber-Weiss, dans laquelle le fer [Fe(II)] est un donneur d'électrons pour former le radical hydroxyle qui est très nocif.

Le radical hydroxyle (OH[•]) : L'espèce la plus délétère. Il présente une extrême réactivité, une demi-vie limitée (10-10 s dans les systèmes biologiques), diffuse donc peu et est la plus toxique lors d'un stress oxydant. Ils agissent selon trois mécanismes : en arrachant soit un électron soit un atome d'hydrogène ou encore en s'additionnant sur les doubles liaisons. Leur cibles biologiques sont la plupart des molécules organiques et inorganiques des cellules, en particulier, l'ADN, les protéines, les lipides, les acide-aminés, les sucres et les métaux. Le radical OH[•] est produit au sein des cellules, suite soit à la réaction de Haber-Weiss, soit à la réaction de Fenton qui nécessite des catalyseurs métalliques (Gardès-albert et al., 2003)



II. 1. 1. 2. Sources des espèces réactives de l'oxygène

Chez les plantes, il existe de nombreuses sources cellulaires d'ROS, localisées à divers endroits de la cellule. Les trois sources principales sont les chaînes de transport d'électrons (CTE) des chloroplastes et mitochondries, certaines enzymes comme les

peroxydases et oxydases et enfin, les molécules photosensibilisatrices comme la chlorophylle (Pourrut, 2008).

II. 1. 1. 2. 1. Production d'ROS lors des principaux processus métaboliques

Dans les chloroplastes, le processus photosynthétique est à l'origine de la formation directe d' 1O_2 et d' $O_2^{\cdot-}$ et indirecte d' H_2O_2 (par dismutation de l' $O_2^{\cdot-}$) et d' OH^{\cdot} . Il y a encore peu de temps, le photosystème I (PSI) était considéré comme la source principale des ROS chloroplastiques. Dans des conditions physiologiques normales, le flux d'électrons du PSI est dirigé vers le NADP qui est réduit en NADPH par la ferrédoxine NADP réductase. Lors d'un stress (par exemple, une luminosité trop importante), la chaîne d'électrons peut se saturer. Une partie du flux d'électrons peut être alors dérivée par la ferrédoxine vers l'oxygène. Cette réaction est connue sous le nom de réaction de Mehler. En plus de la ferrédoxine, d'autres accepteurs d'électrons du PSI possèdent un potentiel redox suffisamment négatif pour réduire le dioxygène en anion superoxyde (Asada et al., 1974; Mehler, 1951). Dernièrement, le PSII était également détecté comme un site de génération d' $O_2^{\cdot-}$ (Pourrut, 2008).

De la même manière que chez les autres organismes aérobies, les mitochondries constituent une source importante d'ROS chez les plantes, surtout dans les cellules non chlorophylliennes (Pourrut, 2008). Boveris et Chance (1973) ont rapporté que dans les conditions normales, environ 2 % du dioxygène total consommé par la mitochondrie est transformé en ROS.

Les peroxysomes ont longtemps été considérés comme des organites spécialisés dans la détoxification du peroxyde d'hydrogène, en raison de leurs teneurs élevées de catalases (Nyathi et Baker, 2006).

II. 1. 1. 2. 2. Les principales sources enzymatiques

Chez les plantes plusieurs enzymes comme les NADPH-oxydases, les peroxydases extracellulaires, les oxalate-oxydases, les amine-oxydases et les oxydases peroxysomales sont responsables d'une production d'ROS plus ponctuelle que celle induite par les grandes fonctions métaboliques. Cependant, ces générations ponctuelles sont à l'origine de « flambées oxydatives » (oxidative burst) pouvant être impliquées dans des processus physiologiques bien spécifiques comme la croissance cellulaire, mais surtout dans la réponse aux stress biotiques et abiotiques (Pourrut, 2008).

II. 1. 2. Les métaux lourds induisent la production 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** qui se produit en présence de fer ferreux et qui conduit à la réduction du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en radical hydroxyl (OH^\bullet) 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 $\cdot OH$, 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** au cours de laquelle le peroxyde d'hydrogène réagit avec un radical superoxyde, comme l'anion superoxyde $O_2^{\bullet -}$, aboutissant, là encore, à la production du radical hydroxyle.

Par ailleurs, même des métaux qui n'existent que sous un seul état d'oxydation, tels que le cadmium et le nickel par exemple, peuvent induire une accumulation de ROS pour trois raisons : une perturbation de certaines voies métaboliques, une inactivation et un « down régulation » des enzymes du système anti-oxydant ou un épuisement du stock de molécules de faible masse moléculaire comme l'ascorbate, le glutathion, la vitamine E ou les caroténoïdes, qui présentent des capacités anti-oxydantes (Sanità Di Toppi et Gabbrielli, 1999).

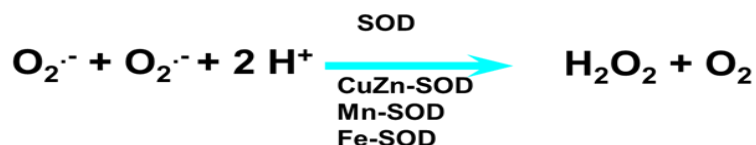
II. 1. 3. Les systèmes antioxydants enzymatiques

En sus des différentes molécules antioxydantes, les cellules végétales possèdent de nombreuses voies de dégradation enzymatique des ROS. Certaines enzymes n'utilisent pas de co-substrat pour réduire les ROS. Alors que, d'autres utilisent plusieurs co-substrats dont certains sont des antioxydants comme (l'ascorbate peroxydase).

II. 1. 3. 1. Les superoxydes dismutases (SOD)

Les superoxyde dismutases (EC 1.15.1.1) sont des métallo-enzymes se retrouvant dans l'ensemble du monde du vivant, mis à part dans quelques microorganismes (Alscher *et al.*, 2002). Il existe trois types de SOD chez les plantes : (FeSOD), (MnSOD)

et (CuZnSOD). Toutes catalysent la dismutation de deux anions superoxydes en dioxygène et peroxyde d'hydrogène (a Arora et al., 2002) :

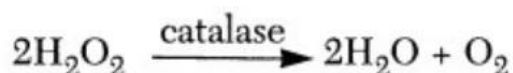


Au niveau cellulaire, les SOD se retrouvent à proximité des sites de production d'O₂^{·-}. Les MnSOD sont localisées principalement dans la matrice de la mitochondrie, dans la matrice des glyoxysomes ou liées à la membrane des peroxysomes des cellules foliaires (Remon, 2006). Les FeSOD se situent essentiellement dans le stroma des chloroplastes et chez quelques espèces particulières, dans les matrices des peroxysomes et des mitochondries, ou dans la fraction cytosolique des racines nodulées. Les CuZnSOD se retrouvent essentiellement sous forme libre

dans le cytosol, dans les peroxysomes ou l'apoplaste. Il existe, toutefois, une CuZnSOD liée à la membrane du thylakoïde au niveau du PSI, directement au contact des anions superoxydes produits par la CTE chloroplastique (Pourrut, 2008).

II. 1. 3. 2. Les catalases (CAT)

Les catalases (EC 1.11.1.6) sont des enzymes majoritairement peroxysomales catalysant la dismutation du peroxyde d'hydrogène (Bartosz, 1997). 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 (Remon, 2006) :



II. 1. 3. 3. Les peroxydases (GPx)

Les peroxydases permettent, comme les catalases, la réduction de H₂O₂ en eau et en oxygène moléculaire. Cependant, à la différence des catalases, les GPx 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 et le glutathion (Wu et al., 2003).

II. 1. 3. 4. Autres enzymes et molécules antioxydantes

A côté des 3 principales enzymes antioxydantes citées ci-dessus, on trouve d'autres enzymes, dont le rôle est moins important, comme les enzymes composant le cycle Asada-Halliwell-Foyer, et conduisant, par des réactions d'oxydoréduction successives, à la réduction de l' H_2O_2 par l'ascorbate peroxydase via l'oxydation d'ascorbate, et la régénération du pool d'ascorbate (Pourrut, 2008).

Les systèmes antioxydantes non enzymatiques sont composés principalement des substances de faibles poids moléculaire montrant des fonctions réductrices ou capables de piéger les radicaux libres, parmi les paramètres, le glutathion sous sa forme réduite est considéré comme le détoxifiant universel (Vasseur et Cossu-Leguille, 2003). Ce tripeptide est un antioxydant très important chez les espèces procaryotes et eucaryotes. Il agit comme un donneur d'électrons qui est directement capable d'inactiver certains types de ROS. Il constitue également le substrat des activités enzymatiques des glutathion peroxydases. Des niveaux cellulaires faibles de GSH rendent généralement la cellule plus sensible au prooxydants. Les vitamines C, E et A sont aussi capables de capter certaines ROS tels que l'anion superoxyde ou le radical hydroxyle dès leurs formation et ainsi éviter les effets du stress oxydant (Souguir, 2009).

II. 2. Stress oxydant et notion des biomarqueurs

Définition des biomarqueurs

Blandin (1986) est le premier à intégrer la notion de biomarqueur dans sa définition du terme de bioindicateur : « Un indicateur biologique (ou bioindicateur) est un organisme ou un ensemble d'organismes qui par référence à des variables biochimiques, cytologiques, physiologiques, éthologiques ou écologiques, permet de façon pratique et sûre de caractériser l'état d'un écosystème ou d'un écosystème et de mettre en évidence aussi précocement que possible leurs modifications, naturelles ou provoquées ». La notion de biomarqueur rentre parfaitement bien dans cette définition puisqu'elle prend en considération les réponses biologiques, biochimiques ou physiologiques d'organismes vivants soumis à un polluant. Le biomarqueur peut donc aller de la simple liaison ligand-récepteur au niveau cellulaire, jusqu'aux effets sur un individu entier. Le NRC (1987) présente une première définition : « variation inductible par les polluants de composants ou de processus, structures ou fonctions cellulaires ou

biochimiques qui peut être mesurée dans un échantillon ou un système biologique ». Ce sont surtout Koeman et al. (1993) qui parlent de biomarqueurs en tant que « modifications d'une réponse biologique pouvant être mise en relation avec une exposition et/ou un effet toxique d'un polluant ». Enfin, selon Cossu et al. (1997), « un biomarqueur est un changement observable et/ou mesurable au niveau moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique ou comportemental, qui révèle l'exposition présente ou passée d'un individu à au moins une substance chimique à caractère polluant ».

En condition de stress, l'activité des systèmes de défense antioxydant peut être soit induite, soit inhiber. Généralement, l'induction est interpréter comme une adaptation des organismes face à une perturbation de leur environnement alors que l'inhibition reflète l'effet toxique de certains polluants et laisse présager des dommages cellulaires (Vasseur et Cossu-Leguille, 2003). La mesure des enzymes antioxydantes peut donner une indication du statut antioxydant dans l'organisme et peut ainsi être utilisé en tant que biomarqueurs du stress oxydant.

L'intérêt des paramètres antioxydants en tant que biomarqueurs réside dans le caractère aspécifique de leur réponse, ce qui peut être un avantage dans le contexte des contaminations multiples des écosystèmes, malgré la grande complexité des mécanismes de réponse mis en jeu (Cossu et al., 1997; Vigano et al., 1998). Ces mécanismes antioxydants demandent donc à être mieux compris pour définir les paramètres les plus discriminants comme biomarqueurs de l'impact des ETM sur les organismes.

III. Interaction des ETM avec l'appareil photosynthétique

La photosynthèse est un processus important pour la production de biomasse et la croissance des plantes. Cependant, la présence des ETM peut influencer ce processus de différentes manières (Li et al., 2015; Piotrowska et al., 2010). Dans ce chapitre, l'impact des ETM a été étudié au niveau de différents paramètres photosynthétiques : les photosystèmes, la fluorescence du PSII et la teneur en pigments chlorophylliens.

III. 1. Photosynthèse

Le processus de la photosynthèse comprend un ensemble de réactions permettant aux plantes d'utiliser l'énergie lumineuse pour la convertir en énergie chimique. Ce

processus s'accompagne d'un dégagement d'oxygène par l'oxydation de l'eau, ce qui permet la réduction du dioxyde de carbone (CO_2) et la synthèse des glucides selon la réaction suivante (Whitmarsh et Govindjee, 1999) :

$6 \text{CO}_2 + 12 \text{H}_2\text{O} + \text{Énergie lumineuse} \rightarrow \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 6\text{O}_2 + 6 \text{H}_2\text{O} + \text{Dissipation d'énergie sous forme de fluorescence et de chaleur}$

Cette réaction globale de la photosynthèse se déroule en deux étapes différentes. La première étape comprend les réactions photochimiques qui induisent un transport d'électrons entre les photosystèmes II et I, ce qui permet la formation de l'ATP et le NADPH. Pendant la deuxième phase, l'ATP et le NADPH sont utilisés, comme source d'énergie, pour l'assimilation et la transformation du CO_2 en glucides au cours du cycle de Calvin, ainsi que pour d'autres processus biochimiques étroitement dépendants de la photosynthèse (Blankenship, 2008). Les deux processus photochimiques et biochimiques de la photosynthèse se déroulent dans le chloroplaste (**Figure 4**).

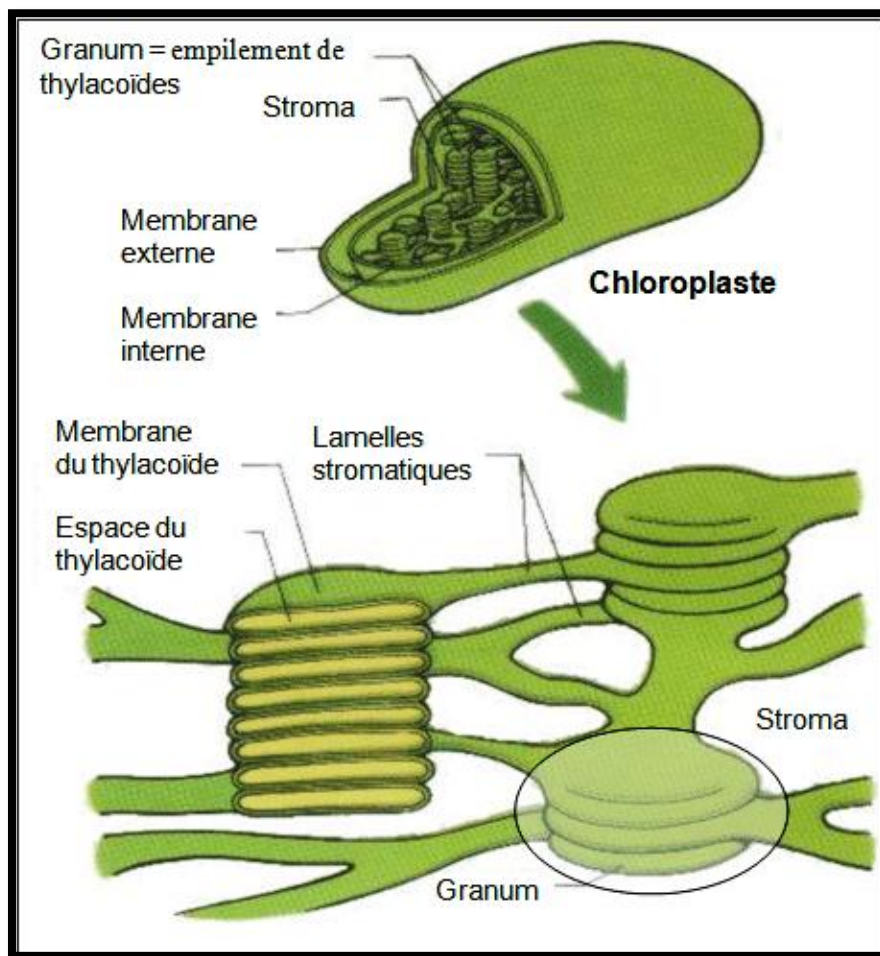


Figure 4. Structure schématique d'un chloroplaste (Buchanan, 2000).

III.1.1. La structure du photosystème II

Pendant la réaction photochimique, le PSII effectue la conversion de l'énergie lumineuse en énergie chimique. Pour réaliser cette fonction, le PSII est constitué de complexes pigments-protéines (contenant environ 200 à 300 molécules de chlorophylles et 50 molécules de caroténoïdes), des complexes métallo-protéiques (une vingtaine de polypeptides, deux quinones QA et QB, un atome de fer, deux molécules de phéophytine, une ou deux molécules de cytochrome b559), d'un cluster de manganèse et des ions de chlorure et de calcium utilisés comme cofacteurs (Barber et al., 1997; Minagawa et Takahashi, 2004). Ces complexes forment des sous-unités fonctionnelles étroitement liées et essentielles pour un fonctionnement optimal du PSII (Szabó et al., 2005). En effet, les antennes collectrices de lumière absorbent l'énergie lumineuse et la transfèrent aux centres réactionnels, où s'effectuent les réactions photochimiques.

III.1.1.1. Les antennes collectrices de lumière du photosystème II

Les antennes collectrices de lumière du PSII sont constituées de deux complexes: l'antenne interne et l'antenne périphérique. L'antenne interne est étroitement associée au centre réactionnel du PSII (**Figure 5**). Elle est constituée de deux protéines, CP43 et CP47 qui sont liées à environ 40 à 50 molécules de Chl *a* et à une dizaine de molécules de β -carotène (Barber et al., 1997). Ces deux complexes permettent le transfert de l'énergie lumineuse vers la chlorophylle du centre réactionnel (P680). La protéine CP47, liée au polypeptide de 33 kDa du complexe de photolyse de l'eau, est impliquée dans la stabilisation du «cluster» de manganèse (Green et Durnford, 1996).

L'antenne périphérique est constituée de complexes pigments-protéines désignés par LHCI (*light harvesting complexes*), CP29, CP26 et CP24. Ces protéines lient la Chl *a* et la Chl *b* ainsi que des molécules de caroténoïdes, comme la lutéine, la néoxanthine, la violaxanthine et la zéaxanthine (Bassi et al., 1997). La composition pigmentaire et la taille des antennes périphériques peuvent varier selon les conditions lumineuses auxquelles les plantes sont exposées (Horton et al., 1996). Le complexe LHCI, au sens strict, constitue

l'antenne majeure du PSII, car il contient entre 50 et 65 % de la quantité totale de la chlorophylle (*a* et *b*) et le tiers du contenu total en protéines des membranes thylacoïdales (Ait Ali, 2008). Le LHCII est composé de trois types de polypeptides désignés par Lhcb1, 2 et 3 dont le poids moléculaire est compris entre 24 et 29 kDa (Green et Durnford, 1996). Les complexes pigments-protéines CP29, CP26 et CP24 contiennent une quantité plus faible de Chl *b* que le LHCII. Ils comprennent aussi 5 à 20 % de la chlorophylle totale liée au PSII (Barber et al., 1997). Ces protéines sont situées à la périphérie du LHCII et permettent le transfert de l'énergie d'excitation du LHCII au centre réactionnel du PSII via les CP43 et CP47 (Bassi et al., 1997). Chez les plantes et les algues vertes, les métaux lourds (comme le cadmium et le chrome hexavalent) peuvent induire une inhibition de la synthèse de la chlorophylle par l'inhibition de l'activité de l'enzyme protochlorophyllide réductase (Myśliwa-Kurziel et Strzałka, 2005). Sous ces conditions, la formation des LHCII et du centre réactionnel du PSII en état fonctionnel peut être altérée, ce qui diminue l'activité photosynthétique et la croissance des plantes (Ait Ali, 2008).

III. 1. 2. 2. Le centre réactionnel du photosystème II

Le centre réactionnel du PSII est constitué de deux protéines majeures D1 et D2 dont le poids moléculaire est de 32 et 34 kDa, respectivement. Les protéines D1 et D2 sont codées par les gènes chloroplastiques *psbA* et *psbD*, respectivement. C'est au niveau de la protéine D1 que s'effectue le processus de la séparation de charges, c'est-à-dire la réaction photochimique initiant le transport des électrons entre le PSII et le PSI (Dekker et Van Grondelle, 2000). Les protéines D1 et D2 assurent aussi la stabilité des pigments et des transporteurs d'électrons situés au niveau du PSII. Le centre réactionnel contient également une paire spéciale de chlorophylle *a* (notée P680) qui joue un rôle primordial dans la séparation de charges. De ce fait, le centre réactionnel du PSII a été désigné par P680 et possède une absorption maximale de la lumière à une longueur d'onde de 680 nm (Yachandra et al., 1993).

Chez les plantes exposées à la lumière, les métaux lourds peuvent accélérer le processus de photoinhibition du PSII en induisant une inhibition du

transport d'électrons et des dommages aux composantes protéiques qui constituent le centre réactionnel du PSII (Giardi et al., 1997). Par exemple, le cadmium (5 μM) induit une diminution de la teneur des protéines D1 et D2 chez *Oryza sativa* exposée 30 min à une lumière d'intensité 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Ces résultats indiquent une altération par le cadmium du « turnover » de la protéine D1 par l'inhibition de la synthèse des polypeptides D1 par l'augmentation de leur dégradation. Dans les mêmes conditions, les polypeptides associés aux antennes collectrices de lumière, CP43 et LHCII, ne sont pas affectés par les effets toxiques de ce métal (Pagliano et al., 2006). En estimant l'incorporation de la méthionine radioactive dans les polypeptides D1 par radiodétection « Pulse-chase », il a été démontré que le cadmium (1 mM) induit après 24h une inhibition de la synthèse de la protéine D1 chez *Pisum sativum*. Dans ces conditions, l'activité photochimique du PSII a été diminuée (Franco et al., 1999).

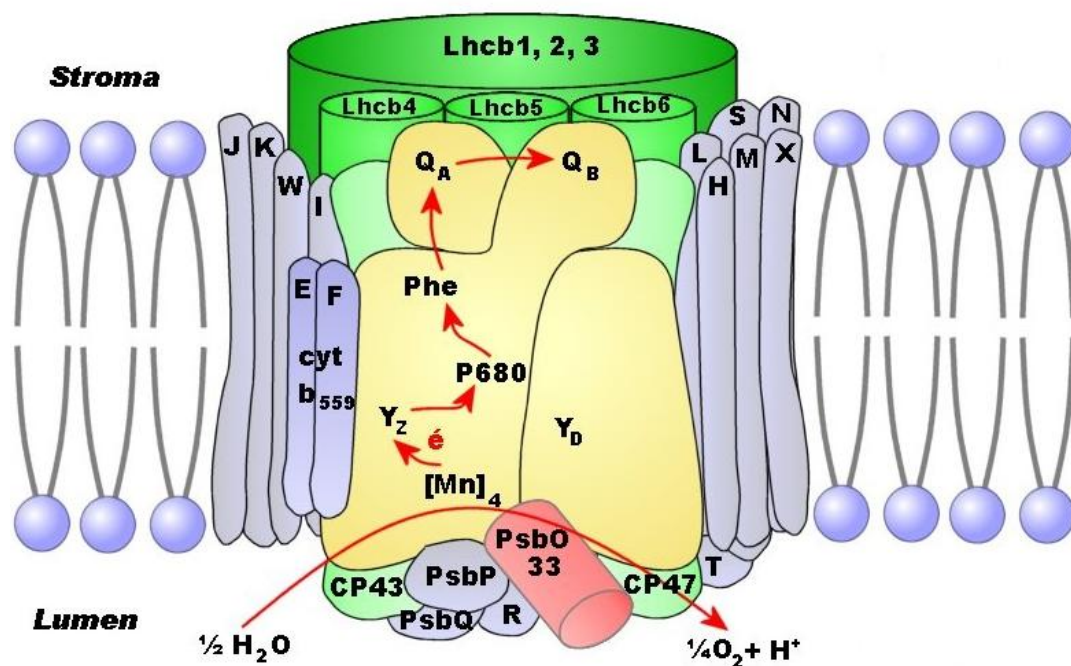


Figure 5 : Modèle structurel du PSII

III. 1. 1. 2. Pigments photosynthétiques et l'absorption de l'énergie lumineuse

Les plantes supérieures et les algues vertes absorbent l'énergie lumineuse à l'aide de différents pigments, les chlorophylles *a* et *b* et les caroténoïdes, qui sont présents dans les antennes collectrices de lumière du PSII et PSI (Ait Ali, 2008). Chaque molécule de ces pigments absorbe efficacement la lumière à des longueurs d'ondes spécifiques, ceci dépendant de sa configuration moléculaire. Quand on analyse le spectre d'absorption de l'ensemble de ces pigments, on peut constater qu'il couvre presque entièrement le spectre d'émission des radiations solaires du visible. Cette propriété permet donc une utilisation efficace de l'énergie lumineuse pour la photosynthèse (Whitmarsh et Govindjee, 1999).

Lorsqu'un pigment photosynthétique absorbe un photon, il passe rapidement (10^{-15} s) de l'état fondamental (ayant un faible niveau d'énergie) à l'état excité, qui a un niveau d'énergie plus élevé. Dans le cas de la chlorophylle possédant deux bandes principales d'absorption de photons, on peut distinguer deux niveaux d'énergie d'état singulet excité ($^1\text{Chl}^*$). Le premier se forme par absorption de la lumière rouge et le deuxième par celle de la lumière bleue (Buchanan, 2000). La chlorophylle singulet à l'état excité, en dissipant une partie de son énergie d'excitation sous forme de chaleur, peut générer la forme triplet excitée ($^3\text{Chl}^*$). Cette dernière possède une durée de vie plus longue (10^{-6} à 10s) que celle de la forme $^1\text{Chl}^*$ (10^{-10} à 10^{-6} s). Dans les antennes collectrices de lumière, l'énergie d'excitation générée par les photons absorbés est transférée aléatoirement d'un pigment à l'autre jusqu'à la paire spéciale de la chlorophylle *a* (P680) du centre réactionnel PSII (Ait Ali, 2008). C'est dans ce dimère de chlorophylle *a* que s'effectue le processus de séparation de charges induisant le transport d'électrons photosynthétiques.

Des études ont démontré que le mercure (Hg) induit une inhibition de la synthèse de la chlorophylle *a* chez les algues de *Synechococcus elongatus*. Cette inhibition cause une altération du spectre d'absorption et de l'émission de fluorescence (à 695 nm) de la chlorophylle *a*. Ces effets toxiques du Hg provoquent une diminution du transfert de l'énergie lumineuse absorbée par les LHCI jusqu'aux centres réactionnels du PSII (Murthy et al., 1995). D'autre

part, sous faible illumination (environ $20 \mu\text{mol}$ de photons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$), certains métaux comme Hg, Cu, Cd, Ni et Zn peuvent remplacer l'ion central Mg de la molécule de chlorophylle du LHCII, diminuant ainsi l'efficacité photochimique du PSII (Küpper et al., n.d.). Cette diminution de l'efficacité fonctionnelle de la chlorophylle, quand l'atome de Mg est remplacé par d'autres métaux, peut être expliquée par le fait que le Mg, dans la chlorophylle à l'état singulet, a une plus grande capacité de libérer les électrons comparativement aux autres métaux substituants (Ait Ali, 2008). En particulier, après absorption de photons, les molécules de chlorophylles ayant le Mg substitué par un autre métal peuvent passer par un état d'excitation instable. Sous cet état, la chlorophylle a tendance à libérer son énergie sous forme de chaleur au lieu de la transférer aux centres réactionnels du PSII (Ait Ali, 2008). Par conséquent, la formation des complexes chlorophylles-métaux peut causer une détérioration de l'efficacité de conversion de l'énergie lumineuse dans les réactions photochimiques (Kupper et al., 1996).

III. 1. 2. Structure et fonctionnement du photosystème I

Le photosystème I est constitué d'une vingtaine de polypeptides distribués entre le centre réactionnel (P700) et l'antenne collectrice de lumière (LHCI). Lorsque les antennes collectrices de lumière du PSI absorbent l'énergie lumineuse, le P700 passe à l'état excité P700*. Au niveau du PSI, la séparation de charges se fait (1-3ps) entre le P700* et une molécule de chlorophylle *a*, notée A_0 . Le P700⁺ formé va ensuite récupérer un électron provenant de la plastocyanine (Jensen et al., 2007). Les électrons reçus par la phylloquinone, A_1 , sont ensuite transférés à la ferrédoxine (Fdx) en passant par les complexes protéiques fer-soufre (Malkin et al., 1990). La réduction de l'accepteur terminal d'électrons, le NADP⁺, en NADPH, est catalysée par la ferrédoxine NADP-réductase. Par la suite, le NADPH est utilisé comme réducteur pour la fixation du CO₂ et la synthèse des glucides pendant les réactions du cycle de Calvin (Ait Ali, 2008). L'inhibition de l'activité du PSI par les métaux a été peu étudiée, comparativement à celle du PSII. Certaines études ont démontré que le Cd et le Hg empêchent la réduction du centre réactionnel P700⁺ par l'inhibition du transport d'électrons du côté donneur du

PSI. Cette interaction du Hg et du Cd avec le P700 provoque une altération de tous les mécanismes de la réduction du P700⁺, incluant le transport linéaire et cyclique d'électrons (Ait Ali, 2008).

III. 2. La fluorescence chlorophyllienne comme biomarqueur du stress

Lorsqu'un pigment absorbe l'énergie d'un photon et entre dans un état d'excitation électronique, 4 voies de dissipations de l'énergie sont possibles.

- sous forme non radiative (chaleur) (Ruban et al., 1992).
- en subissant une transduction de l'énergie lumineuse en énergie chimique (potentiel réducteur). Cette transduction de l'événement photochimique et qui implique des réactions d'oxydoréduction est le processus le plus important de la photosynthèse (Krause et Weis, 1991).
 - sous forme radiative (fluorescence) et provient du PSII (0.6%-3%) (Krause et Weis, 1991).
 - transfert des antennes du PSII vers le PSI afin de redistribuer l'énergie entre les deux photosystèmes (Fork et Satoh, 1986).

L'énergie lumineuse captée peut exciter le centre réactionnel de la chlorophylle, lui enlever des électrons qui se déplaceront le long de la chaîne de transport des électrons et servir à la transformation de l'énergie lumineuse en énergie chimique (photochimie). L'énergie excédentaire peut être réémise sous forme de chaleur, ce qui protégerait les protéines du PSII contre la dégradation (Pospisil, 1997). L'énergie captée peut être réémise directement sous une forme moins énergétique, c'est la fluorescence. Toutes ces formes de dissipation de l'énergie lumineuse incidente sont liées et une atteinte au niveau d'un de ces procédés amène un changement à un autre niveau. Une baisse de la photochimie, par exemple, peut amener une hausse du niveau de la fluorescence. La fluorescence, qui représente environ 2% de l'énergie dissipée du PSII (Maxwell et Johnson, 2000), est un bon indicateur de l'état physiologique de la plante ou de tout autre organisme photosynthétique. Le niveau de fluorescence peut être mesuré avec différents fluorimètres tels que le PAM (Pulse-Amplitude-Modulated) ou le PEA (Plant Efficiency Analyser) et servir à détecter les effets de certains stress sur la capacité photosynthétique de l'organisme.

IV. *Atriplex halimus* L

IV.1. Introduction

Atriplex halimus L. (*Amaranthaceae*) est un arbuste xérohalophile largement distribué dans les régions arides et semi-arides du bassin méditerranéen jusqu'à l'Arabie Saoudite, à des altitudes inférieures à 900m. Il pousse sur une variété de sols, de texture fine à grossière, avec des degrés de salinité variables. Il existe deux sous-espèces d'*A. halimus* : *halimus*, diploïde ($2n = 2x = 18$), se trouve dans les régions semi-arides moins salées, tandis que *schweinfurthii* est tétraploïde ($2n = 4x = 36$) et occupe les régions arides salées.

IV.2. Répartition géographique et de l'habitat

A. halimus pousse naturellement à travers le bassin méditerranéen jusqu'à l'Asie occidentale (Al-Turki et al., 2000; Walker et al., 2014).. En raison de ses qualités fourragères, il a été introduit à Oman, l'Iran, l'Irak, le Pakistan, l'Afrique du Sud, Chili, Argentine, Nouvelle-Zélande et les États-Unis.

A. halimus peut pousser dans les zones caractérisées de faible pluviométrie annuelle (100-400 mm) et forte évapotranspiration potentielle (0,06 à 0,28) (Le Houerou, 2000).

IV.3. Botanique et génétique d'*A. halimus*

A. halimus est un arbuste vivace, peut atteindre jusqu'à 3 m de hauteur (**Figure 6 A, E**). Les feuilles sont très variables dans la forme (10-30 mm de long et 5-20 mm de large). Le Houérou (1992) a divisé *A. halimus* en deux sous-espèces: *halimus* et *schweinfurthii*. Cette décision est basée sur les différences de morphologie (**Figure 6. 1A**), *halimus* a une plus petite taille (0,5-2,0 m de hauteur, par rapport à 1,0-3,0 m pour *schweinfurthii*) et courtes branches fructifères (0.2- 0,5 m, par rapport à 0,5 à 1,0 m).

A. halimus possède la voie photosynthétique C4 (Zervoudakis et al., 1998), dans lequel le CO₂ est incorporé dans le phosphoénolpyruvate (PEP) pour former de l'oxaloacétate par l'action de la PEP carboxylase. Les feuilles

d'*A. halimus* ont l'anatomie de "Kranz" avec une couche de cellules autour de faisceau vasculaire (Walker et al., 2014). La présence d'une couche de poils vésiculaires permet à cette espèce de tolérer au stress salin (Mozafar et Goodin, 1970).

Le nombre de chromosomes de base (x) dans le genre *Atriplex* est 9. Talamali et al. (2001) et Walker et al. (2005) ont déterminé les niveaux de ploïdie pour 26 populations d'*A. halimus* à travers le bassin méditerranéen et les îles de Canaries. Les deux études ont montré que les populations de la France et de l'Espagne, correspondant au phénotype de subsp. *halimus*, étaient diploïde ($2n = 2x = 18$), tandis que ceux de l'Afrique du Nord, l'Italie, l'Égypte et la Syrie étaient tétraploïde ($2n = 4x = 36$) et correspondait généralement au phénotype de subsp. *Schweinfurthii*.

Haddioui et Baaziz (2001), en analysant polymorphisme isoenzymatique des populations marocaines d'*A. halimus*, ont trouvé un degré relativement élevé de diversité génétique, principalement en raison de la diversité au sein des populations, avec une variation entre les populations ne représentent que 8%. Ces auteurs ont attribué cela à la nature allogamie d'*A. halimus*.

IV.4. Résistance d'*A. halimus* aux différents stress

IV.4.1. Résistance à la température et la lumière

IV.4.2 Résistance à la salinité

Comme d'autres halophytes, *A. halimus* accumule les principaux ions de la salinité (Na et Cl et d'autres anions) dans ses tissus en les stockant dans les vacuoles (Walker et al., 2014). Les poils vésiculaires sur la surface des feuilles agissent également comme un puits de sel (Mozafar et Goodin, 1970). La résistance à la salinité chez *A. halimus* peut également être liée à l'efficacité des mécanismes impliqués dans la tolérance aux dommages induits par le sel. Bouchenak et al. (2012) ont montré que la peroxyrédoxine et la méthionine sulfoxyde réductase, enzymes clés piégeant les peroxydes organiques et

réparant les protéines oxydées, ont été induites plus efficacement dans les populations d'*A. halimus* résistantes au sel.

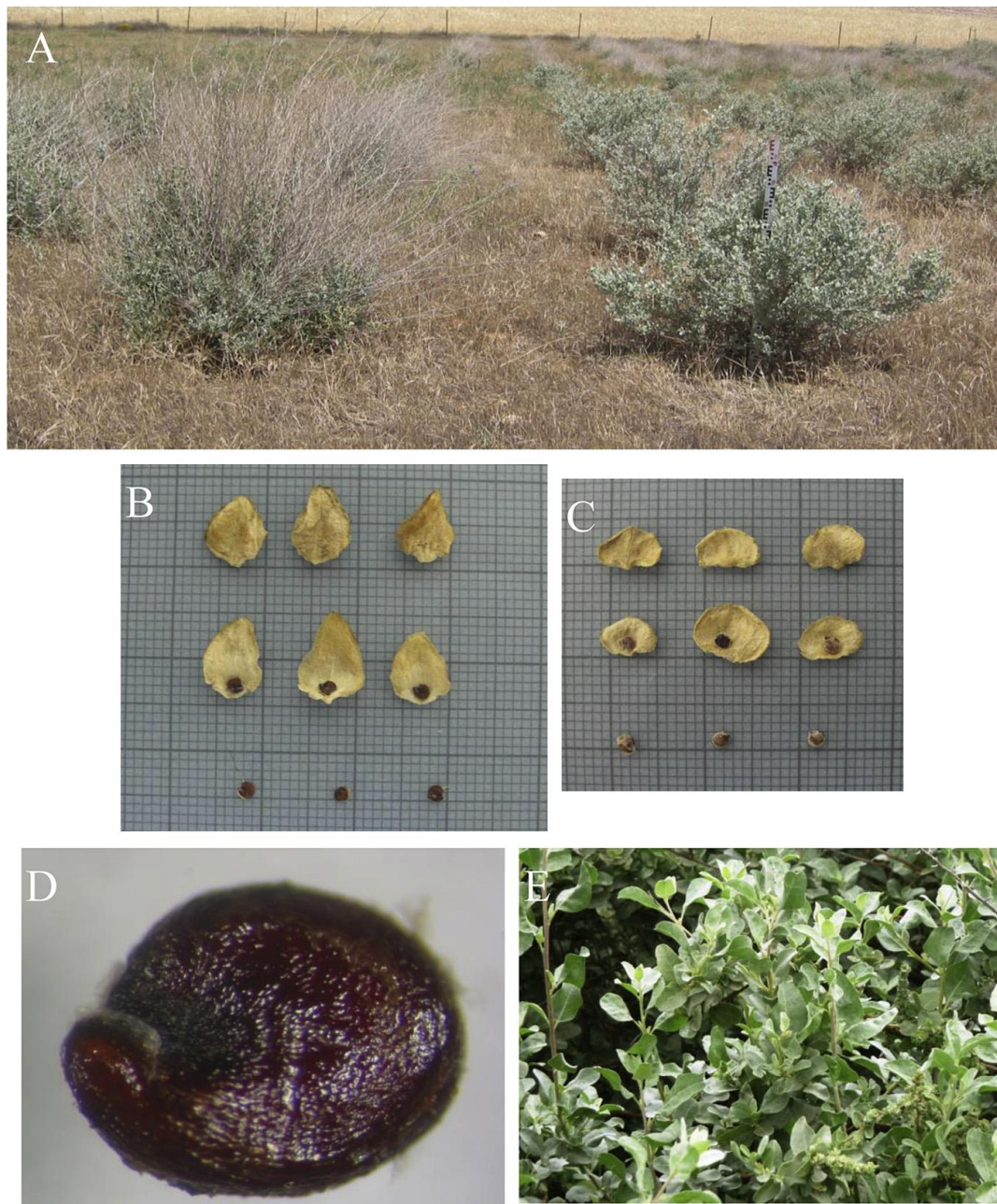


Figure 6 : (A) Plantes d'*Atriplex halimus* : subsp. *schweinfurthii* (à gauche) et *halimus* (à droite). Hauteur totale = 1,10 m (B) Les fruits et les graines d'*A. halimus* subsp. *schweinfurthii*. (C) Les fruits et les graines d'*A. halimus* subsp. *halimus*. (D) Graine d'*A. halimus* subsp. *schweinfurthii*. Diamètre = 1,2 mm. (E) Feuilles d'*A. halimus* subsp. *halimus* (Walker et al., 2014).

IV.4.3. Résistance aux métaux lourds

La germination de *A. halimus* semble être résistant à des concentrations élevés d'ETM (Martínez-Fernández et Walker, 2012; Mesnoua et Lormani, 2015). Des études d'*A. halimus* cultivées dans des pots de sols contaminés (Manousaki et Kalogerakis, 2009), dans la culture hydroponique (Lefèvre et al., 2009; Lutts et al., 2004) ou dans des boîtes de Pétri (Márquez-García et al., 2013; Mesnoua et Lormani, 2015) montrent que cette espèce est capable de tolérer de fortes concentrations de Cd, Cu, Mn, Ni, Pb et Zn. Les mécanismes de tolérance au Cd peut se traduit par une précipitation de ce métal avec de l'oxalate dans la tige (Lutts et al., 2004), ou son excrétion dans les poils vésiculaires (Lefèvre et al., 2009). L'accumulation de la glycine bêtaïne, la proline, la spermine et spermidine a été également observé en réponse au stress du cadmium (Lefèvre et al., 2009; Lutts et al., 2004; Nedjimi et Daoud, 2009). Lotmani et Mesnoua (2011) ont démontré que l'accumulation du Cu peut conduire à l'apparition de nouvelles isoformes de la superoxyde dismutase et de la peroxydase.

IV.4.4. Résistance à la sécheresse

Les espèces xérophiiles C4 tels que *A. halimus* sont généralement efficaces dans leur utilisation de l'eau et donc adaptée aux climats secs. *A. halimus* possède des racines très longues qui lui permettent l'absorption de l'eau des horizons profonds (jusqu'à 5 m) (Le Houérou, 1992).

Chapitre II :

**Effet de quelques métaux lourds
sur la germination et la croissance des
plantules *d'Atriplex halimus* L**

Chapitre II : Effet de quelques métaux lourds sur la germination et la croissance des plantules d'*Atriplex halimus* L

1. Introduction

La contamination par les éléments traces métalliques (ETM) est devenue un problème environnemental majeur qui limite la productivité des plantes et menace la santé humaine (Demirevska-Kepova et al., 2004). Les principales sources de pollution par les éléments traces métalliques dans le monde sont les activités industrielles telles que l'exploitation minière, la combustion de carburants, les engrais et les pesticides (Redondo-Gómez et al., 2011). Certains éléments traces métalliques, comme le Zn, le Cu, le Mg, le Mo et le Ni, sont essentiels pour la croissance des plantes, mais sont toxiques à des concentrations élevées (Li et al., 2005; Tangahu et al., 2011).

L'évaluation de la toxicité causée par les éléments traces métalliques sur les plantes constitue un outil très important pour la recherche dans le domaine de la phytoremédiation. Plusieurs paramètres physiologiques peuvent être utilisés pour évaluer le stress induit par des éléments traces métalliques tels que la germination, la croissance et la production en biomasse, la teneur en pigments chlorophylliennes et les activités des enzymes antioxydants (Kavuličová et al., 2012). La germination des graines est le premier stade de vie des plantes, et elle est l'un des processus physiologiques les plus sensibles qui peut être influencé par des facteurs environnementaux, biotiques et/ou abiotiques (Moosavi et al., 2012). Par conséquent, l'étude du stade de la germination constitue un outil considérable pour comprendre les mécanismes toxiques des contaminants environnementaux sur les plantes (Cheng and Zhou, 2002; Liu et al., 2012). La littérature suggère que la germination des graines est affectée par les métaux de deux manières. D'abord, par leur toxicité générale et d'autre part, par l'inhibition de l'absorption d'eau (Kranner and Colville, 2011a).

Atriplex halimus L (*Amaranthaceae*) est un xérohalophite pérenne et native des régions méditerranéennes arides et semi arides. Cette espèce est connue de tolérer dans conditions abiotiques extrêmement dures telles que; salinité (Bajji et al., 1998a; Martínez et al., 2005), sécheresse (Martínez et al., 2004) et le froid (Walker et al., 2008).

Des études récentes ont révélées la présence de cette espèce dans des sites miniers riches en éléments traces métalliques (Lutts et al., 2004).

L'objectif de cette étude est d'analyser et de comparer l'effet de concentrations croissantes du Cd, du Cu et du Zn sur les paramètres de la germination et de croissance des semences d'*A. halimus*. Les résultats de cette étude nous permettront de savoir quel est le métal le plus toxique pour *A. halimus*, ainsi quel est l'organe le plus sensible à la toxicité des éléments traces métalliques.

2. Matériels et Méthodes

2.1. Récolte et préparation des graines

Les graines d'*A. halimus* sont récoltées durant le mois de décembre 2013 à partir des populations qui poussent naturellement dans la station expérimentale du Centre de recherche scientifique et techniques sur les régions arides, Biskra (34°55'42"N 5°38'58"E, et 198 m d'hauteur). Les graines (**Figure 6**), de très petites tailles, enveloppées par des bractées sont alors séchées au soleil ensuite frottées contre un tamis afin de les séparer de leurs enveloppes. Elles sont ensuite conservées sèchement dans des boîtes jusqu'à leurs utilisations.

2.2. Matériel végétal et conditions de germination

La stérilisation des graines d'*A. halimus* se fait par immersion des graines pendant 1 min dans l'eau de javel puis les transférées dans l'éthanol 70 % pendant 30 s. Les graines sont ensuite rincées 3 fois par l'eau distillée stérile et laissées sécher sous la hotte. Les graines sont alors mises en germination sur un milieu synthétique composé de l'agar agar 1%.

Les métaux utilisés dans cette étude sont le cadmium (Cd), le cuivre (Cu) et le zinc (Zn). Les métaux sont apportés sous forme sulfatée à partir des solutions mères à 10 mM préparée dans de l'eau ultrapure. 10 concentrations de 0 jusqu'à 4000 μ M sont utilisées pour chaque métal. Le milieu est autoclavé 15 min à 121 °C puis refroidi avant d'être coulé dans des boîtes de Pétri (120 x 15 mm). Après dépôt des graines (40 – 50 par boîte et 3 boîtes par concentration), les boîtes sont ensuite scellées avec du ruban adhésif en papier pour permettre les échanges gazeuses.

Après le semi, les boîtes sont placées d'abord dans l'étuve à l'obscurité pendant 24 h, puis transférées dans un germoir à 25 °C de température et une photopériode de 16 h d'éclairage et 8 h d'obscurité. Les boîtes sont déposées inclinées à 15 ° (**Figure 7**).



Figure 7 : Gerموir contrôlé des semences

2.3. Calcule des paramètres de la germination et de la croissance

Les graines sont examinées chaque jour afin de vérifier leur germination. Une graine est considérée comme ayant germé, lorsque sa radicelle a au moins 2 mm de longueur. La croissance des plantules est considérée comme inhibée si le tégument de la graine est perforé mais l'embryon ne développe pas ultérieurement (Li et al., 2005).

Après 7 jours la dynamique de la germination est mesurée selon Márquez-García et al. (2013) en calculant les paramètres suivants :

- Germination finale (pourcentage des graines germées à la fin de l'expérience),

- (T0) temps en jours pour la germination de la première graine et
- (T50) nombre de jours nécessaires pour que 50% des graines puissent germer.

Pour les paramètres de la croissance six plantules (deux par boîte) sont prélevées pour chaque traitement, puis numérisés à l'aide d'un scanner HP Scanjet G2710 et les longueurs des cotylédons, des hypocotyles et des racines sont mesurées par le logiciel (OPMIAS Ver1.0). Finalement, le poids frais de ces plantules est mesuré à l'aide d'une balance de 0,01 mg de précision.

2.4. Analyse statistique

L'analyse statistique est réalisée à l'aide du logiciel SPSS. Le taux de la germination et les paramètres de croissance sont analysés par la technique ANOVA à un facteur, en utilisant le test de Student-Newman-Keuls (en raison de la normalité et l'homogénéité des données), tandis que le T0 et T50 sont analysés par des tests non paramétriques (Kruskal Wallis et Mann Whitney U) en raison de la non normalité des données.

3. Résultats

3.1. Les effets des métaux lourds sur la germination des semences

Les résultats concernant le comportement germinatif des graines d'*A. halimus* en terme de germination finale et cinétique de germination sous l'effet du Zn, du Cu et du Cd sont présentés dans le (**Tableau 1**). Le taux de la germination finale d'*A. halimus* et la vitesse de germination (T0 et T50) ne sont pas affecté par le Zn et le Cu, alors que une légère diminution est observée dans la germination finale au dessus de 1000 μM ($p < 0.01$) sous l'effet du Cd, de même, le temps nécessaire pour la germination de 50 % de graines (T50) est retardé sous l'effet du Cd à partir de 1000 μM Cd (**Tableau 1**).

3.2. Les effets des métaux lourds sur le développement des plantules d'*A.*

halimus

Le poids frais des plantules, la longueur des cotylédons et des hypocotyles sont diminués de manières différentes, mais significatives, avec l'augmentation de la concentration métallique ($p < 0,01$). Le Zn induit une légère diminution sur la longueur des cotylédons. Toutefois, son effet est plus remarquable sur les autres paramètres comme le poids des plantules, la longueur des hypocotyles et des racines par rapport au témoin (**Tableau 2** et **Figure 10.A**). En outre, le Cu réduit également la croissance des plantules de manière significative, mais son effet est plus toxique que le Zn car la croissance est inhibée complètement à 2000 μM (**Tableau 1**, **Figure 8** et **Figure 10.B**). Finalement, le Cd est le plus toxique en comparaison avec le Zn et le Cu, il inhibe complètement la croissance 250 μM (**Tableau 2**, **Figure 8** et **Figure 10.C**).

Tableau 1 : pourcentage de la germination finale après 7 jours, T0 et T50 d'*Atriplex halimus L* soumis sous différentes concentrations de Zn, Cu et Cd.

Métal	Concentration (μM)	Germination finale (%)	T0	T50
Témoin	0	99.2 \pm 1.4 a	1.0 \pm 0.0	1.0 \pm 0.0 a
ZnSO ₄	50	98.0 \pm 2.0 a	1.0 \pm 0.0	1.0 \pm 0.0 a
	100	99.0 \pm 1.0 a	1.0 \pm 0.0	1.0 \pm 0.0 a
	250	97.7 \pm 2.3 a	1.0 \pm 0.0	1.0 \pm 0.0 a
	500	98.3 \pm 0.6 a	1.0 \pm 0.0	1.0 \pm 0.0 a
	1000	99.0 \pm 1.0 a	1.0 \pm 0.0	1.0 \pm 0.0 a
	1500	97.7 \pm 1.2 a	1.0 \pm 0.0	1.0 \pm 0.0 a
	2000	98.7 \pm 1.5 a	1.0 \pm 0.0	1.0 \pm 0.0 a
	3000	98.0 \pm 2.0 a	1.0 \pm 0.0	1.0 \pm 0.0 a
	4000	99.0 \pm 1.0 a	1.0 \pm 0.0	1.0 \pm 0.0 a
CuSO ₄	50	100.0 \pm 0.0 a	1.0 \pm 0.0	1.0 \pm 0.0 a
	100	100.0 \pm 0.0 a	1.0 \pm 0.0	1.0 \pm 0.0 a
	250	100.0 \pm 0.0 a	1.0 \pm 0.0	1.0 \pm 0.0 a
	500	99.3 \pm 1.2 a	1.0 \pm 0.0	1.0 \pm 0.0 a
	1000	100.0 \pm 0.0 a	1.0 \pm 0.0	1.0 \pm 0.0 a
	1500	99.0 \pm 1.8 a	1.0 \pm 0.0	1.0 \pm 0.0 a
	2000	100.0 \pm 0.0 a	1.0 \pm 0.0	1.0 \pm 0.0 a
	3000	98.7 \pm 2.3 a	1.0 \pm 0.0	1.0 \pm 0.0 a
	4000	98.7 \pm 2.3 a	1.0 \pm 0.0	1.0 \pm 0.0 a
CdSO ₄	50	99.2 \pm 1.4 a	1.0 \pm 0.0	1.0 \pm 0.0 a
	100	100.0 \pm 0 a	1.0 \pm 0.0	1.0 \pm 0.0 a
	250	97.7 \pm 3.9 a	1.0 \pm 0.0	1.0 \pm 0.0 a
	500	98.6 \pm 2.4 a	1.0 \pm 0.0	1.0 \pm 0.0 a
	1000	98.6 \pm 2.4 a	1.0 \pm 0.0	1.0 \pm 0.0 a
	1500	89.0 \pm 4.6 abc	1.0 \pm 0.0	1.0 \pm 0.0 a
	2000	91.4 \pm 2.5 ab	1.0 \pm 0.0	2.0 \pm 0.0 b
	3000	79.7 \pm 4.8 c	1.0 \pm 0.0	2.0 \pm 0.0 b
	4000	83.1 \pm 3.8 bc	1.0 \pm 0.0	2.0 \pm 0.0 b

Valeur moyenne \pm erreur standard (n = 3). Les différentes lettres indiquent des différences significatives entre les traitements et le témoin. Teste Newman Keuls ($p < 0,01$) pour a germination finale et le test Kruskal Wallis et Mann Whitney U ($p < 0,01$) pour T0 et T50

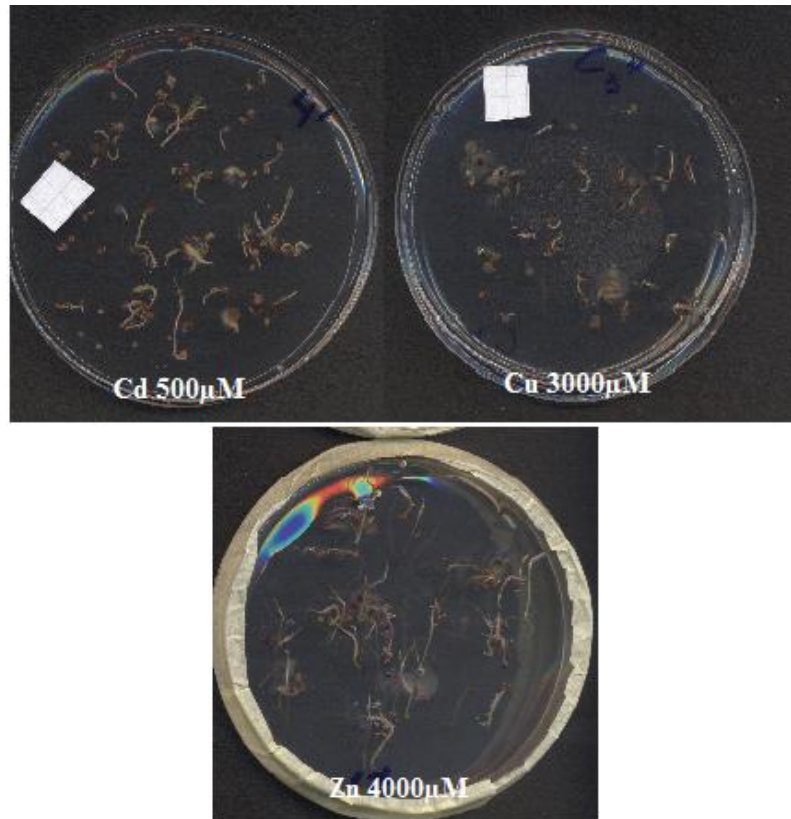


Figure 8 : Photo représentant les concentrations du Cd et du Cu qui inhibe la croissances des graines d'*Atriplex halimus L*

Parmi les organes de la plantule, la longueur des racines semble la plus sensible au stress des métaux lourds (Zn, Cu et Cd) et la longueur des hypocotyles semble la moins sensible (**Figure 9** et **Figure 10. A-C**).

Tableau 2 : Effet du Zn, Cu et Cd sur le poids frais des plantules d'*Atriplex halimus L*

Concentration (μM)	Zn	Cu	Cd
0	6.45 \pm 0.22 a	6.45 \pm 0.22 a	6.45 \pm 0.22 a
50	5.26 \pm 0.18 abc	5.23 \pm 0.46 b	5.57 \pm 0.27 a
100	5.52 \pm 0.41 ab	3.73 \pm 0.08 c	3.18 \pm 0.15 b
250	4.56 \pm 0.38 bc	3.40 \pm 0.28 cd	2.60 \pm 0.14 b
500	4.71 \pm 0.23 bc	3.07 \pm 0.21 cde	n.d
1000	4.48 \pm 0.30 bc	2.87 \pm 0.21 cde	n.d
1500	4.83 \pm 0.24 bc	1.88 \pm 0.10 e	n.d
2000	3.86 \pm 0.46 cd	2.27 \pm 0.29 de	n.d
3000	3.91 \pm 0.18 cd	n.d	n.d
4000	2.82 \pm 0.15 d	n.d	n.d

n.d: non déterminée, si l'embryon ne développe pas après 7 jours d'imbibition.

Valeur moyenne \pm erreur standard (n = 6). Les différentes lettres indiquent des différences significatives entre les traitements et le témoin. Teste Newman Keuls ($p < 0,01$).

**Figure 9** : Effet du cadmium sur la croissance de plantules d'*Atriplex halimus L*

(de 0 à 250 μM)

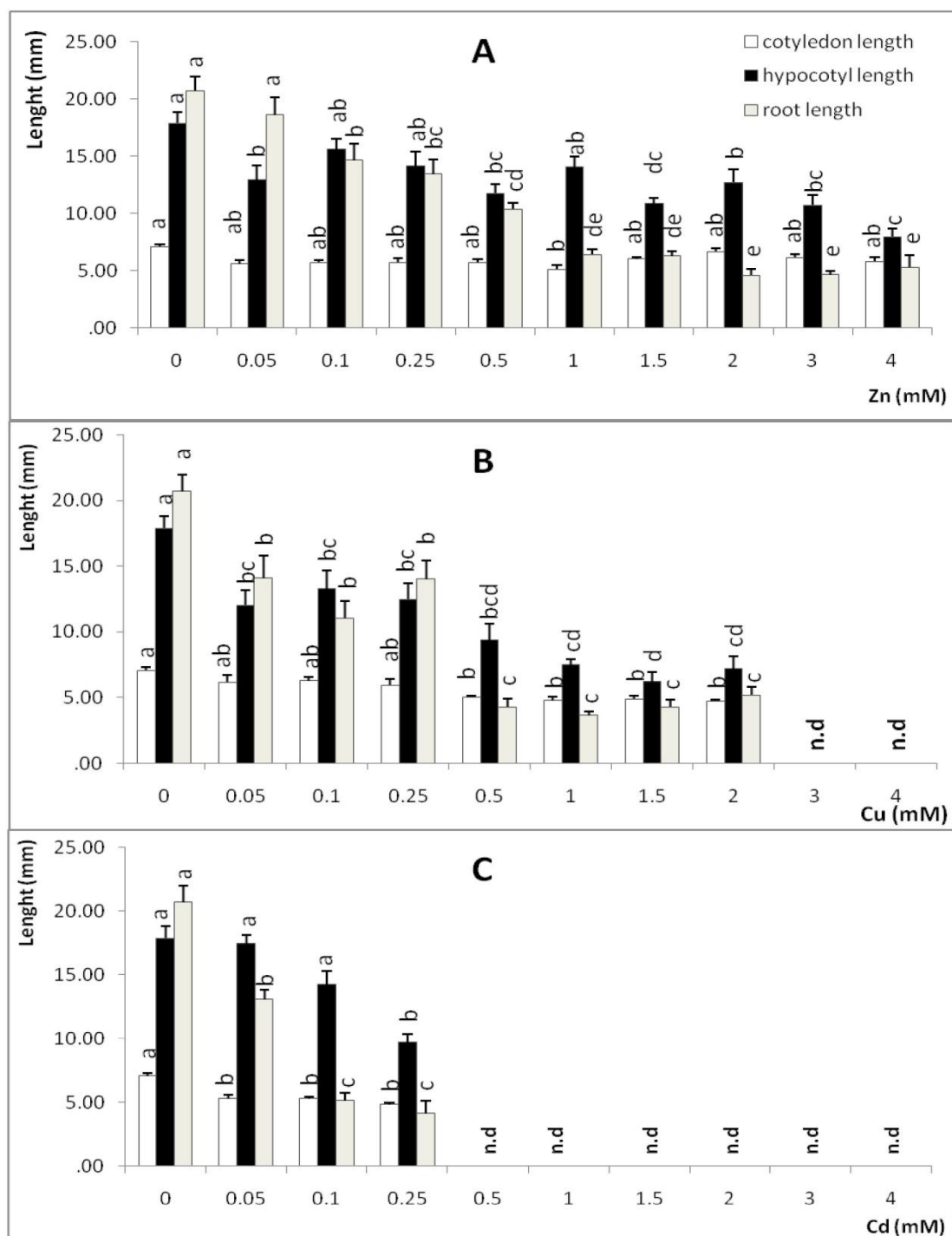


Figure 10 : Effet des métaux lourds sur la croissance des semis d'*Atriplex halimus* L. Valeur moyenne \pm erreur standard (n = 6). Les différentes lettres indiquent des différences significatives entre les traitements et le témoin. Teste Newman Keuls (p<0,01).

n.d: non déterminée, si l'embryon ne développe pas après 7 jours d'imbibition.

4. Discussion

Nous avons observé que dans le témoin, le taux de la germination final est proche ou égal 100%. Ces résultats sont en accord avec des données publiées précédemment par Márquez-García et al (2013) avec des graines de la même espèce. Il est connu que le Zn et le Cu sont des éléments essentiels pour la plante à de faibles doses (Kranner et Colville, 2011), mais sont toxiques à des concentrations élevées alors que le Cd est toxique à de très faible concentration.

Le Cu est un oligo-élément essentiel qui se trouve dans les protéines, il contribue au transport d'électrons photosynthétique, la respiration mitochondriale, la réponse au stress oxydatif, le métabolisme de la paroi cellulaire et certaines hormones (Marschner, 1995; Yruela, 2005). A des concentrations élevées, il provoque l'inhibition de la croissance et des perturbations dans la photosynthèse et la respiration (Marschner, 1995; Yruela, 2005). Son effet toxique se traduit principalement dans les tissus racinaires avec un peu de translocation vers les parties aériennes (Marschner, 1995). Il a été rapporté que le cuivre réduit la germination de la luzerne à des concentrations supérieures à 300 μM (Peralta et al., 2001), le blé à 80 μM (Singh et al., 2007) et le riz à 1000 μM (Ahsan et al., 2007). Cependant, dans notre étude aucun effet du cuivre n'a été observé sur la germination. En outre, des effets négatifs du cuivre sur les racines ont été rapportés dans la luzerne et le blé à des concentrations supérieurs à 50 μM (Peralta et al., 2001 et Singh et al., 2007) et dans les plantules de riz à des concentrations supérieures à 200 μM (Ahsan et al., 2007). Dans la présente étude le cuivre affecte négativement les racines et les hypocotyles à partir de 50 μM .

L'excès du Zn provoque une chlorose dans les jeunes feuilles et peut inhiber la photosynthèse (Marschner, 1995), et il affecte l'absorption d'autres éléments nutritifs (Wang et al., 2009). Il provoque également l'inhibition de la germination des graines, la croissance des plantes et le développement des racines (Lingua et al., 2008). Il a été rapporté que le Zn réduit la germination de *Vigna mungo* à des concentrations supérieures à 500 μM (Solanki et al., 2011) et la luzerne à des concentrations supérieures à 300 μM (Peralta et al., 2001). Cependant, dans notre étude aucun effet n'est observé dans le stade de la germination. En outre, des effets négatifs sur le poids des plantules et la longueur des hypocotyles ont été observées dans *Eucomis autumnalis*

à des niveaux supérieurs à 20 μM et dans les racines à 4 μM (Street et al., 2007). Dans la présente étude Zn affecte négativement le poids des plantules et la longueur des racines à 50 μM , et la longueur des hypocotyles à 100 μM .

Chez les plantes, le cadmium n'a aucune fonction biologique connue, et il est toxique à de faibles concentrations (de la Rosa et al., 2004). Les symptômes que présente une plante cultivée en présence de cadmium sont l'inhibition de la croissance, la diminution de sa biomasse, la chlorose, la nécrose, la perturbation des flux d'eau, la déficience en phosphore et en azote, l'accélération de la sénescence l'apparition du retard dans le développement des jeunes pousses et des perturbations de la photosynthèse (Zorrig, 2011). Le cadmium était le plus toxique sur la germination des graines et la croissance des plantules d'*A. halimus* parmi les trois métaux lourds testés. Le pourcentage de la germination des graines est réduite à 1500 μM et la croissance des plantules est complètement supprimée au-dessus de 250 μM . Il a été rapporté que le cadmium diminue la germination des graines de *Suaeda salsa* à 2,75 μM (Liu et al. 2012). De même, la longueur des racines du radis et de la tomate ont été rapportée réduite à 128 et 64 μM respectivement (Di Salvatore et al., 2008).

L'hypothèse que nous pouvons suggérer, pour les résultats obtenus dans notre expérimentation est que les téguments de la graine semblent jouer un rôle d'écran protégeant l'embryon par les procédés de pénétration sélective des ions métalliques (Li et al., 2005) ou par le mécanisme chimique d'adsorption. Ultérieurement après germination la croissance a été sévèrement inhibée ce qui conforte bien cette hypothèse.

Les racines sont les principales cibles des ions métalliques et leur croissance est sévèrement affectés que celle des parties aériennes (Márquez-García et al., 2013), par conséquent, la longueur des racines est souvent utilisée comme bioindicateur de phytotoxicité des métaux lourds (Silvia et al., 2009). Nos résultats sont donc en adéquation avec ceux de (Márquez-García et al., 2013).

5. conclusion

Cette étude montre que le stade de la croissance des plantules d'*A. halimus* et plus sensible au toxicité des métaux lourds que le stade de la germination. De plus, la longueur des racines montre une forte corrélation négative avec l'augmentation de la concentration métallique dans le milieu, et peut-être utilisé comme bon indicateur de

phytotoxicité des métaux lourds. Finalement, le Cadmium est le plus de toxique en comparaison avec le cuivre et le zinc.

Chapitre III :
Caractéristique d'accumulation
et de tolérance au cadmium chez
Atriplex halimus L.

Chapitre III : caractéristique d'accumulation et de tolérance au cadmium chez *Atriplex halimus* L.

1. Introduction

Le cadmium (Cd) est un élément trace non essentiel, qui peut être toxique pour la plupart des organismes vivants, même à de très faibles concentrations (Irfan et al., 2013; Redondo-Gómez et al., 2010). Au cours du siècle dernier, les sols de larges superficies ont été contaminés par le Cd. Comme le Cd dans les sols est généralement facilement biodisponible (Street et al., 2007), il peut être accumulé dans les récoltes et constituer un risque pour les humains à travers la contamination de la chaîne alimentaire. Pour cela, l'évaluation des risques liés à la pollution par le Cd nécessite de disposer d'outils biologiques permettant d'apprécier l'impact des polluants sur les êtres vivants (Cossu et al., 1997).

Le Cd provoque certains dommages à différents niveaux d'organisation biologique depuis les populations et/ou les communautés jusqu'aux différents constituants cellulaires (Li et al., 2008). La réduction dans la croissance et l'apparition de nécrose et de chlorose dans les feuilles sont les premiers symptômes de la toxicité du Cd (Küpper et al., 2007). En plus de ces effets observables, s'ajoute d'autres effets comme la réduction de la teneur en pigments chlorophylliens et par conséquent le rendement photosynthétique (Küpper et al., 2007; Redondo-Gómez et al., 2010), ainsi que le déséquilibre dans l'absorption et la translocation des éléments minéraux (Jiang et al., 2004; Xu et al., 2012).

Tout dommage, observable et/ou mesurable au niveau biochimique, cellulaire ou physiologique, pourrait servir pour établir un diagnostic de qualité des milieux naturels (Cossu et al., 1997; Vasseur and Cossu-Leguille, 2003). La mesure des dommages causés par le Cd et les mécanismes de tolérance des plantes constitue un outil important pour la compréhension et le développement des biomarqueurs (Cossu et al., 1997). Les expérimentations en conditions contrôlées ont largement démontré que les biomarqueurs peuvent être utilisés pour la surveillance de la qualité des milieux naturels. Les biomarqueurs sont en effet des éléments de l'évaluation biologique dans la mesure où ils peuvent fournir des informations sur l'état de santé des individus (Dazy et al., 2009).

Les activités enzymatiques antioxydantes peuvent être modulées par des facteurs environnementaux et par la présence de substances polluantes. Ainsi, ces activités pourraient être utilisées en écotoxicologie comme biomarqueurs chez les plantes permettant de caractériser la qualité des milieux naturels.

Atriplex halimus L (*Amaranthaceae*) est un arbuste xérohalophyte, très abondant dans les steppes salines d'Algérie. Elle résiste bien aux conditions environnementales extrêmes des régions arides comme la salinité et la sécheresse (Bajji et al., 1998; Le Houerou, 2000). 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 concentrations élevées des éléments traces métalliques comme le cadmium (Lefèvre et al., 2009; Lotmani et Mesnoua, 2011; Mateos-Naranjo et al., 2013; Nedjimi et Daoud, 2009). Cependant, les mécanismes de toxicité du Cd et les caractéristiques de tolérance d'*A. halimus* à ce métal ne sont pas encore claires.

Les objectifs de cette étude sont :

- Élucider les seuils de la phytotoxicité de Cd chez *A. halimus* en examinant sa réponse de croissance et de survie aux différents niveaux de concentration du Cd
- L'évolution des marqueurs de défense du stress (activités des enzymes antioxydantes qui reflètent indirectement la production des ROS dans l'organisme)
- L'évolution des biomarqueur de toxicité du Cd (la teneur en pigments photosynthétiques, la fuite d'électrolytes et les paramètres de la fluorescence chlorophyllienne et les échanges gazeux)
- Examiner l'effet du Cd sur l'absorption et la translocation des éléments minéraux.

2. Matériels et Méthodes

2.1. Condition de culture

Les graines d'*A. halimus* L sont mises à germination dans des boîtes de pétri placés dans une armoire à germination (ASL Aparatos Cientificos M-92004, Madrid, Espagne) à 16h de lumière (photon flux rate, 400–700 nm, 35 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) à 25°C et 8h d'obscurité pendant une semaine.



Figure 11 : *Atriplex halimus* L en serre contrôlée

Ensuite, les plantules sont transplantées dans des pots en plastique (10*10*14 cm) remplis par la perlite et transférées dans un dispositif de culture hydroponique dans une serre en verre permettant une croissance optimale des végétaux (**Figure 11**). En effet, toutes les conditions de culture sont contrôlées : la luminosité (14 heures de jour / 10 heures de nuit), la température (21–25 °C) et l'hygrométrie (40–60%). La nutrition minérale est assurée par une solution nutritive de Hoagland 20%.

2.2. Solution nutritive

Les plantes sont cultivées en hydroponie. La solution nutritive utilisée est le milieu Hoagland dilué à 20%, pH 5. Sa composition est présentée dans le (**Tableau 3**).

Tableau 3 : Composition de la solution nutritive de Hoagland (Hoagland and Arnon, 1950)

Eléments minéraux	Concentration mg/L
(NH ₄) ₂ HPO ₄	115,3
de B(OH) ₃	2,86
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	656,4
CuSO ₄ .5 H ₂ O	0,08
Fe(C ₄ H ₄ O ₆) ₃ .2 H ₂ O	5,32
MgSO ₄ .7 H ₂ O	240,76
MnCl ₂ .4H ₂ O	1,81
MoO ₃	0,016
KNO ₃	606,6
ZnSO ₄ .7 H ₂ O	0,22

2.3. Application du Cadmium

Après 70 jours de culture, les plantules sont placées dans des bacs individuels (9 plantules par bac) pour subir les divers traitements du Cd. Six concentrations différentes, 0, 50, 200, 400, 650 et 1350 µM du Cd sous forme de CdCl₂.5H₂O, sont appliquées au cours du traitement, le niveau de la solution nutritive est contrôlé chaque deux jours et si nécessaire le milieu de Hoagland est ajouté afin de maintenir le niveau initial. La solution nutritive est remplacée complètement une fois par semaine. Le traitement a duré 23 jours.

2.4. Analyses des biomarqueurs morphologiques et physiologiques

L'ensemble des mesures est réalisé entre le 21^{ème} et le 23^{ème} jour après traitement par le Cd. Les analyses qui n'exigent pas le sacrifice du matériel végétal (échanges gazeux et fluorescence chlorophyllienne) sont effectuées en premier lieu, alors que,

celles qui exigent le sacrifice des plantes sont laissées au dernier temps (biomasse, dosages des métaux et sel minéraux..).

Après la récolte des plantes, la biomasse aérienne et racinaire est déterminée. Plusieurs paramètres sont étudiés, les échantillons de feuilles et racines sont pesés pour déterminer leurs masses fraîches. De même, la longueur des tiges, le nombre de feuilles mortes et vivantes et le taux de survie des plantes sont calculés avant le séchage du matériel végétal.

Le poids sec des tissus aériens et racinaires est déterminé en plaçant le matériel végétal pendant 48h à 80°C.

2.4.1. vitesse relative de croissance

La vitesse relative de croissance (relative growth rate) se définit pour une plante comme étant l'augmentation de poids sec par unité de poids existant par unité de temps :

$$RGR = (\ln Bf - \ln Bi) \times D^{-1} \text{ (g g}^{-1} \text{ day}^{-1}\text{)}$$

Bf = poids sec final,

Bi = poids sec initial (moyen entre 9 plantes pour chaque traitement séchées au début de l'expérience) et

D = la durée en jour.

2.4.2. Surface spécifique foliaire (SLA)

La surface spécifique foliaire (specific leaf area) se définit par le rapport de la surface foliaire présente à chaque instant (L) au poids sec des feuilles correspondantes (W)

$$SLA = L/W \text{ [m}^2 \text{ kg}^{-1}\text{]}$$

Les feuilles sont scannées avec un scanner à plat (hp) et la surface foliaire est calculée à l'aide d'un logiciel SigmaScan (SPSS, IL USA).

2.4.3. Mesure des échanges gazeux photosynthétiques

Les mesures de la photosynthèse nette et des échanges gazeux ont été effectuées à l'aide d'un appareil portable Li-Cor modèle 6400 (Lincoln, NE, USA) (**Figure 12**). Les paramètres mesurés sont :

- La photosynthèse nette (A_N , $\mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) ;
- La concentration intercellulaire en CO_2 (C_i , $\mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{mol air}^{-1}$) ;

- La conductance stomatique ($gs, \text{mmol H}_2\text{O.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) ;
- L'efficacité de l'utilisation de l'eau intrinsèque ($iWUE, \mu\text{mol CO}_2 \text{mol}^{-1} \text{H}_2\text{O}$).

Principe de mesure : La feuille est enfermée dans une chambre étanche de 2 cm^2 dans laquelle sont relevés régulièrement plusieurs paramètres (température de l'air, humidité relative, éclairage). Une pompe assure la circulation de l'air dans le système et l'amène vers le spectrophotomètre infrarouge (IRGA : Analyseur de Gaz à Infra Rouge). Le CO_2 est dosé par mesure différentielle entre la cellule de mesure et une cellule de référence où circule un air dépourvu en CO_2 (par passage sur du bicarbonate de calcium). La concentration en CO_2 du mélange gazeux pénétrant dans la chambre de mesure est ajustée à la valeur souhaitée par un injecteur à CO_2 (Li-CorInc., Lincoln, NE, USA) qui utilise comme source des cartouches sous haute pression de CO_2 liquéfié. Les mesures ont été réalisées en utilisant une concentration de $400 \mu\text{mol CO}_2.\text{mol air}^{-1}$. L'humidité relative a été maintenue à $50 \pm 5 \%$ par passage sur du sulfate de calcium anhydre. La température des feuilles, maintenues entre $20 - 25 \text{ }^\circ\text{C}$, est mesurée par un thermocouple et la température de la chambre contrôlée par deux refroidisseurs thermoélectriques à effet Peltier. L'intensité lumineuse a été mesurée au niveau de l'échantillon par un détecteur de lumière à diode de silicone. Au cours de l'expérimentation, l'éclairage de la feuille est de $400 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, il est assuré par le module LI- 6400-02 LED (Light Emitting Diode, Lincoln, NE, USA).



Figure 12 : Présentation du Licor 6400. Cet instrument est composé d'une console (conditionnement des gaz), et d'une tête (comprenant la chambre foliaire et les IRGA).Source : Licor, notice technique

Au cours d'une mesure, l'analyseur enregistre régulièrement le flux de la pompe et les variations des taux de CO_2 et d' H_2O sont calculées selon les équations de von Caemmerer et Farquhar (1981). Les mesures sont réalisées en continu sur des feuilles saines pris au hasard ($n=7$, une mesure par plante) pour chaque traitement.

2.4. 4. Mesure de la fluorescence chlorophyllienne

La mesure de la fluorescence des chlorophylles *a* permet de quantifier les activités des systèmes photosynthétiques, traduisant l'état physiologique de la partie aérienne de la plante.

Principe

Lorsqu'un quanta d'énergie lumineuse est absorbé par une molécule de chlorophylle, la totalité de cette énergie est transférée à ses électrons de valence. Ces électrons « excités » retournent à leur état initial en libérant l'énergie absorbée de trois manières : photochimie (P), dissipation sous forme de chaleur (H) et réémission de fluorescence (F). Comme ces trois phénomènes entrent en compétition, la mesure de la fluorescence chlorophyllienne peut donner des informations sur les deux autres processus (Maxwell et Johnson, 2000). Cette relation peut s'écrire :

$$P + H + F = 1$$

A température ordinaire, l'émission de la fluorescence chlorophyllienne provient essentiellement de l'antenne collectrice du photosystème II dont le cœur est constitué par un dimère de chlorophylle *a* nommé P680. Le photosystème II existe sous deux états fluorescents : peu fluorescent à l'état ouvert et fortement fluorescent à l'état fermé. La fluorescence de l'état ouvert correspond à la faible émission liée au transfert d'excitons dans les antennes. L'excitation provoquée par les photons dans les antennes est transmise par résonance de pigments et pigments, jusqu'au centre réactionnel ; l'excitation non transmise est émise sous forme de chaleur et de fluorescence. Dans l'état fermé, l'arrivée d'un exciton dans le centre réactionnel du PSII conduit à une réémission de l'énergie non utilisée sous forme de chaleur et de fluorescence qui rendent compte de la quantité d'énergie normalement transformée par l'activité photochimique (Whitmarsh et Govindjee, 1999). La feuille est dans un premier temps maintenue à l'obscurité afin que tous les centres soient ouverts, puis elle est éclairée par une lumière modulée de très faible intensité. La fluorescence augmente jusqu'au niveau F₀, niveau auquel le rendement de fluorescence est minimal, la fluorescence ainsi détectée correspond à 100 % de centres ouverts car la probabilité pour un photon de lumière modulée de trouver des centres fermés est négligeable. Un flash de lumière saturante est appliqué ensuite sur la feuille pendant 0,5 à 1 seconde. Ce flash a la capacité de fermer tous les centres du PSII. L'émission de fluorescence mesurée atteint son maximum F_m, avant de diminuer rapidement au niveau F₀. La plastoquinone A oxydée (PQA oxydé)

est responsable du caractère ouvert du PSII, elle est qualifiée de composé extincteur ou « *quencheur* » de fluorescence.

Le quenching correspond à l'extinction de fluorescence par rapport à l'état fortement fluorescent observée lorsque les centres sont fermés. L'éclairage de la feuille avec de la lumière actinique provoque une augmentation rapide de l'émission de fluorescence suivie de sa diminution vers une valeur stationnaire F_s , supérieure à F_0 du fait de la fermeture d'un certain nombre de centres. Des éclairs saturants peuvent être appliqués sur la feuille fermant 100 % des centres pour déterminer le rendement maximal de fluorescence sous éclairage appelé F_m' (Le ' signifie que la mesure a été réalisée pendant une période d'éclairage). La valeur F_m' est toujours inférieur au F_m , cela met en évidence l'existence d'un quenching non-photochimique, NPQ.

La différence de fluorescence $F_m - F_0$ est appelée fluorescence variable, F_v .

Calcul des différents paramètres déterminés par fluorescence

La mesure de la fluorescence chlorophyllienne peut donner des informations sur la photochimie et la dissipation d'énergie sous forme de chaleur, en effet ces trois phénomènes entrent en compétition pour l'utilisation de l'énergie d'excitation reçue par les chlorophylles (Maxwell et Johnson, 2000). Cette relation peut s'écrire :

$$P + H + F = 1$$

Lorsque l'intensité lumineuse augmente, P diminue alors que H et F augmente, si la plante est soumise à une lumière saturante, H et F atteignent leur valeur maximale et P devient nulle :

$$H_m + F_m + 0 = 1$$

$$H_m = 1 - F_m$$

Le rapport entre la dissipation de l'énergie sous forme de chaleur ou de rémission de fluorescence est constant.

$$H/F = H_m/F_m$$

$$H = F (1 - F_m)/F_m$$

La photochimie peut donc être quantifiée par la relation suivante :

$$P = (F_m - F)/F_m$$

Estimation du rendement quantique de la photochimie du PSII (Genty et al., 1989), 1989), Φ_{PSII} , sous éclairage

$$\Phi_{PSII} = (F_m' - F_s)/F_m'$$

Chez les plantes bien adaptées à l'obscurité, la valeur de Φ_{PSII} est comprise entre 0,83 et 0,8. Il existe une forte corrélation entre le Φ_{PSII} et l'efficacité de l'assimilation du CO_2 (Maxwell et Johnson, 2000).

Détermination du rendement quantique maximum de la réaction de photochimique du PSII, F_v/F_m

Ce rapport est au maximum de 0,83 chez les plantes supérieures chez lesquelles le PSII n'a pas subi d'altération. La quantité maximale d'électrons émise par un centre du PSII ayant reçu un exciton est de 0,83 électron (Maxwell et Johnson, 2000).

Estimation du quenching non-photochimique, Φ_{NPQ}

$$\Phi_{NPQ} = (F_s/F_m') - (F_s/F_m)$$

Lorsqu'un éclairage continu est fourni pendant une période prolongée, un gradient transmembranaire de protons s'établit dans les thylacoïdes, entre le lumen et le stroma. Ce gradient est utilisé pour la synthèse d'ATP dans le stroma des chloroplastes. Les pH bas rencontrés dans le lumen augmentent la déperdition d'énergie excitonique au niveau des antennes du PSII sous forme de chaleur, il en résulte une diminution de la capacité à expulser des électrons par les centres réactionnels du PSII. Le rendement quantique de la fourniture d'électrons par la réaction photochimique chute (Saccardy et al., 1998). Ce phénomène se traduit par une extinction de la fluorescence des centres fermés ou ouverts.



Figure 13 : Mini-PAM Fluorometer

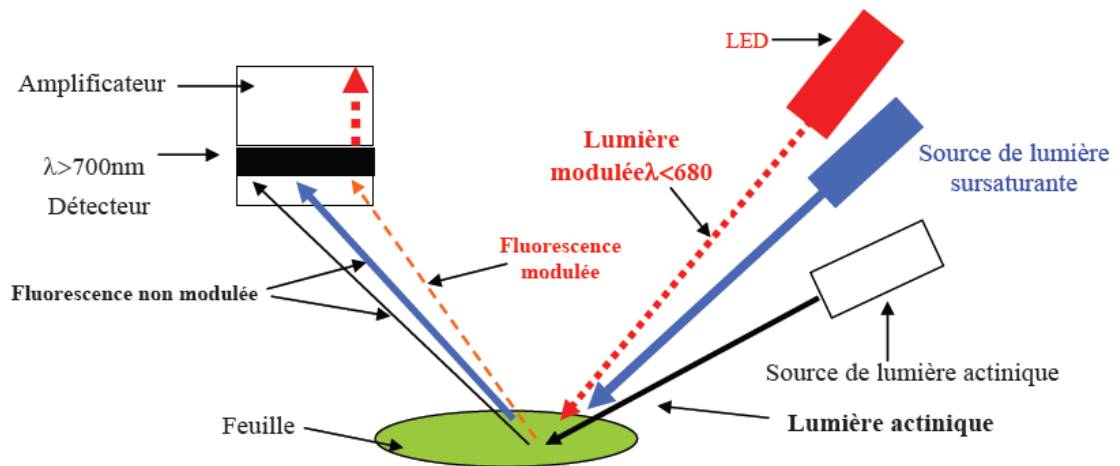


Figure 14 : Schéma de la technique de mesure de l'émission de la fluorescence modulée de la chlorophylle d'une feuille. La lumière modulée émise par une LED à une longueur d'onde inférieure à 680 nm. Il lui correspond une fluorescence modulée qui, seule, est amplifiée par un amplificateur sélectif accordé sur la fréquence de modulation de la lumière modulée. La lumière actinique produit aussi une émission de fluorescence par la feuille. Cette émission n'est pas amplifiée. Une

source de lumière sursaturante non modulée ferme tous les centres et produit aussi de la fluorescence non modulée qui n'est donc pas amplifiée. La lumière sursaturante est aussi une lumière actinique (Rzigui, 2011).

Mode opératoire

La fluorescence chlorophyllienne est mesurée *in vivo* au moyen d'un système de mesure (Mini-PAM, Heinz Walz, Germany) (**Figure 13**). Un ensemble de fibres optiques permet d'additionner sur un même échantillon des éclairagements provenant de plusieurs sources. Le système de mesure repose sur l'utilisation d'une lumière continue de très faible intensité, lumière actinique, et d'une lumière modulée, flash de lumière sursaturante. Un dispositif de filtres permet de limiter l'amplification et l'enregistrement de la lumière uniquement à celle qui est modulée (**Figure 14**).

Toutes les mesures sont effectuées sur la face supérieure dans la partie centrale des feuilles. Les feuilles sont adaptées à la lumière et à l'obscurité pour mesurer les différents paramètres de la fluorescence chlorophyllienne à l'aube (stable, $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ éclairage ambiant) et après midi ($1600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) afin de déterminer si la concentration du Cd affecte la sensibilité des plantes à la photoinhibition.

Les feuilles sont adaptées à l'obscurité pendant 30 min, en utilisant des clips de feuilles conçus à cet effet. F_0 est mesurée en utilisant une impulsion modulée ($<0.05 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ pour $1.6 \mu\text{s}$), qui est trop faible pour induire des changements physiologiques significatifs dans la plante. F_m est mesuré après l'application d'une impulsion de lumière actinique saturant de ($18,000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ pour 0.7 s). Les valeurs de fluorescence variable F_v et du rendement quantique maximal du photosystème II sont calculées à partir de F_0 à F_m .

Les mêmes feuilles pour chaque plante sont utilisées pour mesurer les paramètres adaptés à l'éclairage. Le rendement de la fluorescence stationnaire F_s est enregistré après adaptation des plantes à l'éclairage ambiant pendant 30 min. Ensuite une impulsion de lumière actinique saturant de $10,000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ for 0.7 s est appliquée pour produire le rendement de fluorescence maximale (F_m').

La photoinhibition chronique (PI_{chr}) et dynamique (PI_{dyn}) sont calculées selon (Werner et al., 2002) comme suite :

$$PI_{chr} = [(F_v/F_m)_{\max} - (F_v/F_m)_d] (F_v/F_m)_{\max} \times 100$$

$$PI_{dyn} = [(F_v/F_m)_d - (F_v/F_m)_{\text{mid}}] (F_v/F_m)_{\max} \times 100$$

Où $(F_v/F_m)_d$ et $(F_v/F_m)_{\text{mid}}$ sont les valeurs à l'aube et à midi de F_v/F_m , respectivement.

$(F_v/F_m)_{\max}$ est la valeur maximal de F_v/F_m , qui est calculée comme la moyenne des témoins à l'aube dans le jours qui suit le traitement par le Cd.

Pour chacun de ces paramètres, les mesures sont réalisées sur 7 individus avec une analyse par plante pour chaque traitement.

2.4. 5. Mesure de la fuite d'électrolytes

L'estimation de la fuite d'électrolytes se fait par mesure de la conductivité à l'aide d'un conductimètre portable (HI9033, HANNA) selon le protocole de Dionisio-Sese et Tobita (1998). 200 mg de feuilles fraîches sont coupées en petits pièces et placées dans un tube à essai contenant 10 ml d'eau ionisée. Une incubation sous agitation continue est réalisée pendant 2 h à 32°C et une première lecture de la conductivité est réalisée (EC1). Une deuxième lecture (EC2) est effectuée sur les mêmes échantillons préalablement autoclavés pendant 20 minutes à 121°C et laissés refroidis jusqu'à 25°C. L'ébullition détruit les cellules qui vont alors déverser leur contenu total en électrolytes. Cette deuxième série de lecture correspond à 100% de fuite d'électrolytes. La fuite d'électrolytes (EL) est calculée comme suite :

$$EL = (EC1/EC2) \times 100$$

2.5. Analyses des biomarqueurs biochimiques

2.5.1. Dosage des pigments chlorophylliens

Le contenu en pigments est très sensible aux changements environnementaux. En particulier, la toxicité des métaux lourds réduit la teneur en pigment dans les plantes. Par conséquent, l'analyse des teneurs en pigment est couramment utilisée pour surveiller le stress métallique dans les plantes. 100mg des feuilles sont immergées dans 5 ml d'acétone 80% puis homogénéisé à l'aide d'un homogénéisateur portatif de laboratoire. Ensuite, le mélange est centrifugé pendant 10min à une vitesse de 15000 rpm. Le surnageant est récupéré, puis 1 ml du surnageant est ajouté à 2 ml d'acétone 80% et la densité optique est ensuite mesurée au spectrophotomètre aux longueurs d'onde 663,2, 646,8 et 470 nm. Les concentrations en chlorophylles a et b et en caroténoïdes sont

déterminées à l'aide des équations proposées par Lichtenthaler (1987). Les résultats sont exprimés en mg/g MF.

$$\text{Chlorophyll a} = 12.25 * \text{Abs } 663.2 - 2.798 * \text{Abs } 646.8$$

$$\text{Chlorophyll b} = 21.5 * \text{Abs } 646.8 - 5.1 * \text{Abs } 663.2$$

$$\text{Total chlorophyll} = 7.15 * \text{Abs } 663.2 + 18.71 * \text{Abs } 646.8$$

$$\text{Carotenoids} = (1000 * \text{Abs } 470 - 1.82 * \text{chlorophyll a} - 85.02 * \text{chlorophyll b})/198$$

Le contenu en chlorophylle est exprimé en μg de pigment par mg de matière fraîche des feuilles de ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ MF).

2.5.2. Activités enzymatiques antioxydantes

A la fin de l'expérience (22 jours), l'effet du Cd sur les activités enzymatiques antioxydantes dans les feuilles d'*A. halimus* est mesuré.

2.5.2.1. Extraction et dosage des protéines solubles

Quelques feuilles fraîches sont broyées dans l'azote liquide, ensuite 500 mg de poudre sont homogénéisés à l'aide d'un homogénéisateur de laboratoire avec 8 ml de tampon d'extraction contenant, 50 mM phosphate de sodium (pH 7.6) avec 0.1 mM EDTA. L'homogénéisat est ensuite centrifugé à 8923 rpm pendant 20 min à 4 °C. Le surnageant est conservé à l'azote liquide, jusqu'à le dosage des protéines et des activités enzymatiques.

Le dosage des protéines est effectué selon la méthode de Bradford (1976). Cette méthode mesure la concentration protéique basée sur une réaction colorimétrique entre les protéines et le colorant bleu de Coomassie G250. On ajoute 5 μL d'extrait protéique à 200 μL de réactif de Bradford et 795 μL de tampon phosphate (pH 7,8). Puis on effectue la lecture d'absorbance à 595 nm au spectrophotomètre Beckman DU 640B. Le blanc est fait sur un échantillon auquel on n'ajoute pas d'extrait protéique. La concentration en protéines de l'échantillon est déterminée à l'aide d'un courbe étalon réalisé dans les mêmes conditions avec des échantillons d'albumine sérique bovine (BSA) de concentrations connus (0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 et 1 mg/mL).

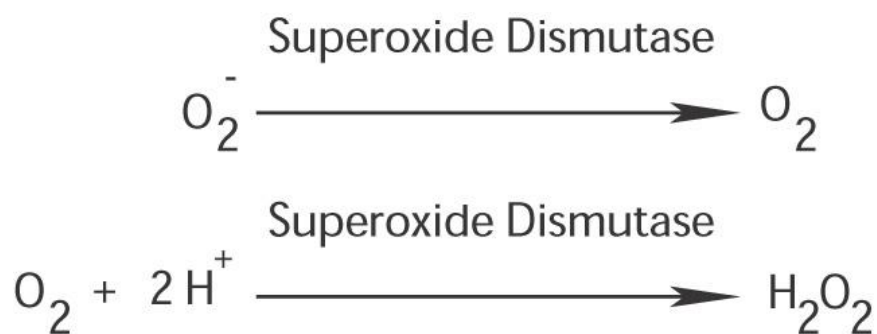
2.5.2.2. Dosage de l'activité de la Superoxyde Dismutase (SOD - CE

1.15.1.1)

La méthode utilisée est celle de Marklund et Marklund (1974). Cette méthode repose sur l'inhibition de l'autooxydation du pyrogallol par la SOD. Le pyrogallol est

une substance blanche, qui après autooxydation forme de diverses substances de couleurs marron.

Le principe du dosage est basé sur une compétition entre la réaction d'oxydation du pyrogallol par $O_2^{\cdot -}$ et la dismutation de $O_2^{\cdot -}$ par la SOD. L'activité de la SOD est donc quantifiée en fonction du degré d'inhibition de la réduction du pyrogallol.



Le mélange réactionnel (1 ml) contient 550 μ L tampon phosphate de sodium (50 mM, pH 7,6), 360 μ L d'eau Mili-Q et 10 μ L d'extrait protéique. La réaction est démarrée avec l'addition de 80 μ L pyrogallol (3 mM). Une activité enzymatique est définie comme la quantité d'enzyme capable d'inhiber 50% de l'autooxydation du pyrogallol. Le teste de l'autooxydation du pyrogallol est réalisé sans extrait protéique.

Calcul de l'activité enzymatique : Avec la valeur obtenue dans lecture à 325 nm de la solution substrat et sur l'échantillon, nous pouvons calculer le pourcentage d'inhibition de la réduction du pyrogallol pour la SOD.

$$\% \text{ Inhibition} = [(dAbs_{325/min})_{\text{contrôle}} - (dAbs_{325/min})_{\text{échantillon}}] / (dAbs_{325/min})_{\text{contrôle}} \times 100$$

$(dAbs_{325/min})_{\text{contrôle}}$: différence de absorbance par minute avec le pyrogallol

$(dAbs_{325/min})_{\text{échantillon}}$: différence de absorbance pour minute avec le pyrogallol et échantillon

L'activité de l'enzyme SOD est calculée en utilisant la formule suivante:

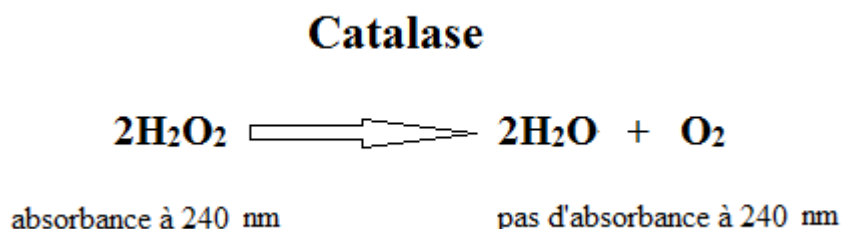
$$U \text{ SOD /ml} = (\% \text{ inhibition} / 50 \text{ VE}) f$$

VE = volume échantillon utilisé pour faire mesure en μ L

f = facteur de dilution utilisé, si provisoirement nous avons besoin de dilué

2.5.2.3. Dosage de l'activité de la Catalase (CAT - CE 1.11.1.6)

L'activité de la catalase est déterminée par la méthode décrite par Teranishi et al (2014). Cette méthode est basée sur la mesure de la disparition du peroxyde d'hydrogène du fait de l'activité de la catalase selon la réaction suivante :



Le mélange réactionnel est composé de 890 μL de tampon phosphate de sodium (50 mM, pH 7,0), 100 μL de l'extrait de feuille et 10 μL H_2O_2 (15%). L'activité enzymatique est calculée comme étant la diminution de l'absorbance à 240 nm en utilisant le coefficient d'extinction molaire de H_2O_2 ($39,4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Une unité de l'enzyme est définie comme la quantité nécessaire pour décomposer 50% de H_2O_2 pendant 60 s.

Calcul de l'activité enzymatique :

$$\mu\text{moles } \text{H}_2\text{O}_2/\text{min}/\text{mg protéine} = ((\text{Pente} \times \varepsilon) \times 1000 \times V_r) / (C \times V_s)$$

Pente = $d\text{Abs}_{240} / \text{min}$: différence d'absorbance par minute

ε : Coefficient d'extinction de H_2O_2 ($36 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

V_r : Volume de la réaction (ml)

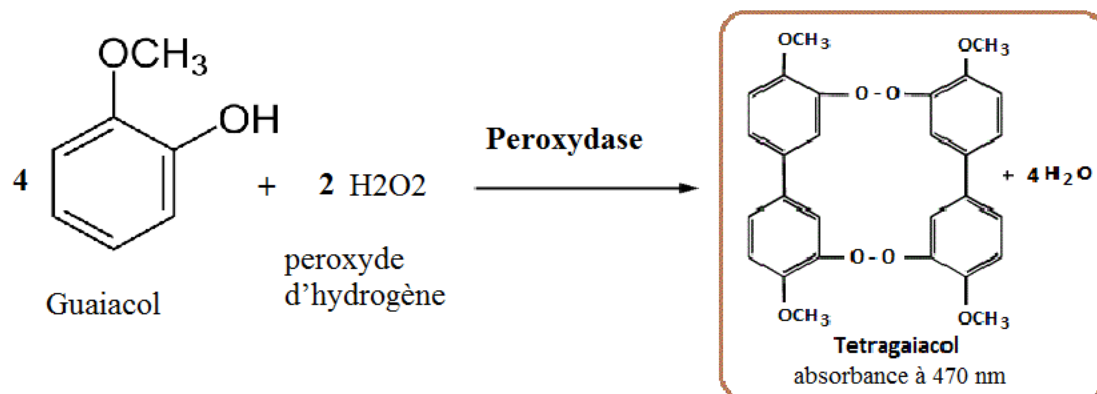
C : Concentration en protéines de l'échantillon (mg/ml)

V_s : volume de l'extrait protéique (ml)

2.5.2.4. Dosage de l'activité de la Guaiacol Peroxydase (GPx -

CE1.11.1.7)

La méthode utilisée a été rapportée par Zhou et al (1997). Le principe de la détermination de cette enzyme réside dans l'utilisation du peroxyde d'hydrogène pour former un produit coloré en présence du guaiacol qui est dosé à 470 nm.



La mesure est réalisée dans un volume d'échantillon contenant 40 μg de protéine, qui est ensuite ajouté dans un volume de tampon d'acétate de sodium 50 mM (pH 5,0) pour un volume final de 900 μL . Dans ce mélange, on ajoute 100 μL de guaiacol 2% puis 10 μL de H_2O_2 . L'évolution de l'absorbance par minute est mesurée à 470 nm après un temps d'attente de 5 sec. Le blanc est effectué sur le même mélange sans ajout d'extrait protéique

Le mélange réactionnel (1 ml) contenant 590 μL de tampon phosphate de sodium (50 mM, pH 7,0), 200 μL de H_2O_2 (50 mM) et 10 μL d'extrait de protéine. La réaction est initiée avec l'addition de 200 μL de guaiacol (20 mM). L'augmentation de l'absorbance est surveillée pendant 2 min à 470 nm, et une unité d'activité enzymatique est définie comme la quantité d'enzyme qui catalyse la conversion d'une μmole de H_2O_2 dans du 60 (coefficient d'extinction du guaiacol, $\epsilon = 26,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

Calcul de l'activité enzymatique :

$$\text{Abs } 470/\text{min.}/\text{mg protéine} = (\text{dAbs}_{470}/\text{min}) \cdot V_r / C$$

$\text{dAbs}_{470}/\text{min}$: différence d'absorbance pour minute (pente de la droite de linéarisation)

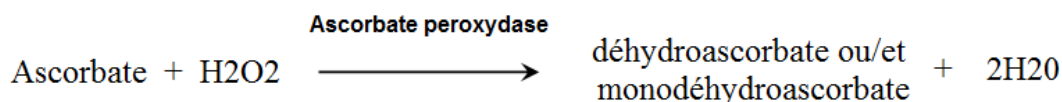
V_r : Volume de la réaction (ml)

C : Concentration en protéines de l'échantillon (mg/ml)

2.5.2.5. Dosage de l'activité de l'ascorbate peroxydase (APX-

EC1.11.1.11)

L'APX catalyse la peroxydation de l'ascorbate en monodéhydroascorbate (MDA). La mesure de l'activité de cette enzyme est basée sur la consommation d'ascorbate en présence de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (Nakano and Asada, 1981).



La cinétique enzymatique est suivie par spectrophotométrie à 290 nm pendant 3min. La diminution de l'absorbance de l'ascorbate représente l'activité de l'ascorbate peroxydase. Pour cela, le milieu réactionnel contenant du tampon phosphate de potassium 50 mM à pH 7,5, H₂O₂ 0,5 mM et 100 µL de l'extrait des feuilles est placé dans une cuve en quartz thermostatée à 25 °C. L'ajout de 50 µL d'ascorbate 250 mM déclenche la réaction. Toutes les solutions nécessaires à ce dosage sont préparées dans du tampon phosphate de potassium 50 mM, pH 7,5. L'étalonnage à 290 nm est réalisé avec le tampon contenant de H₂O₂ 0,5 mM. Pour quantifier une éventuelle réaction non-enzymatique, une cinétique de dégradation de l'ascorbate par H₂O₂ est réalisée.

Une unité spécifique d'APX est définie comme la quantité d'enzyme nécessaire pour consommer une µmol d'ascorbate par mg de protéines pendant 1 min.

2.5.3. Dosage du cadmium et éléments minéraux dans la plante

A la fin de l'expérience (23jours), les plantules sont récoltées et séparées en deux fractions distinctes (racines et tiges avec feuilles). Ils sont ensuite mis à sécher dans une étuve à 65 °C jusqu'à ce que la perte de masse soit inférieure à 5 % en 24 h (environ 72 heures de séchage).

Les échantillons secs sont ensuite broyés à l'aide d'un broyeur, puis sont passés à travers d'un tamis jusqu'à obtenir des particules de diamètre inférieur à 500 µm.

La minéralisation est réalisée sur au moins 0,2 g de matière sèche. Le matériel végétal broyé est pesé avec précision et introduit dans un matras avec 5 mL d'acide nitrique à 68 % et 5 mL de peroxyde d'hydrogène à 30 %. L'échantillon est laissé dégazer 12 h sous hotte aspirante puis chauffé à 95 °C pendant 1 h puis à 150 °C pendant 2 h. Après refroidissement, l'échantillon est filtré sur papier Whatman (filtre papier Whatman 50 plat, 110 mm) et transféré dans une fiole jaugée de 50 mL complété au trait de jauge à température ambiante avec de l'eau ultra pure. La solution est

transvasée dans un tube de 50 mL et conservée à 4°C. Un blanc est réalisé pour chaque série de minéralisation.

Le Cd et les éléments minéraux (Na, K, Mg, Ca, Fe, Zn, Mn et P) sont mesurés à l'aide d'un spectrophotomètre ICP (inductively coupled plasma ARL-Fison 3410, USA). Les teneurs en azote et en carbone totaux sont déterminées à l'aide d'un analyseur élémentaire (Leco CHNS-932, Spain).

2.5.4. Facteur de translocation et bioaccumulation et teneur en ETM

Le facteur de translocation (TF) est le rapport entre la concentration en ETM dans les parties aériennes et la concentration en ETM dans les racines (McGrath et Zhao, 2003). Cependant, le facteur de bioaccumulation (BF) est le rapport entre la concentration en ETM dans les parties aériennes et la concentration en ETM dans la solution (Chen et al., 2011). Ils sont calculés selon l'équation suivante:

$$TF = [Cd] PA / [Cd] PR$$

$$BF = [Cd] PA / [Cd] solution,$$

Où : [Cd] PA représente la concentration en cadmium dans les parties aériennes (mg.kg⁻¹ de matière sèche (MS))

[Cd] PR la concentration en cadmium dans les parties racinaires (mg.kg⁻¹ de matière sèche (MS))

La quantité d'extraction des métaux (MEA) est défini comme le produit de la concentration en ETM dans les parties aériennes ou les racines (µg/g MS) et la biomasse des parties aériennes ou les racines (g/plante)(Amer et al., 2013).

$$MU (\mu\text{g/plant}) = (\mu\text{g metal/mg parties aériennes or racines MS}) \times (\text{g parties aériennes or racines MS par plant})$$

2.6. Analyse statistiques

Toutes les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel SPSS version 17 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Les analyses sont effectuées sur les feuilles de même âge et les données ont été analysées statistiquement soit par ANOVA 1 ou deux facteurs. Le teste de tukey a été appliqué pour déterminer les différences entre les moyennes. Le seuil de signification a été choisi à p = 0,05.

3. Résultats

Dans le deuxième chapitre de notre travail, nous avons essayé de mettre en évidence les modifications morphologiques, physiologiques et biochimiques de jeunes plantes d'*A. halimus* traitées par 0, 50, 200, 400, 650 et 1350 μM de CdCl_2 pendant 23 jours. Notre étude a porté sur la caractérisation des symptômes d'intoxication, l'effet du stress de Cd sur l'expansion foliaire, sur la biomasse fraîche et sèche. La réponse physiologique est basée principalement sur les échanges gazeux et la fluorescence chlorophyllienne.

Nous nous sommes intéressés aussi à l'étude de l'effet du Cd sur les pigments photorécepteurs et la réponse antioxydante.

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

3.1. Effet du cadmium sur la survie des plantules

Après 23 jours de traitement, 22% des plantules sont morts à 400 et 650 μM Cd, alors que toutes les plantules traitées par 1350 μM Cd n'ont pas survécu jusqu'à la fin de l'expérience, en conséquent, les différentes analyses biochimiques et physiologiques ne sont pas effectuées pour cette concentration.

3.2. Effet du cadmium sur la production en biomasse des plantules

Le poids sec des tissus aériens (PSA) et racinaires (PSR) (**Figure 15. A**) et le poids frais des tissus aériens (PSP) et racinaires (PSR) diminuent significativement avec l'augmentation de la concentration du Cd dans le milieu (**Figure 16**) ($P < 0.05$). Cette diminution se traduit par une baisse de 70% du taux relative de la croissance (RGR) (**Figure 15. C**). Les feuilles sont également affectées par le Cd, par conséquent, le nombre de feuilles vivantes diminue et le nombre des feuilles mortes augment significativement en réponse à l'accroissement de la concentration du Cd dans le milieu de culture (**Figure 18**). En parallèle, la surface des feuilles diminue significativement avec l'accroissement de la dose du Cd ce qui affecte négativement la surface spécifique des feuilles (SLA) (**Figure 15. D** et **Figure 16**). La couleur des feuilles est également influencée et de visibles chloroses sont apparues à partir de 200 μM Cd et devenues plus

claires à 400 et 650 μM Cd (**Figure 17**). Finalement, la hauteur des tiges diminue significativement sous l'effet du Cd (**Figure 15.B**).

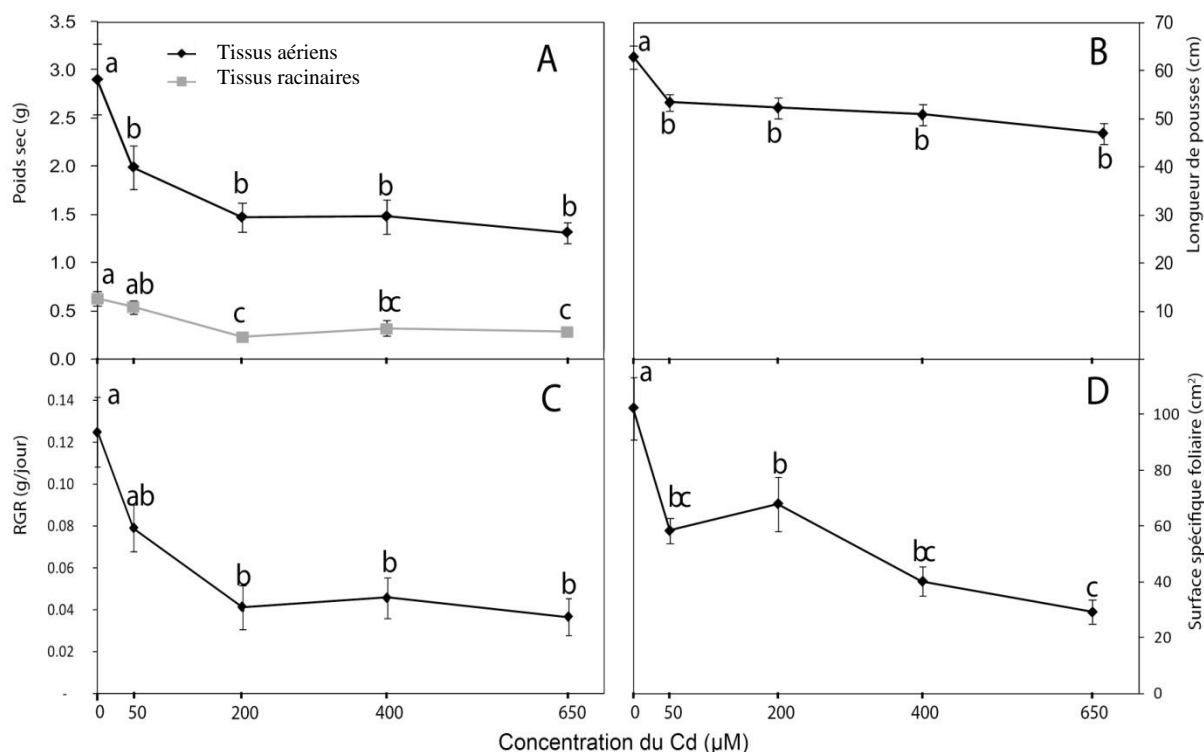


Figure 15 : poids sec (A), longueur des tiges (B), vitesse relative de croissance, RGR (C), et surface spécifique foliaire (D) d'*Atriplex halimus* L. après 22 jours de traitement avec différentes concentrations du Cd. Chaque valeur représente la moyenne de sept répétitions \pm SE. Pour chaque paramètre, les petites lettres différentes indiquent une différence significative (test de Tukey, $P < 0.05$).

3.3. L'effet du stress du Cd sur les échanges gazeux

Les valeurs de la photosynthèse nette (A_N) sont inférieures à la limite à 650 μM Cd, pour cette raison les paramètres des échanges gazeux à cette concentration ne sont pas effectués.

La conductance stomatique (g_s) rend compte du degré d'ouverture de l'ostiole, paramètre essentiel pour évaluer les échanges gazeux au niveau du couvert végétal et notamment l'entrée de CO_2 dans les cellules du mésophile où il sera assimilé sous forme de glucides. Le degré d'ouverture des stomates module donc la concentration interne en CO_2 et les pertes en eau de la plante par transpiration. Les différents paramètres liés aux

échanges gazeux sont déterminés au moyen d'un système (Li-6400-40, Li-COR Inc., Lincoln, NE, USA) qui mesure les variations de concentrations en CO₂ et en vapeur d'eau. La conductance stomatique diminue de manière significative avec l'augmentation de la concentration du Cd dans le milieu (gs $r = -0.63$; $P < 0.01$, **Figure 19. B**).

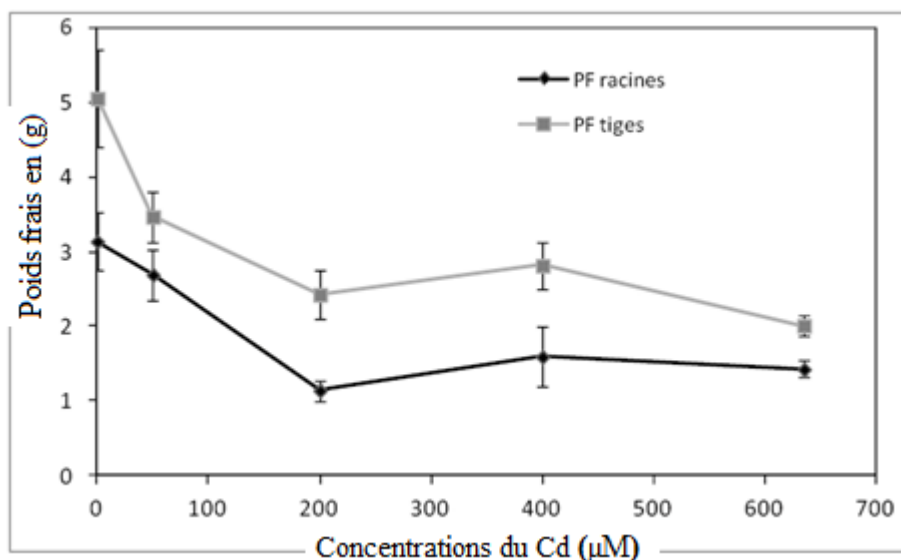


Figure 16 : Poids frais (PF) des tiges et des racines d'*Atriplex halimus* L. après 22 jours de traitement avec différentes concentrations du Cd. Chaque valeur représente la moyenne de sept répétitions \pm SE. Pour chaque paramètre, les petites lettres différentes indiquent une différence significative (test de Tukey, $P < 0.01$).



Figure 17 : l'effet du cadmium sur la morphologie des feuilles d'*Atriplex halimus* L.

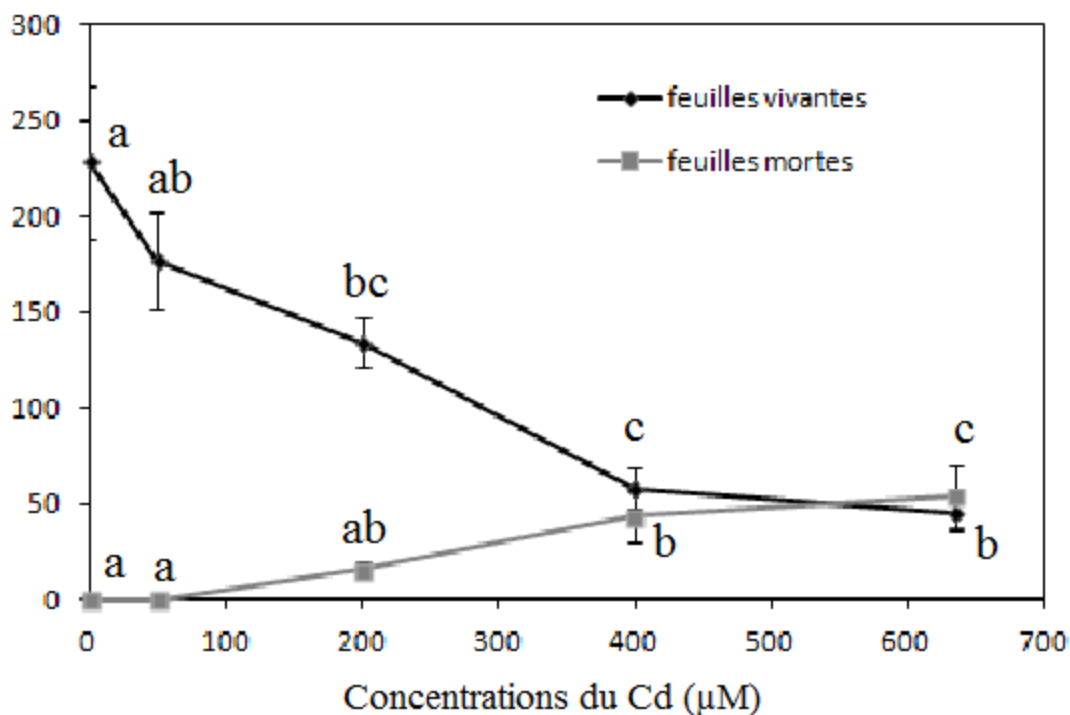


Figure 18. Nombre de feuilles vivantes (A) et mortes (B) chez *Atriplex halimus* L. après 22 jours de traitement avec différentes concentrations du Cd. Chaque valeur représente la moyenne de sept répétitions \pm SE. Pour chaque paramètre, les petites lettres différentes indiquent une différence significative (test de Tukey, $P < 0.05$).

La concentration interne en CO_2 (C_i), également nommée concentration en CO_2 intercellulaire ou sous-stomatique est notamment liée au degré d'ouverture des stomates (**Figure 19. C**). Ce paramètre n'est pas directement mesuré mais calculé à partir des données de la conductance stomatique, de transpiration et d'assimilation nette. Le Cd provoque une augmentation de la concentration interne en CO_2 , néanmoins, cette élévation n'est pas significative ($P > 0.05$).

L'assimilation nette de CO_2 (A_N) est calculée par le Li-COR à partir de la différence des concentrations en CO_2 mesurées à l'entrée et à la sortie de la chambre de mesure. Une corrélation négative et significative est observée entre l'assimilation nette de CO_2 et le Cd (A_N ; $r = -0.76$, $P < 0.01$, **Figure 19. A**).

Finalement, l'efficacité de l'utilisation de l'eau intrinsèque (iWUE) est calculée à partir le rapport entre l'assimilation nette de CO_2 et la conductance stomatique. Ce

paramètre tend à diminuer avec l'augmentation du Cd, cependant cette diminution n'est pas significative ($r = -0.40$, $P < 0.01$, **Figure 19. D**)

3.4. L'effet du stress du Cd sur le contenu en pigments

La (**Figure 20**) représente la teneur de différents pigments photorécepteurs: chlorophylle a (Chl a), chlorophylle b (Chl b) et caroténoïdes (Cx +c) des feuilles de plantules d'*A. halimus* témoins et traitées par le Cd durant 22 jours.

Nous avons noté une énorme réduction (moins de 50%) à 50 μM Cd de la Chl a, Chl b et (Cx+c) (**Figure 20**). Au-delà de 50 μM Cd, la teneur de pigments reste inchangée pour la Chl a, alors que une légère diminution a été remarquée pour la Chl b et les caroténoïdes (**Figure 20. B et C**).

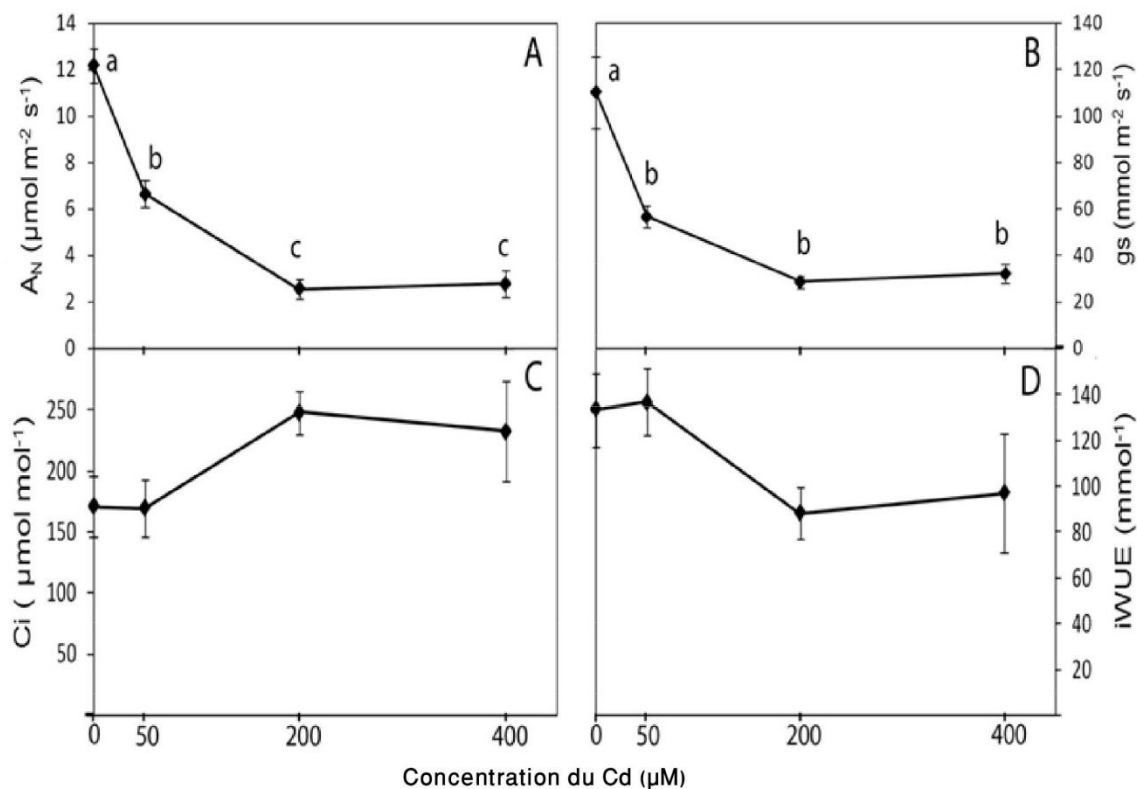


Figure 19 : (A) photosynthèse nette (A_N), (B) conductance stomatique (g_s), (C) concentration intercellulaire en CO_2 (C_i) et (D) Efficiencia de l'utilisation de l'eau intrinsèque ($iWUE$) d'*Atriplex halimus* L. après 22 jours de traitement avec différentes concentrations du Cd. Chaque valeur représente la moyenne de sept répétitions \pm SE. Pour chaque paramètre, les petites lettres différentes indiquent une différence significative (test de Tukey, $P < 0.05$).

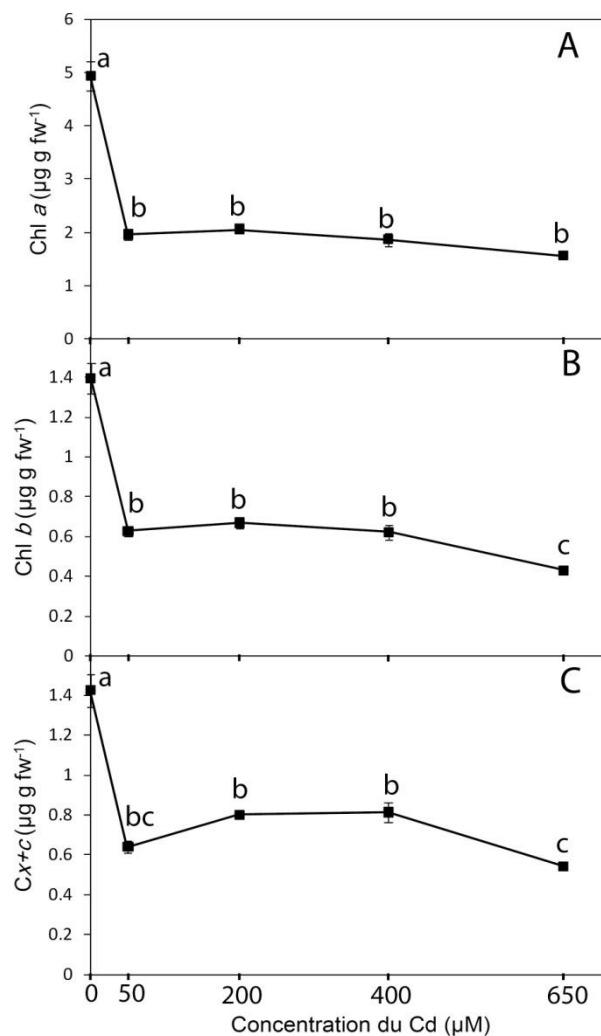


Figure 20 : (A) Chlorophylle *a* (Chl *a*), (B) chlorophylle *b* (Chl *b*) et (C) caroténoïdes (Cx+c) d'*Atriplex halimus* L. après 22 jours de traitement par différentes concentrations du Cd. Chaque valeur représente la moyenne de cinq répétitions \pm SE. Pour chaque paramètre, les petites lettres différentes indiquent une différence significative (test de Tukey, $P < 0.05$).

3.5. Effet du stress du Cd sur la fluorescence chlorophyllienne

Le rendement quantique maximum de la réaction photochimique au niveau du photosystème II (PSII) est évalué par le rapport Fv/Fm. Une chute de Fv/Fm traduit l'inactivation voire la destruction des photosystèmes II ou plus globalement une altération non réversible de la chaîne photosynthétique du transport des électrons (Adams et al., 2006). Lorsque le photosystème II n'est pas altéré le Fv/Fm moyen des plantes supérieures est proche à 0,83 (Maxwell et Johnson, 2000). Dans cette étude, la valeur moyenne de Fv/Fm des plantes témoins est égale à de 0,8. Cette valeur diminue

légèrement, mais significativement soit à midi ou à l'aube, avec l'augmentation de la concentration du Cd (midi: $r = -0,48$, $P < 0,01$; l'aube: $R = -0,47$, $P < 0,01$, **Figure 21**). Les valeurs les plus faibles de F_v/F_m (33%) et (23%) ont été enregistrées à 400 μM Cd à la fois pour le midi et l'aube, respectivement. En outre, les valeurs de F_v/F_m à midi sont toujours inférieures à celles à l'aube, cette différence est principalement due à un rendement de fluorescence maximal (F_m) inférieure à midi qu'à l'aube.

Le rendement quantique de la réaction photochimique du PSII (Φ_{PSII}) représente le rapport entre le flux de photons absorbé par le photosystème II et le flux d'électrons issu de l'activité de ce même photosystème. Il permet donc de déterminer la fraction de l'énergie absorbée qui est réellement utilisée par la photochimie. En conséquence, il peut rendre assez bien compte de la production de NADPH, H^+ d'une part et de « l'efficacité globale » de la photosynthèse d'autre part. Le rendement quantique de la réaction photochimique du PSII mesuré à l'aube montre la même réponse que le rendement quantique maximal du photosystème II, F_v/F_m (l'aube: $r = -0,51$, $P < 0,01$, **Figure 21. B.**). de la même façon, les valeurs du Φ_{PSII} à midi diminue de manière significative en réponse du Cd ($P < 0,05$), néanmoins, ces valeurs de Φ_{PSII} sont nettement inférieures par rapport à celle de l'aube ($p < 0,0001$; **Figure 21. B.**).

Une augmentation du quenching non-photochimique (Φ_{NPQ}) peut rendre compte de 3 mécanismes susceptibles de limiter la fourniture d'excitons au centre réactionnel du PSII : (i) la dissipation de l'énergie d'excitation sous forme de chaleur au niveau des antennes du PSII (qE) ; (ii) la diminution de la taille de l'antenne externe du PSII (consécutivement à la migration de trimères LHCII phosphorylés vers les antennes du PS1) (qT) ; (iii) l'installation de processus de photoinhibition réversibles indépendant des 2 précédemment cités et non associés à une altération structurale du PSII (qI). Au contraire une diminution du Φ_{NPQ} traduit un processus de photoinhibition non réversible associé à l'altération structurale du PSII (Maxwell et Johnson, 2000).

Le Φ_{NPQ} à l'aube n'a pas montré de variation significative avec la concentration du Cd externe, alors qu'une augmentation significative de la toxicité Cd sur ce paramètre a été observée à midi (midi: $R = 0,56$, $P < 0,01$, **Figure 21 C.**).

Enfin, le pourcentage de la photoinhibition chronique et dynamique augmente progressivement avec l'augmentation de la concentration en Cd, atteignant un maximum à 650 μM de Cd (**Figure 22**).

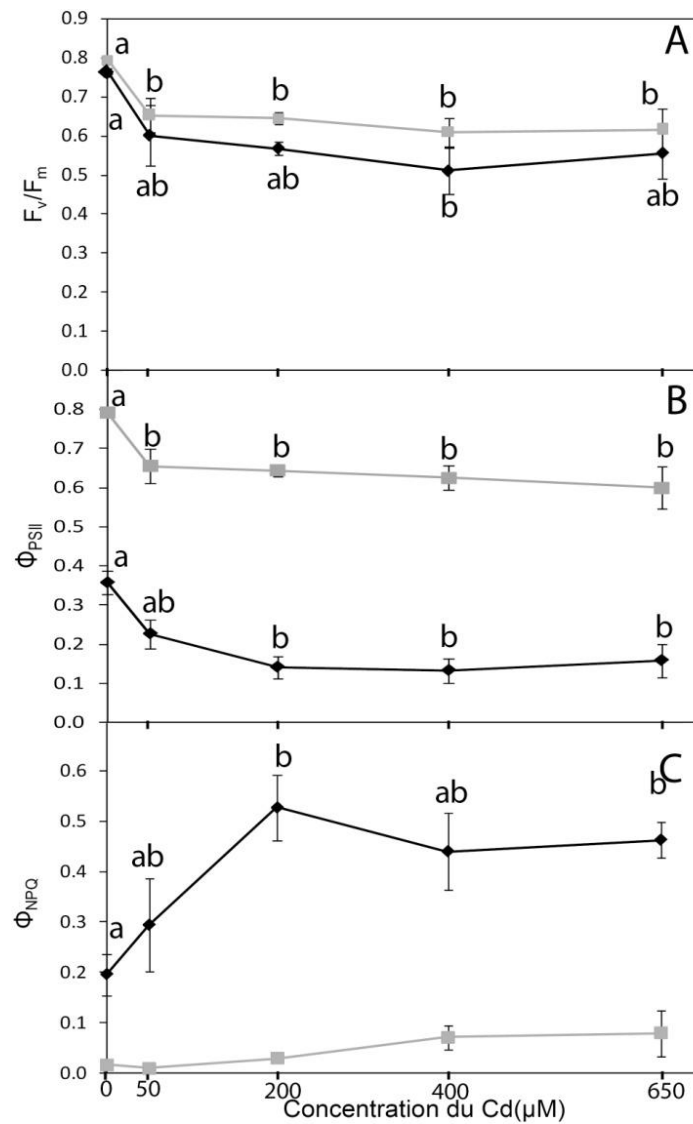


Figure 21 : (A) rendement quantique maximal du PSII (F_v/F_m), (B) rendement quantique du PSII (Φ_{PSII}) et (C) rendement quantique de quenching non-photochimique (Φ_{NPQ}) à midi (◆) et à aube (■) d'*Atriplex halimus* L. après 22 jours de traitement par différentes concentrations du Cd. Chaque valeur représente la moyenne de cinq répétitions \pm SE. Pour chaque paramètre, les petites lettres différentes indiquent une différence significative (test de Tukey, $P < 0.05$).

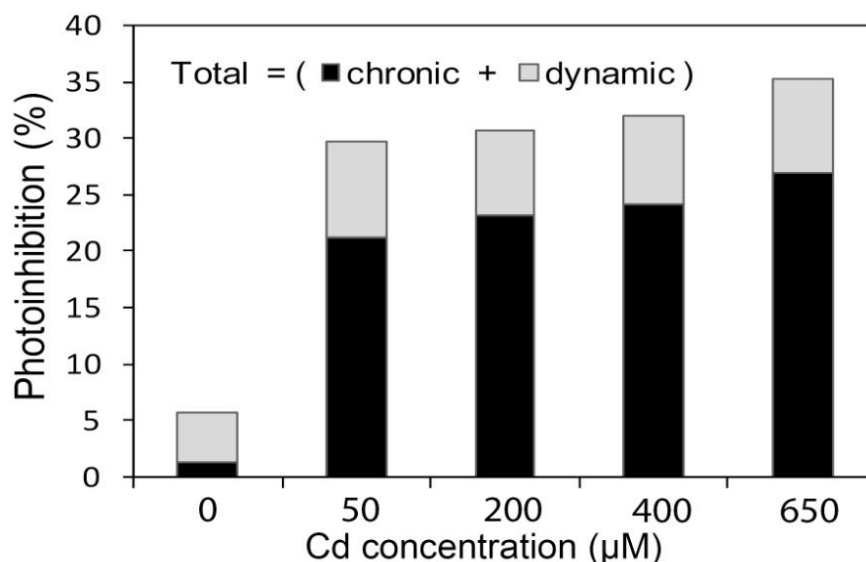


Figure 22 : Pourcentage de la photoinhibition chronique et dynamique d'*Atriplex halimus* L. après 22 jours de traitement par différentes concentrations du Cd.

3.6. Effet du stress du Cd sur la fuite d'électrolytes

La perte relative d'électrolytes est un test couramment utilisé pour évaluer les dommages causés par le stress oxydatif des ETM sur les cellules (Irfan et al., 2013; Li et al., 2012). La perte de stabilité des membranes cellulaires induite par l'excès du Cd se traduit par une diminution de sa capacité à maintenir le contenu intracellulaire à l'intérieur de la cellule. Etant donné que le contenu intracellulaire n'est pas neutre électriquement il est possible d'évaluer cette perte d'électrolytes en mesurant la conductivité d'une solution dans laquelle une feuille a été immergée. Une valeur élevée de fuite d'électrolytes traduit une forte fuite d'ions à travers les membranes donc des membranes instables, affectées par le stress causé par le Cd.

On observe donc une augmentation significative de fuite d'électrolytes avec l'accroissement de la concentration du Cd dans le milieu de culture (**Figure 23**).

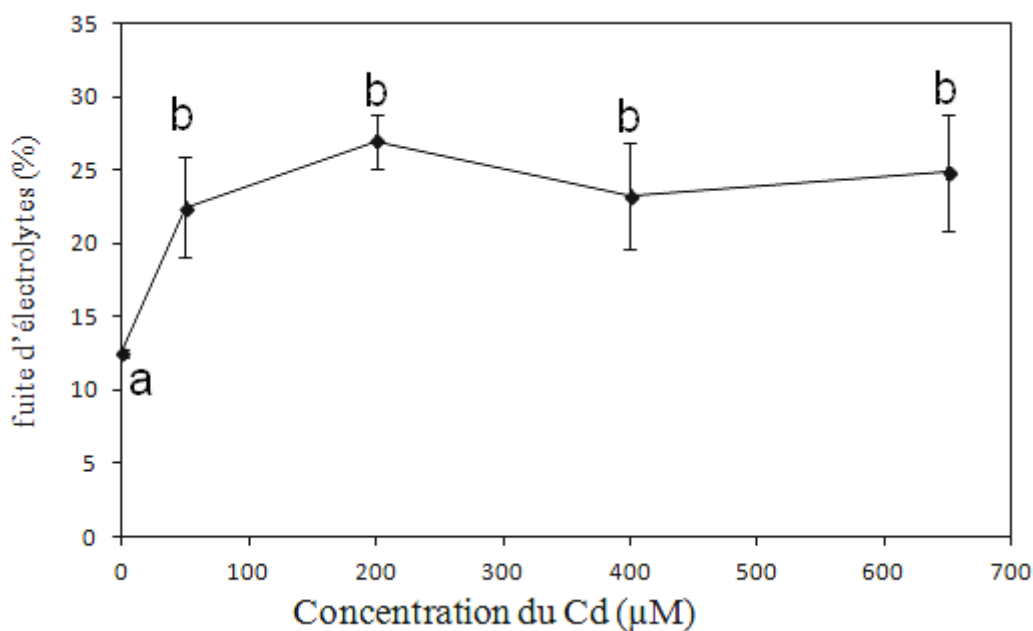


Figure 23 : la fuite d'électrolytes des feuilles d'*Atriplex halimus* L. après 22 jours de traitement par différentes concentrations du Cd. Chaque valeur représente la moyenne de trois répétitions \pm SE. Pour chaque paramètre, les petites lettres différentes indiquent une différence significative (test de Tukey, $P < 0.05$).

3.7. Effet du stress du Cd sur la teneur en protéines et les activités des enzymes antioxydantes

La détoxification des espèces réactives de l'oxygène constitue un élément clé de défense des plantes contre les stress abiotiques dont le stress métallique. Les enzymes responsables de cette détoxification nommées enzymes antioxydantes incluent la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT) et la gaïacol peroxydase (GPx). Les activités de ces enzymes sont souvent utilisées comme biomarqueurs du stress oxydatif. Les résultats des activités enzymatiques antioxydantes obtenus sont présentés dans la (Figure 24).

L'activité de la gaïacol peroxydase GPx évolue fortement en réponse à l'augmentation de la concentration du Cd dans le milieu jusqu'à atteint 900% à 400 μ M, ensuite elle diminue, mais reste toujours grande de celle de témoin (Figure 24. A).

Les activités de la catalase et de la superoxyde dismutase augmentent significativement jusqu'à 200 μ M de Cd ensuite, comme la gaïacol peroxydase, subissent une diminution (Figure 24, B et C).

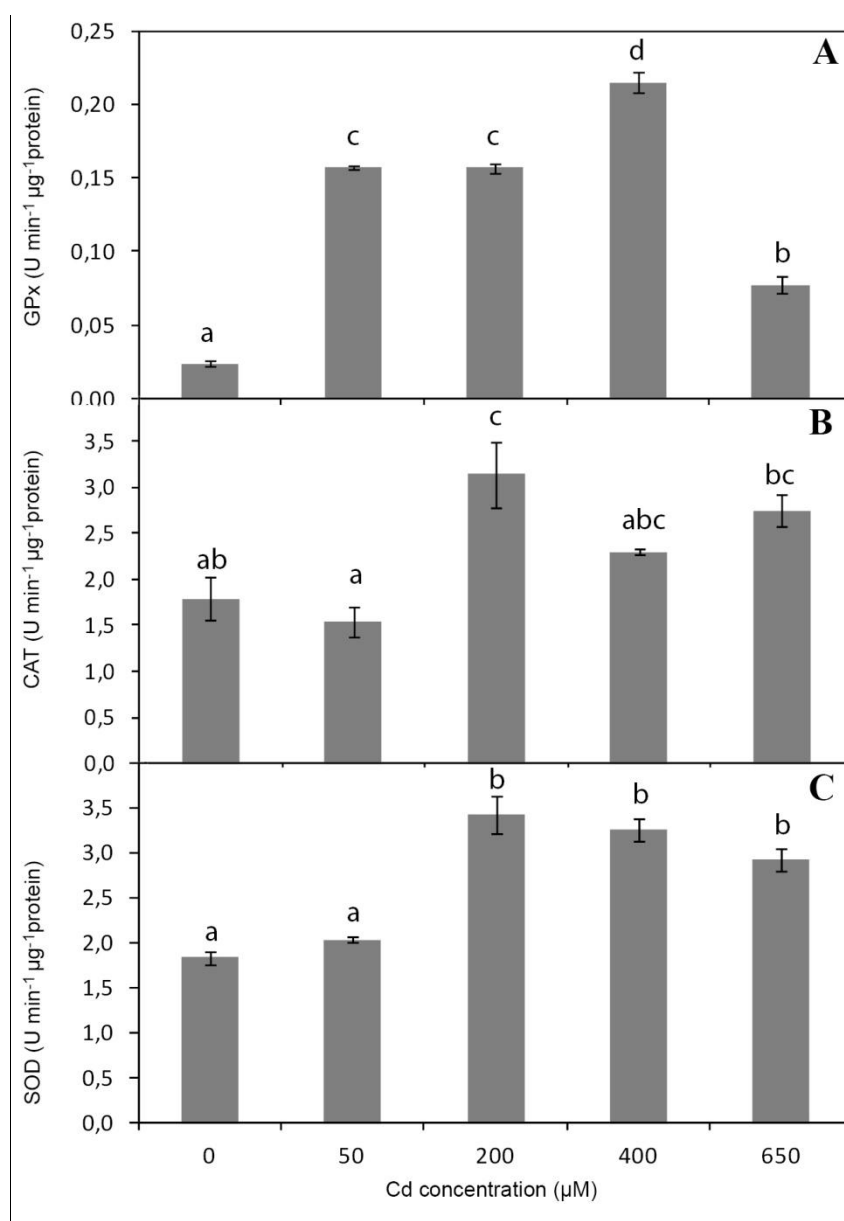


Figure 24 : Les activités de ; (A) la guaiacol peroxidase (GPx), (B) la catalase (CAT) et (C) la superoxide dismutase (SOD) dans les feuilles d'*Atriplex halimus* L. après 22 jours de traitement par différentes concentrations du Cd. Chaque valeur représente la moyenne de (3-5) répétitions \pm SE. Pour chaque paramètre, les petites lettres différentes indiquent une différence significative (test de Tukey, $P < 0.05$).

La teneur en protéines totale tend à augmenter avec l'accroissement de la concentration en Cd, cependant cette augmentation n'est significative ($p > 0,05$) (**Figure 25**).

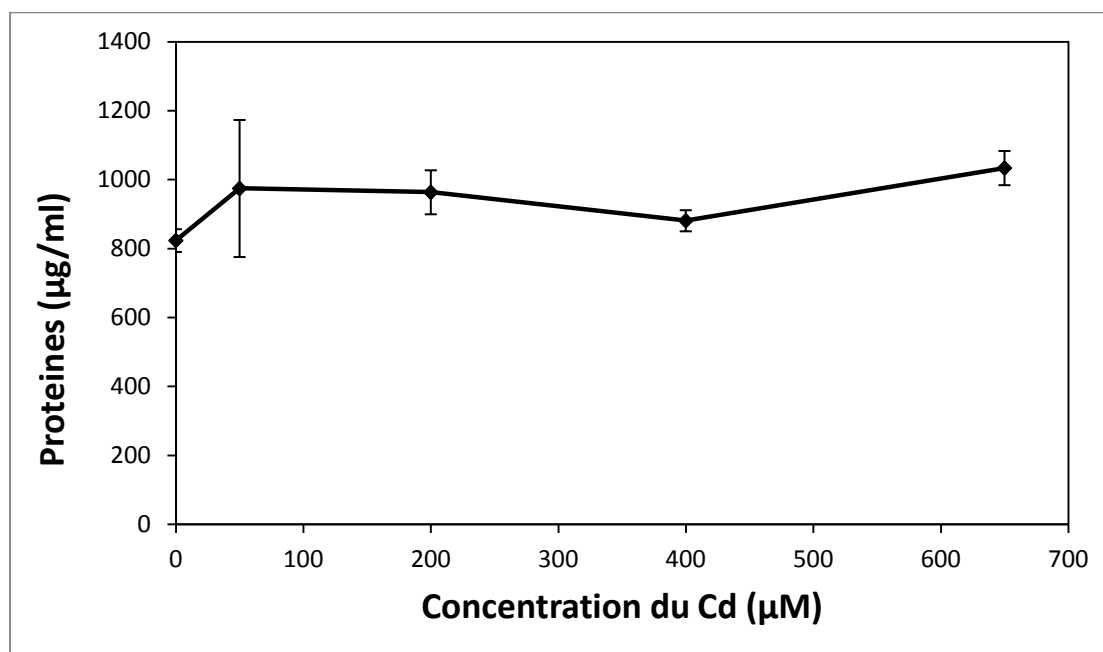


Figure 25 : la teneur en protéines totale ($\mu\text{g/ml}$) dans les feuilles d'*Atriplex halimus* L. après 22 jours de traitement par différentes concentrations du Cd. Chaque valeur représente la moyenne de trois répétitions \pm SE. Pour chaque paramètre, les petites lettres différentes indiquent une différence significative (test de Tukey, $P < 0.05$).

3.8. Effet du stress du Cd sur l'accumulation et la translocation de Cd au sein des plantules d'*A. halimus*

L'accumulation de cadmium dans les parties aériennes et racinaires augmente de façon linéaire avec la concentration du Cd dans le milieu de culture et atteint des valeurs supérieures, 770 et 4646 mg/kg, à 650 μM de Cd (racines: $r = 0,97$, $P < 0,0001$; parties aériennes: $r = 0,96$, $P < 0,0001$, **Figure 26, A**).

Le Facteur de translocation (TF) traduit la capacité d'une espèce végétale à transférer un polluant de ses racines vers ses parties aériennes (tige, feuilles, fleurs) (Chen et al., 2011) (**Tableau 4**). Ce facteur est utilisé pour évaluer l'efficacité de l'accumulation des ETM chez les plantes. Le TF augmente significativement jusqu'à son maximum (0,39) à 200 μM Cd, ensuite diminue pour atteindre son minimum (0,17) à 650 μM Cd (**Tableau 4**).

Le facteur de bioconcentration (BFC) qui est défini comme étant le rapport de concentration des ETM dans les plantes et dans le milieu est présentés dans le (**Tableau 4**). Ce facteur diminue avec l'accroissement des concentrations en Cd dans le milieu, cependant il demeure toujours supérieur à 1 pour tous les traitements.

La capacité d'une plante à accumuler des ETM est également estimée par quantité d'extraction des métaux (MEA) qui est défini comme le produit de la concentration en ETM dans les parties aériennes ou racinaires ($\mu\text{g/g MS}$) et la biomasse des parties aériennes ou racinaires (g/plante) (Amer et al., 2013). La MEA augmente significativement avec l'augmentation du Cd dans le milieu pour atteindre des valeurs maximales, 917 et 1394 μg dans les parties aériennes et racinaires respectivement (**Tableau 4**).

3. 9. Effet du stress du Cd sur la nutrition en éléments minéraux

Des perturbations de la nutrition minérale en présence de cadmium ont été rapportées dans plusieurs études. Il nous a paru donc intéressant d'analyser l'effet du cadmium sur l'accumulation des éléments minéraux essentiels et leurs translocations vers les parties aériennes. Dans les prochains paragraphes de ce titre nous allons seulement citer les résultats concernant la teneur des éléments minéraux ayant des corrélations significatives, négatives ou positives, avec la concentration en Cd dans le milieu.

La teneur en phosphore (P) dans les racines diminue de 30% lorsque la concentration de Cd dans le milieu de culture passe de 0 à 650 μM (**Figure 26. B**). Alors que, il n'y a pas une différence significative entre la concentration du Cd et la teneur en P dans les parties aériennes. Si on s'intéresse maintenant à la translocation du P des racines vers la partie aérienne, on remarque qu'il y a une augmentation significative dans la translocation de cet élément (**Tableau 5**).

La présence du Cd dans le milieu de culture affecte de façon significative la teneur en manganèse (Mn) dans les parties aériennes qui diminue jusqu'à 400 μM puis augmente par la suite (**Figure 26. C**). La teneur de Mn dans les racines ne montre pas de grand changement en réponse au Cd. Par contre, la translocation de Mn montre la même tendance que sa teneur dans les parties aériennes, augmente jusqu'à 400 μM de Cd puis diminue (**Tableau 5**).

La teneur en potassium (K), dans les parties aériennes et les racines, montre une forte corrélation négative (-0,77 pour les deux) avec la concentration du Cd (**Figure 26. D; Tableau 6**). Alors que, la translocation de K vers la partie aérienne ne montre aucune différence significative, malgré la réduction observée (**Tableau 5**).

Tableau 4 : Effet du Cd sur le facteur de translocation, facteur de bioaccumulation et la quantité d'extraction des métaux (MU) d'*A. halimus* L. après 22 jours de traitement par différentes concentrations du Cd. Chaque valeur représente la moyenne de trois répétitions \pm SE. Pour chaque paramètre, les petites lettres différentes dans la même ligne indiquent une différence significative (test de Tukey, $P < 0.05$).

	Concentration du Cd μ M			
	50	200	400	650
Facteur de translocation	0,24 \pm 0,004 ab	0,39 \pm 0,01 c	0,25 \pm 0,02 b	0,17 \pm 0,02 a
Facteur de bioaccumulation	13,49 \pm 0,21 a	10,6 \pm 0,09 b	9,22 \pm 0,53 c	6,42 \pm 0,11 d
MU des parties aériennes (μ g par plante)	256,6 \pm 29,5 a	559,3 \pm 23,1 b	888,7 \pm 69,0 c	917,2 \pm 35,4 c
MU des racines (μ g par plante)	256,0 \pm 76,7 a	222,0 \pm 29,2 a	790,9 \pm 47,6 b	1394,7 \pm 104,5 c

Tableau 5 : Effet du Cd sur le facteur de translocation des éléments minéraux d'*A. halimus* L. après 22 jours de traitement par différentes concentrations du Cd. Chaque valeur représente la moyenne de trois répétitions \pm SE. Pour chaque paramètre, les lettres minuscules indiquent les groupes homogènes (test de Tukey, $P < 0.05$).

Traitement (μ M)	P	Mn	K	Fe	Mg
0	0,77 \pm 0,03ab	2,29 \pm 0,11a	1,83 \pm 0,07	0,27 \pm 0,02a	2,66 \pm 0,16a
50	0,68 \pm 0,02a	2,04 \pm 0,03a	1,53 \pm 0,04	0,62 \pm 0,05b	2,41 \pm 0,03a
200	0,95 \pm 0,04bc	2,00 \pm 0,04a	1,71 \pm 0,04	0,69 \pm 0,03b	2,15 \pm 0,06ab
400	0,86 \pm 0,06ab	1,47 \pm 0,14b	1,52 \pm 0,10	0,46 \pm 0,04ab	1,61 \pm 0,17b
635	1,08 \pm 0,05c	2,12 \pm 0,17a	1,81 \pm 0,08	0,57 \pm 0,13ab	2,52 \pm 0,25a

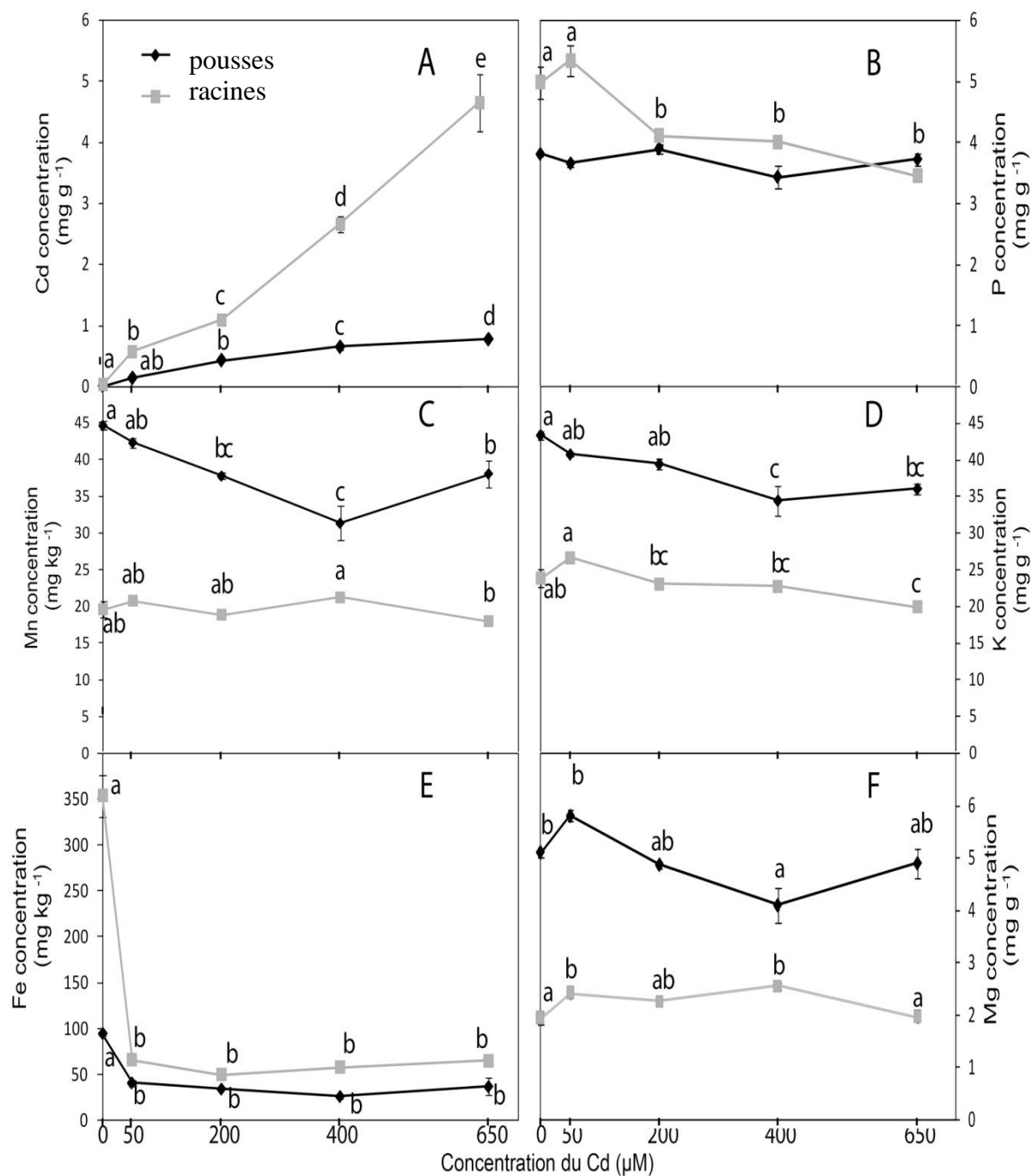


Figure 26 : Concentration du (A) cadmium, (B) phosphore, (C) manganèse, (D) potassium, (E) fer et (F) magnésium dans les pousses (◆) et les racines (■) d'*Atriplex halimus* L. après 22 jours de traitement par différentes concentrations du Cd. Chaque valeur représente la moyenne de trois répétitions ± SE. Pour chaque paramètre, les petites lettres différentes indiquent une différence significative (test de Tukey, P < 0.05).

La teneur en fer (Fe) est très influencée par le Cd. A 50 μM de Cd, la teneur en Fe diminue environ 3 et 7 fois par rapport aux témoins dans les parties aériennes et les racines, respectivement (**Figure 26. E**). Cependant, au dessus de 50 μM de Cd, la teneur en Fe demeure stable. Le facteur de translocation augmente légèrement avec le Cd, mais, cette augmentation n'est pas significative (**Tableau 5**).

La teneur en magnésium (Mg) dans les parties aériennes présente une légère diminution jusqu'à 400 μM de Cd, puis augmente. Tandis que cette teneur est peu changeable dans les racines (**Figure 26. F**). La translocation de Mg vers les parties aériennes subit également une légère réduction jusqu'à 400 μM de Cd puis augmente (**Tableau 5**).

Tableau 6: Coefficients de corrélation (Pearson) entre Cd et les éléments minéraux dans *A. halimus* L. après 22 jours de traitement par différentes concentrations du Cd.

	P	Mn	K	Fe	Mg
Racines	-0,861**	-0,3	-0,769**	-0,535*	-0,06
Parties aériennes	-0,24	-0,607*	-0,789**	-0,567*	-0,48

(*), (**) Significatif à 0,05 et 0,01, respectivement.

La teneur en calcium (Ca), teneur en Sodium (Na) et la teneur en Molybdène (Mo) dans les parties aériennes présente et les racines ne présentent aucune corrélation, ni positive ni négative, avec le Cd (**Figure 27** et **Figure 28**).

Finalement, la teneur en azote total dans les parties aériennes n'est pas influencée par le Cd. Alors que, celle des racines augmente significativement jusqu'à 400 μM du Cd puis subit une diminution (**Figure 28**).

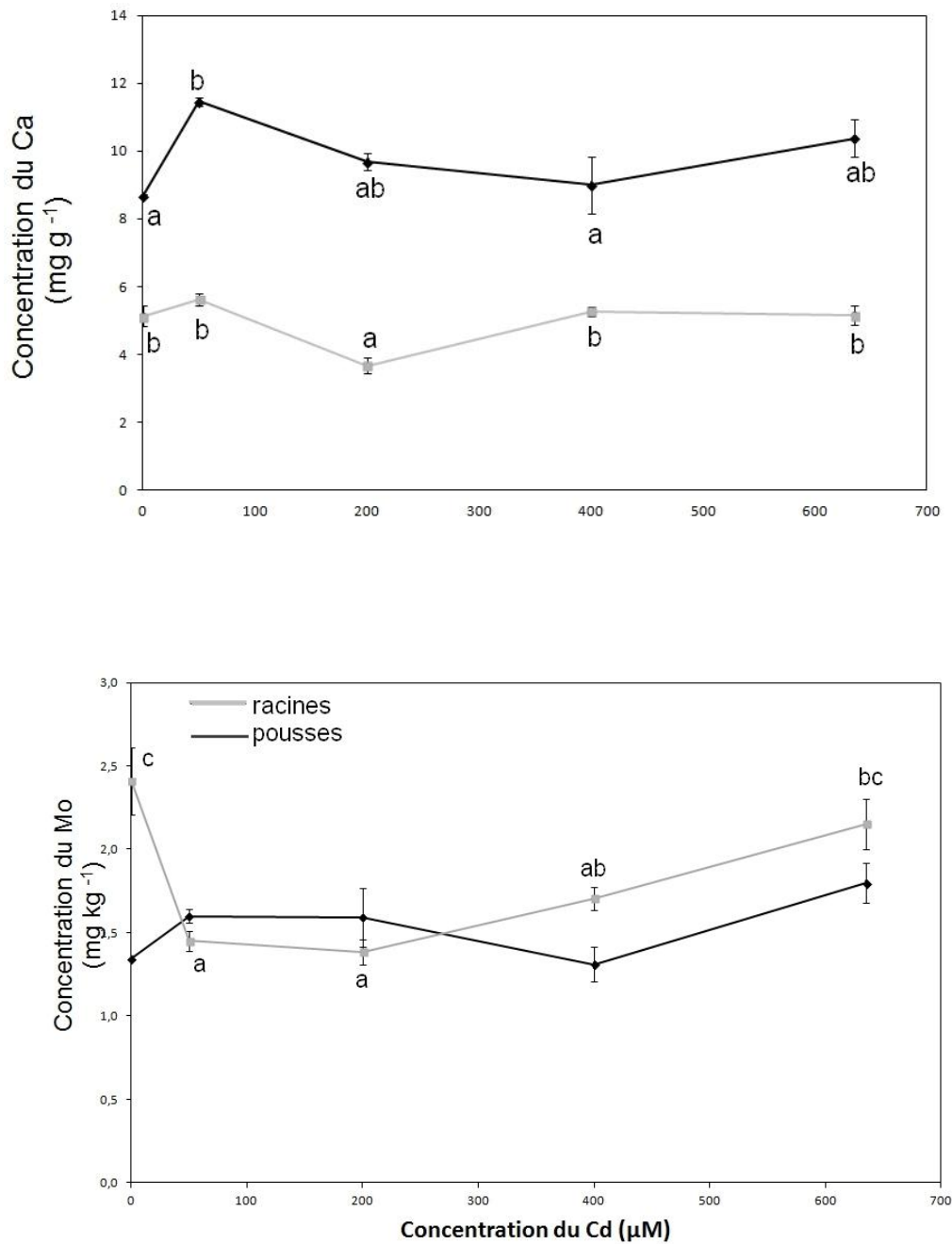


Figure 27 : Concentration du calcium (Ca) et du Molybdène (Mo) dans les pousses (◆) et les racines (■) d'*Atriplex halimus* L. après 22 jours de traitement par différentes concentrations du Cd. Chaque valeur représente la moyenne de trois répétitions ± SE. Pour chaque paramètre, les petites lettres différentes indiquent une différence significative (test de Tukey, P < 0.05).

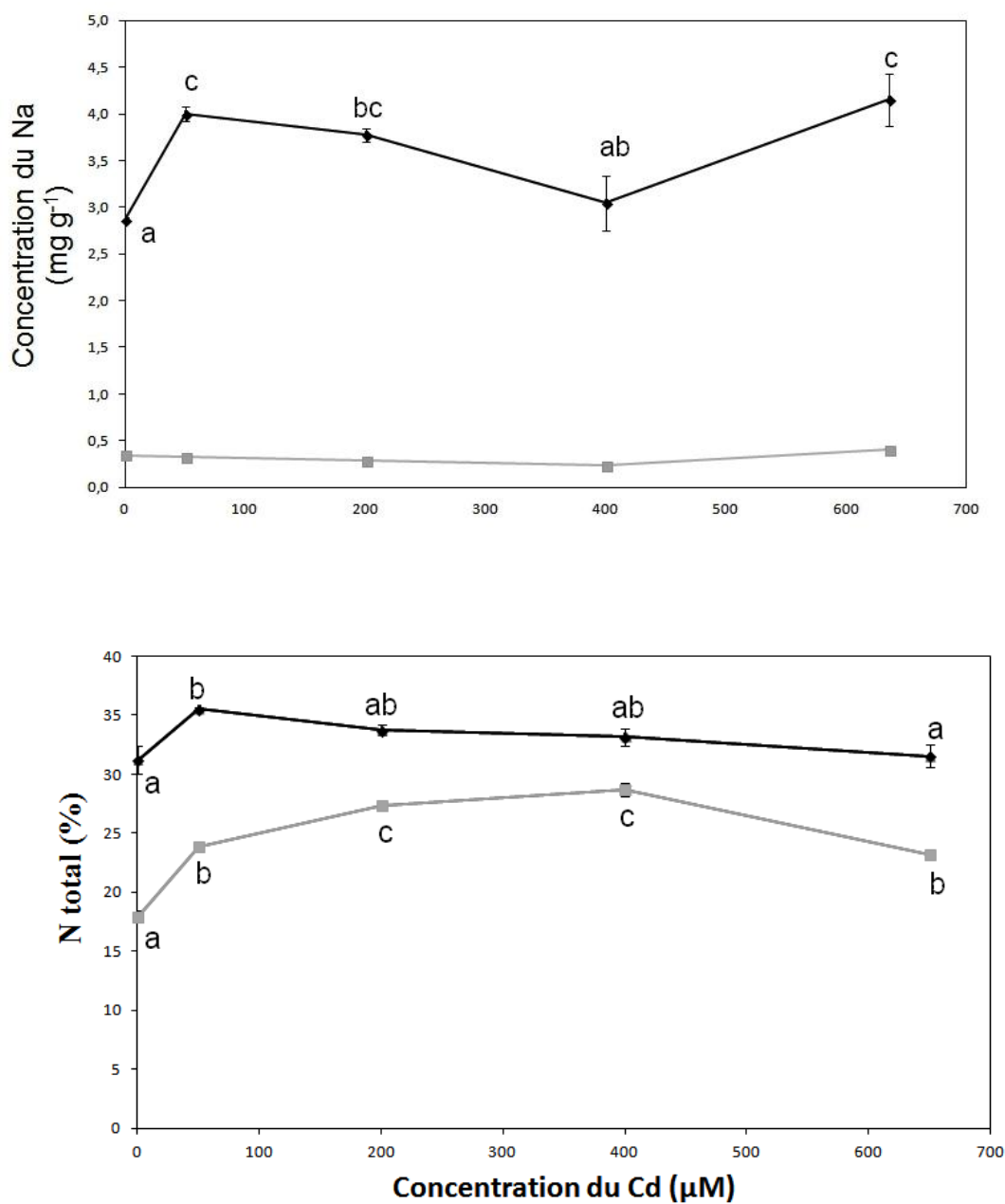


Figure 28 : Concentration du sodium (Na) et de l'azote total (N) dans les pousses (◆) et les racines (■) d'*Atriplex halimus* L. après 22 jours de traitement par différentes concentrations du Cd. Chaque valeur représente la moyenne de trois répétitions \pm SE. Pour chaque paramètre, les petites lettres différentes indiquent une différence significative (test de Tukey, $P < 0.05$).

4. Discussion

4.1. Effet du stress du Cd sur la survie et la production en biomasse d'*Atriplex halimus* L

La croissance des plantes entières comme celle des cellules végétales cultivées in vitro est facilement mesurable et de ce fait fréquemment utilisée en tant que paramètre pour appréhender les réactions des végétaux à divers stress biotiques et abiotiques. En effet, la réduction de croissance est généralement observée lorsque des plantes sont soumises au stress des élément traces métalliques (Nada et al., 2007; Ran et al., 2014). Le Cd est un élément non essentiel au développement des végétaux. De ce fait, il peut entraîner des effets inhibiteurs sur la croissance et l'appareil photosynthétique des plantes même à de très faible doses (Di Cagno et al., 1999; Liu et al., 2012). Dans cette étude, nous avons analysé la réponse de la croissance, la survie, l'appareil photosynthétique et la composition minérale d'*A. halimus* soumis aux concentrations croissantes de Cd.

Un effet toxique du traitement par le cadmium est observé chez les plantes d'*A. halimus*. Cet effet se manifeste notamment par l'accélération de la sénescence et l'apparition des chloroses dans les feuilles. La chlorose observée est un symptôme de la toxicité du cadmium, elle est due à une diminution de la teneur en pigments photorécepteurs, notamment les chlorophylles, résultant d'une désorganisation structurale des chloroplastes (El-beltagi et Mohamed, 2013; Rzigui, 2011), ainsi que d'une inhibition de l'activité des enzymes responsables de la biosynthèse de la chlorophylle (Wang et al., 2014). Cette diminution de la teneur en chlorophylles peut être attribuée également à une déficience en oligo-éléments notamment le fer (Breckle et Kahle, 1992; Redondo-Gómez et al., 2010), dont la biodisponibilité peut être limitée par la présence de Cd²⁺ dans le milieu ou par une répression du fonctionnement de la Fe(III) réductase au niveau des cellule racinaires (Souguir, 2009).

La détermination des poids de matière fraîche et de matière sèche au niveau des parties aériennes et des racines, ainsi que la vitesse relative de la croissance et la surface spécifique des feuilles d'*A. halimus* montrent que la biomasse décroît significativement au fur et à mesure que la concentration du cadmium augmente dans le milieu (**Figure**

15, A-D). L'effet du cadmium sur la croissance peut être lié à la perturbation de l'équilibre de certaines hormones de croissance (Azevedo et al., 2005; Piotrowska et al., 2010), à la perturbation de l'homéostasie des éléments minéraux essentiels (Breckle et Kahle, 1992; Irfan et al., 2013), ainsi qu'à des perturbations de la machinerie photosynthétique (Li et al., 2012).

Nos résultats indiquent également que la CE50 (CE50, concentration efficace induisant 50% d'inhibition de la croissance) compris entre 200 et 400 μM de Cd. Cette valeur est similaire avec celle rapportée par Nedjimi & Daoud (2009) pour la même espèce, mais plus élevés avec ceux rapportés par plusieurs auteurs pour de nombreuses autres espèces (Azevedo et al., 2005; Barzanti et al., 2011). Les seuils de la phytotoxicité (PT50, concentration tissulaire correspondant à la réduction de 50% de la croissance) est entre 0,42 et 0,65 mg/g et 1,1 et 2,66 mg/g pour les pousses et les racines d'*A. halimus*, respectivement. Cette valeur est beaucoup plus élevée que celle rapportée par Nedjimi & Daoud (2009), qui ont trouvé que PT50 était de 0,12 et 0,5 mg/g pour les pousses et les racines, respectivement. Cette différence peut être liée à la variabilité génétique élevée de cette espèce (Abbad et al., 2004). D'autre part, les résultats concernant la survie des plantes indiquent que LC50 (LC50, la concentration létale causant la mort de 50% des plantes) se situait entre 650 et 1350 μM de Cd car toutes les plantes sont mortes à 1350 μM de Cd au bout de 22 jours. Cependant, comme la photosynthèse nette a été entièrement inhibée à 650 μM de Cd, on peut conclure que cette concentration est la limite supérieure de tolérance d'*A. halimus* au stress provoqué par le Cd.

4.2. Effet du stress du Cd sur les paramètres photosynthétiques

Les résultats de notre étude montrent que les concentrations croissantes de Cd diminuent clairement la photosynthèse nette (AN) et la conductance stomatique (gs). La réduction en photosynthèse nette et la conductance stomatique sous stress de Cd a été démontrée dans de nombreuses espèces (Redondo-Gómez et al., 2010; Ying et al., 2010). La réduction de l'AN peut être attribuée à l'anomalie des stomates (Ying et al., 2010). La fermeture des stomates et/ou la diminution de leur densité sont connus pour réduire à la fois la photosynthèse nette et la concentration interne en CO_2 (C_i) dans les plantes (Cornic, 2000; Vitória et al., 2003; Zhu et al., 2005). Cependant, dans notre expérience, le C_i tend à augmenter avec l'augmentation de la concentration en Cd, ce qui

suggère que la diminution de la photosynthèse nette pourrait être dû à la réduction dans la teneur en pigment (Chen et al., 2011), ainsi que l'inhibition de l'activité des enzymes clés du cycle de Calvin, la chaîne de transport d'électron photosynthétique et l'activité de RUBISCO (Zhao et al., 2009). Ainsi, nous avons constaté une diminution significative de la concentration en pigments photosynthétiques avec l'augmentation de la concentration de Cd dans le milieu de culture. La réduction enregistrée de la Chl a, Chl b et les caroténoïdes a été probablement causée par la dégradation des enzymes impliquées dans la biosynthèse de la chlorophylle comme l'acide δ -aminolévulinique déshydratase et l'acide δ -aminolévulinique synthase (Li et al., 2008; Wang et al., 2014).

Le rendement quantique maximum de la réaction photochimique au niveau du photosystème II (PSII) (F_v/F_m) est généralement utilisé comme un biomarqueur du stress, y compris le stress de Cd. Dans la présente étude, F_v / F_m montre une réduction significative à midi par rapport à l'aube. Des résultats similaires ont été observés dans d'autres plantes exposées au stress de Cd tels que *Arthrocnemum macrostachyum* et le riz (Redondo-Gómez et al., 2010; Wang et al., 2014). Selon Redondo-Gómez et al. (2010), la réduction de la valeur F_v/F_m pourrait être un indicateur de photoinhibition, des composants de PSII au flux lumineux élevés, d'*A. halimus* sous stress de Cd.

L'accroissement de la concentration de Cd dans le milieu de culture a également diminué de manière significative le rendement quantique de la réaction photochimique du PSII (Φ_{PSII}), ce qui suggère que les plantes dissipent l'énergie absorbée sous forme de chaleur soit dans les antennes ou dans le centre réactionnel (Mateos-Naranjo et al., 2013; Wang et al., 2014). Maxwell et Johnson (2000) ont rapporté que la dissipation thermique peut être considérée comme un mécanisme de photoprotection qui préserve l'appareil photosynthétique contre les dommages oxydatifs.

La photoinhibition est causée par des dommages aux composants photosynthétiques, en conséquence, elle peut être de courte durée et réversible (photoinhibition dynamique) ou à long durée et irréversible (photoinhibition chronique) (Werner et al., 2002). Nos résultats indiquent que les valeurs F_v/F_m , à l'aube sont restées considérablement inférieure aux paramètres de contrôle pour les plantes non stressées pour tous les traitements, ce qui suggère la présence de photoinhibition chronique ou sénescence. Ces résultats sont en accord avec les résultats rapportés par Redondo-Gómez et al. (2010).

4.3. Effet du stress du Cd sur la fuite d'électrolytes

La perte d'électrolyte et la fuite d'ions à travers la membrane plasmique est une conséquence de la déstabilisation des membranes cellulaires. Dans notre étude le Cd induit une augmentation significative dans la fuite d'électrolytes (**Figure 23**). Des résultats similaires ont été rapportés pour *Lepidium sativum L.*, *Vigna mungo* et *Lemna minor* (Gill et al., 2012). La déstabilisation membranaire indique une surproduction des radicaux libres qui aboutissent à la peroxydation des lipides (Li et al., 2012).

4.4. Effet du stress par le Cd sur la teneur en protéines et les activités des enzymes antioxydantes

Le système antioxydant enzymatique chez les cellules végétales dans les conditions de stress joue un rôle important dans la défense de ces organismes. Une augmentation de l'activité de ces enzymes antioxydantes est en général une réponse à la présence d'agents phytotoxiques (Dong et al., 2006; Qiu et al., 2008).

Nos résultats montrent également que l'activité spécifique du superoxyde dismutase (SOD) s'accroît avec l'élévation de la concentration en Cd dans le milieu de culture (**Figure 24**). L'activité spécifique SOD des feuilles est augmentée jusqu'à 187% à 200µM de Cd. Beaucoup d'études ont montré que cette activité s'accroissait sous l'effet d'un traitement au cadmium, notamment chez l'espèce *Lemna* (Srivastava et Telor, 1992), chez *Solanum melongena L* (Singh et Prasad, 2014), chez *Arabidopsis thaliana* (Skórzyńska-Polit et al., 2004), ou encore dans des feuilles et racines de plantules de tomate (Dong et al., 2006). La superoxyde dismutase intervient dans les premières étapes du processus de détoxification des ROS et semble déterminante pour maintenir le système de défense des plantes (Uruç Parlak et Demirezen Yilmaz, 2013; Wu et al., 2003). L'accroissement de l'activité SOD en réponse aux stress a été attribué, par certains auteurs, à la synthèse *de novo* des protéines enzymatiques (Muschitz, 2009; Ruiz-Lozano et al., 1996).

En présence de Cd, l'activité de la SOD va engendrer une accumulation de peroxyde d'hydrogène suite à la dismutation de l'anion superoxyde. La détoxification de cette molécule peut être envisagée par deux principales enzymes : La catalase (CAT) localisée au niveau des peroxysomes et des mitochondries, la gâiacol peroxydase (GPx) localisée au niveau du cytoplasme. Nos résultats ont montré que les activités de la CAT

et de la GPx sont augmentées dans les feuilles d'*A. halimus* en réponse à l'augmentation de la concentration de Cd dans le milieu de culture. Des résultats similaires ont été trouvés pour *Arabidopsis thaliana* (Skórzyńska-Polit et al., 2004) et *Phaseolus vulgaris* (Chaoui et al., 1997). La CAT catalyse directement la dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau et oxygène, cependant, la GPx exige la présence d'un cofacteur pour la détoxification de l' H_2O_2 .

Les activités de SOD et CAT tendent à diminuer au dessus de $200\mu M$ de Cd, alors que celle de la GPx diminue à $650\mu M$ de Cd. Cette réduction dans les activités et est probablement due à l'inactivation de ces enzymes par l'accumulation excessive de H_2O_2 (Singh et al., 2006). L'accumulation de ROS est toxique pour la plante même s'il existe une voie de détoxification. Si la quantité de ROS formée est supérieure à la quantité détruite grâce au système antioxydants, les ROS occasionnent des dégâts au sein de la cellule en dégradant les pigments, les membranes des thylakoides, les protéines et les enzymes: c'est le phénomène de photoinhibition (Allen and Ort, 2001).

4.5. Effet du stress par le Cd sur l'accumulation du Cd et la nutrition minérale

Aucune fonction biologique n'est connue pour le Cd (Zorrig, 2011). Cependant, cet élément est absorbé et accumulé par les plantes. L'accumulation du Cd provoque une profonde perturbation de la croissance et du développement des plantes, ce qui se manifeste par des signes de toxicité (Clemens, 2006; DalCorso et al., 2008). Ces effets pourraient être liés, entre autres, à une altération de l'absorption et de la distribution des éléments minéraux indispensables pour le fonctionnement de la plante (DalCorso et al., 2008).

Nos résultats montrent que la teneur en cadmium chez *A. halimus* est plus importante dans les racines que dans les parties aériennes. Ce résultat est en accord avec les résultats obtenus chez cette espèce par (Lefèvre et al., 2009; Nedjimi et Daoud, 2009).

Le facteur de bioconcentration (BFC), qui est défini comme étant le rapport entre la concentration en métal dans la plante et la concentration en métal dans le milieu (Redondo-Gómez et al., 2010), il est utilisée pour évaluer l'efficacité des plantes à accumuler les ETM. Les valeurs de BFC d'*A. halimus* sont élevées aux concentrations

basses et diminuent avec l'augmentation des concentrations du Cd, ce qui indique une réduction de l'efficacité de l'accumulation de Cd à des concentrations élevées. En conséquence, cela peut suggérer que *A. halimus* a une capacité régulière d'accumulation de ce métal. Sun et al. (2009) ont trouvé des résultats similaires pour *Bidens pilosa*, une hyperaccumulatrice du Cd.

Le facteur de translocation, utilisé également pour évaluer l'efficacité de l'accumulation des ETM chez les plantes (Chen et al., 2011), est plus élevés à faibles concentrations du Cd (50 et 200 μM Cd), ce qui indique qu'à forte concentration, *A. halimus* évite la translocation de ce métal vers ses parties aériennes. Ceci pourrait constituer un mécanisme important de protection contre la diffusion de ce métal toxique vers les tissus verts. Le comportement d'*A. halimus* pourrait s'expliquer par la mise en place d'un ou de plusieurs mécanismes permettant de limiter l'absorption par la racine, de réduire le transfert vers la partie aérienne, ou de favoriser l'efflux de cadmium en dehors du cytoplasme.

Il a été reconnu qu'une biomasse élevée et un haut FBC et TF sont trois facteurs clés pour le succès de la phytoextraction (Zhang et al., 2014). En général, presque tous les hyperaccumulateurs du Cd ont des BCF et TF élevés, mais la plupart d'entre eux ont de petites biomasses, ce qui conduit à des faibles quantités d'extraction métalliques. Par exemple, *Thlaspi caerulescens*, hyperaccumulatrice de Cd, accumule environ 600 mg/kg du Cd dans ses parties aériennes et son BCF atteint 29,6, cependant cette espèce n'extrait que 240 μg du Cd pour une seule plante (Perronnet et al., 2003). Par contre, dans notre étude, et malgré que les valeurs de TF sont inférieures à 1 et les valeurs de FBC sont inférieure à celles de *Thlaspi caerulescens*, la quantité extrait par la partie aérienne d'*A. halimus* atteint 559 μg de Cd pour une seule plante à 200 μM de Cd (**Tableau 4**), cette quantité est environ le double en comparaison avec les hyperaccumulatrices de Cd (*T. caerulescens* à 20 mg/kg (Perronnet et al., 2003) et *Solanum nigrum* à 50 mg/kg (Sun et al., 2008), respectivement.

La réduction de l'absorption des éléments minéraux essentiels a été décrite comme le principale effet des ETM sur les plantes (Kabata-Pendias, 2011). À cet égard, nous avons constaté que le stress par le Cd entraîne une réduction considérable des macronutriments (K, P et Mg) et de micronutriments (Fe et Mn) dans les tissus des parties aériennes et/ou les racines des plantules d'*A. halimus*. Cette réduction est probablement le résultat d'une accumulation excessive de Cd. Les troubles de la

nutrition minérale sous stress Cd ont été rapportés auparavant par différents auteurs chez plusieurs espèces de plantes comme *Brassica napus oleifera*, *Triticum aestivum* (Zembala et al., 2010), *Fagus sylvatica* L. (Breckle et Kahle, 1992) et *Prunus dulcis* (Nada et al., 2007). Selon Dong et al. (2006), le Cd peut interférer avec l'absorption des nutriments, en modifiant la perméabilité de la membrane plasmique, et en affectant des processus de transport d'élément à travers la membrane, en particulier ceux qui ont la même valence comme le Fe et le Mn. Küpper et Kochian (2010) suggèrent que la réduction en micronutriments comme Mn était probablement due à la concurrence des transporteurs ou des interférences avec l'expression du gène du transporteur.

5. Conclusion

Exposition des plantes d'*A. halimus* au Cd a considérablement affecté sa croissance exprimée en masse sèche, la longueur des tiges, SLA et RGR et sévèrement réduit l'activité de leur appareil photosynthétique. Selon la survie des plantes et les valeurs photosynthèse nette, le seuil de tolérance supérieure d'*A. halimus* au Cd est proche de 650 μM . l'excès de Cd a également affecté l'appareil photochimique (PSII), les concentrations de pigments photosynthétiques et l'absorption des éléments minéraux essentiels.

La rétention de grande quantité de Cd dans les racines, l'augmentation de la photoinhibition et l'induction des activités des enzymes antioxydantes pourrait contribuer à améliorer la tolérance d'*A. halimus* au stress causé par le Cd. Enfin, les valeurs de facteur de translocation et de bioconcentration indiquent que *A. halimus* est modérément tolérant à des niveaux élevés de Cd et pourrait être utile dans la phytoremédiation (phytostabilisation plutôt que phytoextraction) des sites, faible à modérément, contaminés par le Cd.

Conclusion générale

Le travail de recherche entrepris se divise en deux principales études :

Dans la première étude on a analysé l'effet de trois métaux lourds ; le Cd, le Cu et le Zn sur la germination et la croissance des jeunes plantules d'*A. halimus*. Les résultats obtenus ont montré que le stade de la germination est moins sensible au stress causé par les trois métaux testés que le stade de la croissance des jeunes plantules. Nous avons remarqué également que la longueur des racines est plus affectée par les métaux lourds, ceci car ces organes ont le rôle principal d'absorption, de ce fait elles sont plus exposées aux effets toxiques des métaux. La longueur des racines peut constituer de bon marqueur de phytotoxicité des métaux lourds.

La deuxième étude consiste à rechercher l'effet du Cd sur les caractéristiques de tolérance d'*A. halimus*. Cette étude nous a permis de déterminer un seuil de tolérance d'*A. halimus* au stress du Cd qui est la dose de 650 μM . Nous avons observé que l'augmentation de la concentration du Cd induit une réduction dans la photosynthèse nette, inhibe l'appareil photochimique (PSII), affecte la teneur en pigments photosynthétiques et perturbe l'absorption des éléments minéraux essentiels. Toutes ces modifications observées pourraient être prises comme biomarqueurs de toxicité du Cd sur la plante.

L'augmentation de la photoinhibition et l'induction et l'augmentation des activités de la superoxyde dismutase, de la catalase et de la gâïacol peroxydase, en réponse de l'accroissement de la concentration du Cd dans le milieu, indique que *A. halimus* dispose d'un système génétique de défense, qui implique la détoxification des espèces réactives de l'oxygène, pour surmonter le stress provoqué par le Cd. Ces caractères pourraient être utilisés comme biomarqueurs aux stress oxydant.

Références bibliographiques

- Abbad, A., El Hadrami, A., Benchaabane, A., 2004. Germination Responses of the Mediterranean Saltbush (*Atriplex halimus* L.) to NaCl Treatment. *J. Agron.* 3, 111–114. doi:10.3923/ja.2004.111.114
- Adams, W., Zarter, C., Mueh, K., 2006. Energy dissipation and photoinhibition: a continuum of photoprotection. *Photoprotection*, ... 49–64. doi:10.1007/1-4020-3579-9_5
- Ahsan, N., Lee, D.G., Lee, S.H., Kang, K.Y., Lee, J.J., Kim, P.J., Yoon, H.S., Kim, J.S., Lee, B.H., 2007. Excess copper induced physiological and proteomic changes in germinating rice seeds. *Chemosphere* 67, 1182–1193. doi:10.1016/j.chemosphere.2006.10.075
- Ait Ali, N., 2008. Étude des mécanismes d'inhibition du transport des électrons photosynthétiques induite par les xénobiotiques affectant les réactions photochimiques du photosystème II.
- Al-Turki, T.A., Omer, S., Ghafoor, A., 2000. A synopsis of the genus *Atriplex* L. (*Chenopodiaceae*) in Saudi Arabia. *Feddes Repert.* 111, 261–293. doi:10.1002/fedr.20001110503
- Amer, N., Al Chami, Z., Al Bitar, L., Mondelli, D., Dumontet, S., 2013. Evaluation of *Atriplex halimus*, *medicago lupulina* and *portulaca oleracea* for phytoremediation of Ni, Pb, and Zn. *Int. J. Phytoremediation* 15, 498–512. doi:10.1080/15226514.2012.716102
- Apel, K., Hirt, H., 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55, 373–99. doi:10.1146/annurev.arplant.55.031903.141701
- Arora, a, Sairam, R.K., Srivastava, G.C., 2002. Oxidative stress and oxidative system in plants. *Curr. Sci.* 82, 1227–1238.

- Asada, K., Kiso, K., Yoshikawa, K., 1974. Univalent reduction of molecular oxygen by spinach chloroplasts on illumination. *J. Biol. Chem.* 249, 2175–2181.
- Azevedo, H., Glória Pinto, C.G., Fernandes, J., Loureiro, S., Santos, C., 2005. Cadmium Effects on Sunflower Growth and Photosynthesis. *J. Plant Nutr.* doi:10.1080/01904160500324782
- Bajji, M., Kinet, J.M., Lutts, S., 1998a. Salt stress effects on roots and leaves of *Atriplex halimus* L. and their corresponding callus cultures. *Plant Sci.* 137, 131–142. doi:10.1016/S0168-9452(98)00116-2
- Baker, A.J.M., Walker, P.L., Shaw, A.J., 1990. Ecophysiology of metal uptake by tolerant plants. 155–177.
- Barber, J., Nield, J., Morris, E.P., Zheleva, D., Hankamer, B., 1997. The structure, function and dynamics of photosystem two. *Physiol. Plant.* 100, 817–827. doi:10.1111/j.1399-3054.1997.tb00008.x
- Barber, S.A., 1995. *Soil Nutrient Bioavailability: A Mechanistic Approach.*
- Bargagli, R., 1998. Trace elements in terrestrial plants: an ecophysiological approach to biomonitoring and biorecovery.
- Bartosz, G., 1997. Oxidative stress in plants. *Acta Physiol. Plant.* 19, 47–64. doi:10.1007/s11738-997-0022-9
- Barzanti, R., Colzi, I., Arnetoli, M., Gallo, A., Pignattelli, S., Gabbrielli, R., Gonnelli, C., 2011. Cadmium phytoextraction potential of different *Alyssum* species. *J. Hazard. Mater.* 196, 66–72. doi:10.1016/j.jhazmat.2011.08.075
- Bassi, R., Sandona, D., Croce, R., 1997. Novel aspects of chlorophyll a/b-binding proteins. *Physiol. Plant.* 100, 769–779. doi:10.1111/j.1399-3054.1997.tb00004.x
- Bhattacharjee, S., 2012. The Language of Reactive Oxygen Species Signaling in Plants. *J. Bot.* 2012, 1–22. doi:10.1155/2012/985298

- Blandin, P., 1986. Bioindicateurs et diagnostic des systèmes écologiques. Bull. d'Ecologie 17, 215–307.
- Blankenship, R.E., 2008. Molecular Mechanisms of Photosynthesis, Molecular Mechanisms of Photosynthesis. doi:10.1002/9780470758472
- Bouchenak, F., Henri, P., Benrebaha, F.Z., Rey, P., 2012. Differential responses to salinity of two *Atriplex halimus* populations in relation to organic solutes and antioxidant systems involving thiol reductases. J. Plant Physiol. 169, 1445–1453. doi:10.1016/j.jplph.2012.06.009
- Boveris, A., Chance, B., 1973. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. Biochem. J. 134, 707–16. doi:10.1042/bj1340707
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248–54.
- Breckle, S.-W., Kahle, H., 1992. Effects of toxic heavy metals (Cd, Pb) on growth and mineral nutrition of beech (*Fagus sylvatica* L.). Vegetatio 101, 43–53. doi:10.1007/BF00031914
- Briat, J.-F., Lebrun, M., 1999. Plant responses to metal toxicity. Comptes Rendus l'Académie des Sci. - Ser. III - Sci. la Vie 322, 43–54. doi:10.1016/S0764-4469(99)80016-X
- Brooks, R.R., Morrison, R.S., Reeves, R.D., Dudley, T.R., Akman, Y., 1979. Hyperaccumulation of nickel by *Alyssum Linnaeus* (Cruciferae). Proc. R. Soc. London. Ser. B. Biol. Sci. 203, 387–403. doi:10.1098/rspb.1979.0005
- Buchanan, B., 2000. Biochemistry & molecular biology of plants. Waste Manag. 26, 487–494. doi:10.1016/j.wasman.2005.02.025
- Burnol, A., Duro, L., Grive, M., 2006. Eléments traces métalliques - Guide méthodologique -Recommandations pour la modélisation des transferts des éléments traces métalliques dans les sols et les eaux souterraines. INERIS

1–119. doi:10.1017/CBO9781107415324.004

- Chaoui, A., Mazhoudi, S., Ghorbal, M.H., El Ferjani, E., 1997. Cadmium and zinc induction of lipid peroxidation and effects on antioxidant enzyme activities in bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Sci.* 127, 139–147. doi:10.1016/S0168-9452(97)00115-5
- Chappelka, A.H., Samuelson, L.J., 1998. Ambient ozone effects on forest trees of the eastern United States: A review. *New Phytol.* doi:10.1046/j.1469-8137.1998.00166.x
- Chen, L., Long, X.H., Zhang, Z.H., Zheng, X.T., Rengel, Z., Liu, Z.P., 2011. Cadmium Accumulation and Translocation in Two Jerusalem Artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) Cultivars. *Pedosphere* 21, 573–580. doi:10.1016/S1002-0160(11)60159-8
- Cheng, Y., Zhou, Q., 2002. Ecological toxicity of reactive X-3B red dye and cadmium acting on wheat (*Triticum aestivum*). *J. Environ. Sci. China* 14, 136–140.
- Clemens, S., 2006. Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. *Biochimie* 88, 1707–19. doi:10.1016/j.biochi.2006.07.003
- Cornic, G., 2000. Drought stress inhibits photosynthesis by decreasing stomatal aperture - not by affecting ATP synthesis. *Trends Plant Sci* 5, 187–188. doi:10.1016/S1360-1385(00)01625-3
- Cossu, C., Doyotte, A., Jacquin, M., Vasseur, P., 1997. Biomarqueurs du stress oxydant chez les animaux aquatiques, in: Jean-Claude Amiard, François Ramade, Laurent Lagadic, T.C. (Ed.), *Biomarqueurs En écotoxicologie - Aspects Fondamentaux*. pp. 149–163.
- DalCorso, G., Farinati, S., Maistri, S., Furini, A., 2008. How plants cope with cadmium: Staking all on metabolism and gene expression. *J. Integr. Plant Biol.* doi:10.1111/j.1744-7909.2008.00737.x

- Dazy, M., Masfaraud, J.-F., Féraud, J.-F., 2009. Induction of oxidative stress biomarkers associated with heavy metal stress in *Fontinalis antipyretica* Hedw. *Chemosphere* 75, 297–302. doi:10.1016/j.chemosphere.2008.12.045
- de la Rosa, G., Peralta-Videa, J.R., Montes, M., Parsons, J.G., Cano-Aguilera, I., Gardea-Torresdey, J.L., 2004. Cadmium uptake and translocation in tumbleweed (*Salsola kali*), a potential Cd-hyperaccumulator desert plant species: ICP/OES and XAS studies. *Chemosphere* 55, 1159–68. doi:10.1016/j.chemosphere.2004.01.028
- Dekker, J.P., Van Grondelle, R., 2000. Primary charge separation in Photosystem II. *Photosynth. Res.* 63, 195–208. doi:10.1023/A:1006468024245
- Demirevska-Kepova, K., Simova-Stoilova, L., Stoyanova, Z., Holzer, R., Feller, U., 2004. Biochemical changes in barley plants after excessive supply of copper and manganese. *Environ. Exp. Bot.* 52, 253–266. doi:10.1016/j.envexpbot.2004.02.004
- Di Cagno, R., Guidi, L., Stefani, A., Soldatini, G.F., 1999. Effects of cadmium on growth of *Helianthus annuus* seedlings: Physiological aspects. *New Phytol.* 144, 65–71. doi:10.1046/j.1469-8137.1999.00497.x
- Di Salvatore, M., Carafa, a. M., Carratù, G., 2008. Assessment of heavy metals phytotoxicity using seed germination and root elongation tests: A comparison of two growth substrates. *Chemosphere* 73, 1461–1464. doi:10.1016/j.chemosphere.2008.07.061
- Dong, J., Wu, F., Zhang, G., 2006. Influence of cadmium on antioxidant capacity and four microelement concentrations in tomato seedlings (*Lycopersicon esculentum*). *Chemosphere* 64, 1659–1666. doi:10.1016/j.chemosphere.2006.01.030
- El-beltagi, H.S., Mohamed, H.I., 2013. Alleviation of Cadmium Toxicity in *Pisum sativum* L. Seedlings by Calcium Chloride. *Not. Bot. Horti Agrobot.*

Cluj-Napoca. doi:10.15835/nbha4118910

- Ernst, W.H.O., 2006. Evolution of metal tolerance in higher plants. *For. Snow Landsc. Res.* 80, 251–274.
- Fork, D.C., Satoh, K., 1986. The Control by State Transitions of the Distribution of Excitation Energy in Photosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 37, 335–361. doi:10.1146/annurev.pp.37.060186.002003
- Franco, E., Alessandrelli, S., Masojídek, J., Margonelli, A., Giardi, M.T., 1999. Modulation of D1 protein turnover under cadmium and heat stresses monitored by [35S]methionine incorporation. *Plant Sci.* 144, 53–61. doi:10.1016/S0168-9452(99)00040-0
- Freshour, G., Clay, R.P., Fuller, M.S., Albersheim, P., Darvill, A.G., Hahn, M.G., 1996. Developmental and Tissue-Specific Structural Alterations of the Cell-Wall Polysaccharides of *Arabidopsis thaliana* Roots. *Plant Physiol.* 110, 1413–1429.
- Gardès-albert, M., Bonnefont-rousselot, D., Abedinzadeh, Z., Jore, D., 2003. Espèces réactives de l’oxygène Comment l’oxygène peut-il devenir toxique ? *Actual. Chim.* 91–96.
- Genty, B., Briantais, J.-M., Baker, N.R., 1989. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 990, 87–92. doi:10.1016/S0304-4165(89)80016-9
- Giardi, M.T., Masojidek, J., Godde, D., 1997. Effects of abiotic stresses on the turnover of the D1 reaction centre II protein. *Physiol. Plant.* 101, 635–642. doi:10.1034/j.1399-3054.1997.1010326.x
- Green, B.R., Durnford, D.G., 1996. The chlorophyll-carotenoid proteins of oxygenic photosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47, 685–714. doi:10.1146/annurev.arplant.47.1.685
- Grene, R., 2002. Oxidative Stress and Acclimation Mechanisms in Plants. *Arab.*

- B. 49, 1. doi:10.1199/tab.0036.1
- Haddioui, A., Baaziz, M., 2001. Genetic diversity of natural populations of *Atriplex halimus* L. in Morocco: An isoenzyme-based overview. *Euphytica* 121, 99–106. doi:10.1023/A:1012051222530
- Halliwell, B., 2006. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol.* 141, 312–322. doi:10.1104/pp.106.077073
- He, J.-Y., Ren, Y.-F., Zhu, C., Yan, Y.-P., Jiang, D.-A., 2008. Effect of Cd on growth, photosynthetic gas exchange, and chlorophyll fluorescence of wild and Cd-sensitive mutant rice. *Photosynthetica* 46, 466–470. doi:10.1007/s11099-008-0080-2
- Horton, P., Ruban, a. V., Walters, R.G., 1996. Regulation of Light Harvesting in Green Plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47, 655–684. doi:10.1146/annurev.arplant.47.1.655
- Inz, D., 1995. Oxidative stress in plants. *Curr. Opin. Biotechnol.* 6, 153–158. doi:10.1016/0958-1669(95)80024-7
- Irfan, M., Hayat, S., Ahmad, A., Alyemeni, M.N., 2013. Soil cadmium enrichment: Allocation and plant physiological manifestations. *Saudi J. Biol. Sci.* 20, 1–10. doi:10.1016/j.sjbs.2012.11.004
- Jensen, P.E., Bassi, R., Boekema, E.J., Dekker, J.P., Jansson, S., Leister, D., Robinson, C., Scheller, H.V., 2007. Structure, function and regulation of plant photosystem I. *Biochim. Biophys. Acta* 1767, 335–52. doi:10.1016/j.bbabbio.2007.03.004
- Jiang, X.J., Luo, Y.M., Liu, Q., Liu, S.L., Zhao, Q.G., 2004. Effects of Cadmium on Nutrient Uptake and Translocation by Indian Mustard. *Environ. Geochem. Health* 26, 319–324. doi:10.1023/B:EGAH.0000039596.15586.b3
- Kabata-Pendias, A., 2011. Trace elements in soils and plants, CRC Press.

doi:10.1201/b10158-25

- Kabata-Pendias, A., Pendias, H., 2001. Trace elements in soils and plants. CRC Press. Boca Raton, Florida. 3rd, 331.
- Kavuličová, J., Kaduková, J., Ivánová, D., 2012. The Evaluation of Heavy Metal Toxicity in Plants Using the Biochemical Tests. Nov. Biotechnol. Chim. 11, 101–110. doi:10.2478/v10296-012-0011-2
- Koeman, J.H., Köhler-Günther, A., Kurelec, B., Rivière, J.L., Versteeg, D., Walker, C.H., 1993. Applications and Objectives of Biomarker Research, in: Biomarkers Research and Application in the Assessment of Environmental Health. pp. 1–13.
- Kranner, I., Colville, L., 2011. Metals and seeds: Biochemical and molecular implications and their significance for seed germination. Environ. Exp. Bot. 72, 93–105. doi:10.1016/j.envexpbot.2010.05.005
- Krause, G.H., Weis, E., 1991. Chlorophyll Fluorescence and Photosynthesis: The Basics. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 42, 313–349. doi:10.1146/annurev.pp.42.060191.001525
- Küpper, H., Kochian, L. V., 2010. Transcriptional regulation of metal transport genes and mineral nutrition during acclimatization to cadmium and zinc in the Cd/Zn hyperaccumulator, *Thlaspi caerulescens* (Ganges population). New Phytol. 185, 114–129. doi:10.1111/j.1469-8137.2009.03051.x
- Kupper, H., Kupper, F., Spiller, M., 1996. Environmental relevance of heavy metal-substituted chlorophylls using the example of water plants. J. Exp. Bot. 47, 259–266. doi:10.1093/jxb/47.2.259
- Küpper, H., Küpper, F., Spiller, M., n.d. In situ detection of heavy metal substituted chlorophylls in water plants. Photosynth. Res. 58, 123–133. doi:10.1023/A:1006132608181
- Küpper, H., Parameswaran, A., Leitenmaier, B., Trtilek, M., Setlik, I., 2007. Cadmium-induced inhibition of photosynthesis and long-term acclimation

- to cadmium stress in the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *New Phytol.* 175, 655–674. doi:10.1111/j.1469-8137.2007.02139.x
- Lagadic, C., Caquet, T., 1996. Marqueurs biologiques de pollution : des outils au service de l'écotoxicologie. *INRA Mens.* 34–38.
- Le Houérou, H.N., 1992. The role of saltbushes (*Atriplex spp.*) in arid land rehabilitation in the Mediterranean Basin: a review. *Agrofor. Syst.* 18, 107–148. doi:10.1007/BF00115408
- Le Houerou, H.N., 2000. Utilization of Fodder Trees and Shrubs in the Arid and Semiarid Zones of West Asia and North Africa. *Arid Soil Res. Rehabil.* 14, 101–135. doi:10.1080/089030600263058
- Lefèvre, I., Marchal, G., Meerts, P., Corréal, E., Lutts, S., 2009. Chloride salinity reduces cadmium accumulation by the Mediterranean halophyte species *Atriplex halimus* L. *Environ. Exp. Bot.* 65, 142–152. doi:10.1016/j.envexpbot.2008.07.005
- Li, M., Zhang, L.J., Tao, L., Li, W., 2008. Ecophysiological responses of *Jussiaea rapens* to cadmium exposure. *Aquat. Bot.* 88, 347–352. doi:10.1016/j.aquabot.2008.01.002
- Li, S., Yang, W., Yang, T., Chen, Y., Ni, W., 2015. Effects of Cadmium Stress on Leaf Chlorophyll Fluorescence and Photosynthesis of *Elsholtzia argyi*—A Cadmium Accumulating Plant. *Int. J. Phytoremediation* 17, 85–92. doi:10.1080/15226514.2013.828020
- Li, W., Khan, M. a., Yamaguchi, S., Kamiya, Y., 2005. Effects of heavy metals on seed germination and early seedling growth of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Growth Regul.* 46, 45–50. doi:10.1007/s10725-005-6324-2
- Li, X., Zhao, M., Guo, L., Huang, L., 2012. Effect of cadmium on photosynthetic pigments, lipid peroxidation, antioxidants, and artemisinin in hydroponically grown *Artemisia annua*. *J. Environ. Sci. (China)* 24, 1511–8. doi:10.1016/S1001-0742(11)60920-0

- Lichtenthaler, H. K., 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods Enzymol.* 148, 350–382. doi:10.1016/0076-6879(87)48036-1
- Lingua, G., Franchin, C., Todeschini, V., Castiglione, S., Biondi, S., Burlando, B., Parravicini, V., Torrigiani, P., Berta, G., 2008. Arbuscular mycorrhizal fungi differentially affect the response to high zinc concentrations of two registered poplar clones. *Environ. Pollut.* 153, 137–47. doi:10.1016/j.envpol.2007.07.012
- Liu, S., Yang, C., Xie, W., Xia, C., Fan, P., 2012. The Effects of Cadmium on Germination and Seedling Growth of *Suaeda salsa*. *Procedia Environ. Sci.* 16, 293–298. doi:10.1016/j.proenv.2012.10.041
- Lotmani, B., Mesnoui, M., 2011. Effects of copper stress on antioxidative enzymes, chlorophyll and protein content in *Atriplex halimus*. *African J. Biotechnol.* doi:10.5897/AJB10.1804
- Lotmani, B., Fatarna, L., Berkani, A., Rabier, J., Prudent, P., Laffont-Schwob, I., 2011. Selection of Algerian populations of the Mediterranean Saltbush, *Atriplex halimus*, tolerant to high concentrations of Lead, Zinc, and Copper for phytostabilization of heavy metal-contaminated Soils. *Eur. J. Plant Sci. Biotechnol.* 1 Global S
- Lutts, S., Lefèvre, I., Delpérée, 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. doi:10.2134/jeq2004.1271
- Malkin, S., Herbert, S.K., Fork, D.C., 1990. Light distribution, transfer and utilization in the marine red alga *Porphyra perforata* from photoacoustic energy-storage measurements. *BBA - Bioenerg.* 1016, 177–189. doi:10.1016/0005-2728(90)90056-A

- Manousaki, E., Kalogerakis, N., 2009. Phytoextraction of Pb and Cd by the Mediterranean saltbush (*Atriplex halimus* L.): Metal uptake in relation to salinity. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 16, 844–854. doi:10.1007/s11356-009-0224-3
- Manske, C., Hilbi, H., 2014. Metabolism of the vacuolar pathogen *Legionella* and implications for virulence. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 4, 125. doi:10.3389/fcimb.2014.00125
- Marklund, S., Marklund, G., 1974. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.* 47, 469–474. doi:10.1111/j.1432-1033.1974.tb03714.x
- Márquez-García, B., Márquez, C., Sanjosé, I., Nieva, F.J.J., Rodríguez-Rubio, P., Muñoz-Rodríguez, a. F., 2013. The effects of heavy metals on germination and seedling characteristics in two halophyte species in Mediterranean marshes. *Mar. Pollut. Bull.* 70, 119–124. doi:10.1016/j.marpolbul.2013.02.019
- Marschner, H., 1995. Mineral nutrition of higher plants, San Diego.
- Martínez, J.P., Kinet, J.M., Bajji, M., Lutts, S., 2005. NaCl alleviates polyethylene glycol-induced water stress in the halophyte species *Atriplex halimus* L. *J. Exp. Bot.* 56, 2421–2431. doi:10.1093/jxb/eri235
- Martínez, J.P., Lutts, S., Schanck, 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. doi:10.1016/j.jplph.2003.12.009
- Martínez-Fernández, D., Walker, D.J., 2012. The effects of soil amendments on the growth of *Atriplex halimus* and *Bituminaria bituminosa* in heavy metal-contaminated soils. *Water. Air. Soil Pollut.* 223, 63–72. doi:10.1007/s11270-011-0839-0
- Mateos-Naranjo, E., Andrades-Moreno, L., Cambrollé, J., Perez-Martin, A.,

2013. Assessing the effect of copper on growth, copper accumulation and physiological responses of grazing species *Atriplex halimus*: Ecotoxicological implications. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 90, 136–142. doi:10.1016/j.ecoenv.2012.12.020
- Maxwell, K., Johnson, G.N., 2000. Chlorophyll fluorescence--a practical guide. *J. Exp. Bot.* 51, 659–668. doi:10.1093/jexbot/51.345.659
- McGrath, S.P., Zhao, F.J., 2003. Phytoextraction of metals and metalloids from contaminated soils. *Curr. Opin. Biotechnol.* doi:10.1016/S0958-1669(03)00060-0
- Mehler, a H., 1951. Studies on reactions of illuminated chloroplasts. I. Mechanism of the reduction of oxygen and other Hill reagents. *Arch. Biochem. Biophys.* 33, 65–77. doi:10.1016/0003-9861(51)90082-3
- Memon, A.R., Aktoprakligil, D., ??zdemir, A., Vertii, A., 2001. Heavy metal accumulation and detoxification mechanisms in plants. *Turk. J. Botany* 25, 111–121. doi:10.3923/ijar.2006.122.141
- Mesnoua, M., Lotmani, B., 2015. Effect of Some Heavy Metals on Germination and Early Seedling Growth of *Atriplex halimus subsp. Schweinfurthii*. *Am. J. Agric. Environ. Sci* 15, 2235–2240.
- Minagawa, J., Takahashi, Y., 2004. Structure, function and assembly of Photosystem II and its light-harvesting proteins. *Photosynth. Res.* 82, 241–63. doi:10.1007/s11120-004-2079-2
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., Van Breusegem, F., 2004. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci.* 9, 490–8. doi:10.1016/j.tplants.2004.08.009
- Moosavi, S.A., Gharineh, M.H., Afshari, R.T., Ebrahimi, A., 2012. Effects of Some Heavy Metals on Seed Germination Characteristics of Canola (*Barassica napus*), Wheat (*Triticum aestivum*) and Safflower (*Carthamus tinctorious*) to Evaluate Phytoremediation Potential of These Crops. *J. Agric. Sci.* 4, 11–19. doi:http://dx.doi.org/10.5539/jas.v4n9p11

- Mozafar, A., Goodin, J.R., 1970. Vesiculated Hairs: A Mechanism for Salt Tolerance in *Atriplex halimus* L. *Plant Physiol.* 45, 62–65. doi:10.1104/pp.45.1.62
- Mullen, M.D., Wolf, D.C., Beveridge, T.J., Bailey, G.W., 1992. Sorption of heavy metals by the soil fungi *Aspergillus niger* and *Mucor rouxii*. *Soil Biol. Biochem.* 24, 129–135. doi:10.1016/0038-0717(92)90268-3
- Murthy, S.D., Mohanty, N., Mohanty, P., 1995. Prolonged incubation with low concentrations of mercury alters energy transfer and chlorophyll (Chl) a protein complexes in *Synechococcus* 6301: changes in Chl a absorption and emission characteristics and loss of the F695 emission band. *Biometals* 8, 237–42.
- Muschitz, A., 2009. Réponses physiologiques des végétaux supérieurs aux stress métalliques. Caractérisation du rôle des parois cellulaires dans les stratégies défensives des cellules de tomate (*Solanum lycopersicum* Mill.) face aux éléments traces métalliques). Artois.
- Myśliwa-Kurdziel, B., Strzałka, K., 2005. Influence of Cd(II), Cr(VI) and Fe(III) on early steps of deetiolation process in wheat: Fluorescence spectral changes of protochlorophyllide and newly formed chlorophyllide. *Agric. Ecosyst. Environ.* 106, 199–207. doi:10.1016/j.agee.2004.10.008
- Nada, E., Ferjani, B.A., Ali, R., Bechir, B.R., Imed, M., Makki, B., 2007. Cadmium-induced growth inhibition and alteration of biochemical parameters in almond seedlings grown in solution culture. *Acta Physiol. Plant.* 29, 57–62. doi:10.1007/s11738-006-0009-y
- Nakano, Y., Asada, K., 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 22, 867–880.
- Nedjimi, B., Daoud, Y., 2009. Cadmium accumulation in *Atriplex halimus* subsp. *schweinfurthii* and its influence on growth, proline, root hydraulic

- conductivity and nutrient uptake. *Flora Morphol. Distrib. Funct. Ecol. Plants* 204, 316–324. doi:10.1016/j.flora.2008.03.004
- NRC, 1987. Biological markers in environmental health research. Committee on Biological Markers of the National Research Council. *Environ. Health Perspect.* 74, 3–9. doi:++++
- Nyathi, Y., Baker, A., 2006. Plant peroxisomes as a source of signalling molecules. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* doi:10.1016/j.bbamcr.2006.08.031
- Pagliano, C., Raviolo, M., Dalla Vecchia, F., Gabbrielli, R., Gonnelli, C., Rascio, N., Barbato, R., La Rocca, N., 2006. Evidence for PSII donor-side damage and photoinhibition induced by cadmium treatment on rice (*Oryza sativa* L.). *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 84, 70–78. doi:10.1016/j.jphotobiol.2006.01.012
- Patra, J., Baisakhi, B., Mohapatro, M.K., Panda, B.B., 2000. Aluminium triggers genotoxic adaptation to methyl mercuric chloride and ethyl methane sulfonate, but not to maleic hydrazide in plant cells in vivo. *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* 465, 1–9. doi:10.1016/S1383-5718(99)00193-X
- Peralta, J.R., Gardea-Torresdey, J.L., Tiemann, K.J., Gomez, E., Arteaga, S., Rascon, E., Parsons, J.G., 2001. Uptake and effects of five heavy metals on seed germination and plant growth in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 66, 727–734. doi:http://dx.doi.org/10.1007/s001280069
- Perronnet, K., Schwartz, C., Morel, J.L., 2003. Distribution of cadmium and zinc in the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* grown on multicontaminated soil. *Plant Soil* 249, 19–25. doi:10.1023/A:1022560711597
- Piotrowska, A., Bajguz, A., Godlewska-Zytkiewicz, B., Zambrzycka, E., 2010. Changes in growth, biochemical components, and antioxidant activity in

- aquatic plant *Wolffia arrhiza* (Lemnaceae) exposed to cadmium and lead. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 58, 594–604. doi:10.1007/s00244-009-9408-6
- Pitzschke, a, Forzani, C., Hirt, H., 2006. Reactive oxygen species signaling in plants. Antioxid Redox Signal 8, 1757–1764. doi:10.1089/ars.2006.8.1757
- Pospisil, P., 1997. Mechanisms of non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching in higher plants. Photosynthetica. doi:10.1023/A:1006803832366
- Pourrut, B., 2008. Implication du stress oxydatif dans la toxicité du plomb sur une plante modèle, *Vicia faba*.
- Prasad, M.N. V. (Ed.), 2004. Heavy Metal Stress in Plants. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg. doi:10.1007/978-3-662-07743-6
- Prasad, M.N. V., Hagemeyer, J., 1999. Heavy Metal Stress in Plants. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg. doi:10.1007/978-3-662-07745-0
- Qiu, N., Lu, Q., Lu, C., 2003. Photosynthesis, photosystem II efficiency and the xanthophyll cycle in the salt-adapted halophyte *Atriplex centralasiatica*. New Phytol. 159, 479–486. doi:10.1046/j.1469-8137.2003.00825.x
- Qiu, R.-L., Zhao, X., Tang, Y.-T., Yu, F.-M., Hu, P.-J., 2008. Antioxidative response to Cd in a newly discovered cadmium hyperaccumulator, *Arabis paniculata* F. Chemosphere 74, 6–12. doi:10.1016/j.chemosphere.2008.09.069
- Ramírez-Rodríguez, V., López-Bucio, J., Herrera-Estrella, L., 2007. Adaptive Responses in Plants to Nonoptimal Soil pH, in: Plant Abiotic Stress. pp. 145–170. doi:10.1002/9780470988503.ch6
- Ran, X., Liu, R., Xu, S., Bai, F., Xu, J., Yang, Y., Shi, J., Wu, Z., 2014. Assessment of growth rate, chlorophyll a fluorescence, lipid peroxidation and antioxidant enzyme activity in *Aphanizomenon flos-aquae*, *Pediastrum simplex* and *Synedra acus* exposed to cadmium. Ecotoxicology 24, 468–77.

doi:10.1007/s10646-014-1395-3

- Redondo-Gómez, S., Mateos-Naranjo, E., Andrades-Moreno, L., 2010. Accumulation and tolerance characteristics of cadmium in a halophytic Cd-hyperaccumulator, *Arthrocnemum macrostachyum*. J. Hazard. Mater. 184, 299–307. doi:10.1016/j.jhazmat.2010.08.036
- Redondo-Gómez, S., Mateos-Naranjo, E., Vecino-Bueno, I., Feldman, S.R., 2011. Accumulation and tolerance characteristics of chromium in a cordgrass Cr-hyperaccumulator, *Spartina argentinensis*. J. Hazard. Mater. 185, 862–9. doi:10.1016/j.jhazmat.2010.09.101
- Remon, E., 2006. Tolérance et accumulation des métaux lourds par la végétation spontanée des friches métallurgiques: vers de nouvelles méthodes de bio-dépollution.
- Ross, S. M., 1994. Toxic metals in soil-plant systems. John Wiley & Sons Ltd, hardback.
- Ruban, A.V., Rees, D., Pascal, A.A., Horton, P., 1992. Mechanism of Δ pH-dependent dissipation of absorbed excitation energy by photosynthetic membranes. II. The relationship between LHCII aggregation in vitro and qE in isolated thylakoids. Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg. 1102, 39–44. doi:10.1016/0005-2728(92)90062-7
- Ruiz-Lozano, J.M., Azcon, R., Palma, J.M., 1996. Superoxide dismutase activity in arbuscular mycorrhizal *Lactuca sativa* plants subjected to drought stress. New Phytol. 134, 327–333. doi:10.1111/j.1469-8137.1996.tb04637.x
- Rzigui, T., 2011. Analyse de la réponse d'un mutant mitochondrial de *Nicotiana sylvestris* au manque d'eau.
- Saccardy, K., Pineau, B., Roche, O., Cornic, G., 1998. Photochemical efficiency of Photosystem II and xanthophyll cycle components in *Zea mays* leaves exposed to water stress and high light. Photosynth. Res. 56, 57–66. doi:10.1023/A:1005921127513

- Sanità Di Toppi, L., Gabbrielli, R., 1999. Response to cadmium in higher plants. *Environ. Exp. Bot.* doi:10.1016/S0098-8472(98)00058-6
- Schützendübel, A., Polle, A., 2002. Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *J. Exp. Bot.* 53, 1351–1365. doi:10.1016/S0981-9428(02)01411-0
- Sies, H., 1997. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp. Physiol.* 82, 291–295. doi:10.1113/expphysiol.1997.sp004024
- Silvia, P., L, S.M., Micaela, V., M, V.V., 2009. Comparison of sensitivity of grasses (*Lolium perenne* L. and *Festuca rubra* L.) and lettuce (*Lactuca sativa* L.) exposed to water contaminated with microcystins. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 83, 81–4. doi:10.1007/s00128-009-9763-z
- Singh, D., Nath, K., Sharma, Y.K., 2007. Responce of wheat seed germination and seedling growth under copper stress. *J. Environ. Biol.* 28, 409–414.
- Singh, S., Eapen, S., D'Souza, S.F., 2006. Cadmium accumulation and its influence on lipid peroxidation and antioxidative system in an aquatic plant, *Bacopa monnieri* L. *Chemosphere* 62, 233–46. doi:10.1016/j.chemosphere.2005.05.017
- Singh, S., Prasad, S.M., 2014. Growth, photosynthesis and oxidative responses of *Solanum melongena* L. seedlings to cadmium stress: Mechanism of toxicity amelioration by kinetin. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 176, 1–10. doi:10.1016/j.scienta.2014.06.022
- Skórzyńska-Polit, E., Drązkiewicz, M., Krupa, Z., 2004. The activity of the antioxidative system in cadmium-treated *Arabidopsis thaliana*. *Biol. Plant.* 47, 71–78. doi:10.1023/A:1027332915500
- Solanki, R., Anju, Poonam, Dhankhar, R., 2011. Zinc and copper induced changes in physiological characteristics of *Vigna mungo* (L.). *J. Environ. Biol.* 32, 747–51.
- Souguir, D., 2009. Modifications métaboliques, moléculaires et génotoxicité

induites par le cadmium chez *Vicia faba*.

- Srivastava, A., Telor, E., 1992. Antioxidative Enzymatic Response of *Lemna* to Environmental- Pollutants. J. Environ. Sci. Heal. Part a- Environ. Sci. Eng. Toxic Hazard. Subst. Control A27, 261–272.
- Streb, P., Tel-Or, E., Feierabend, J., 1997. Light Stress Effects and Antioxidative Protection in two Desert Plants. *Funct. Ecol.* 11, 416–424. doi:10.1046/j.1365-2435.1997.00105.x
- Street, R., Kulkarni, M., Stirk, W., Southway, C., Staden, J. Van, 2007. Toxicity of metal elements on germination and seedling growth of widely used medicinal plants belonging to Hyacinthaceae. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 79, 371–376. doi:doi: 10.1007/s00128-007-9237-0
- Stroinski, A., Zielezinska, M., 1997. Cadmium effect on hydrogen peroxide, glutathione and phytochelatins levels in potato tuber. *Acta Physiol. Plant.* 19, 127–135.
- Sun, Y., Zhou, Q., Diao, C., 2008. Effects of cadmium and arsenic on growth and metal accumulation of Cd-hyperaccumulator *Solanum nigrum* L. *Bioresour. Technol.* 99, 1103–1110. doi:10.1016/j.biortech.2007.02.035
- Sun, Y., Zhou, Q., Wang, L., Liu, W., 2009. Cadmium tolerance and accumulation characteristics of *Bidens pilosa* L. as a potential Cd-hyperaccumulator. *J. Hazard. Mater.* 161, 808–814. doi:10.1016/j.jhazmat.2008.04.030
- Szabó, I., Bergantino, E., Giacometti, G.M., 2005. Light and oxygenic photosynthesis: energy dissipation as a protection mechanism against photo-oxidation. *EMBO Rep.* 6, 629–34. doi:10.1038/sj.embor.7400460
- Talamali, A., Dutuit, P., Le Thomas, A., Gorenflot, R., 2001. Polygamy in *Atriplex halimus* L. (Chenopodiaceae). *C. R. Acad. Sci. III.* 324, 107–113. doi:10.1016/S0764-4469(00)01273-7
- Tangahu, B.V., Sheikh Abdullah, S.R., Basri, H., Idris, M., Anuar, N.,

- Mukhlisin, M., 2011. A review on heavy metals (As, Pb, and Hg) uptake by plants through phytoremediation. *Int. J. Chem. Eng.* doi:10.1155/2011/939161
- Teranishi, Y., Tanaka, A., Osumi, M., Fukui, S., 2014. Catalase Activities of Hydrocarbon-utilizing *Candida* Yeasts. *Agric. Biol. Chem.*
- Tremel-Schaub, A., Feix, I., 2005. Contamination des sols: transferts des sols vers les plantes, EDP Scienc. ed. ADEME, Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie.
- Tripathy, B.C., Oelmüller, R., 2012. Reactive oxygen species generation and signaling in plants. *Plant Signal. Behav.* 7, 1621–33. doi:10.4161/psb.22455
- Uruç Parlak, K., Demirezen Yilmaz, D., 2013. Ecophysiological tolerance of *Lemna gibba* L. exposed to cadmium. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 91, 79–85. doi:10.1016/j.ecoenv.2013.01.009
- Van Assche, F., Cardinaels, C., Clijsters, H., 1988. Induction of enzyme capacity in plants as a result of heavy metal toxicity: Dose-response relations in *Phaseolus vulgaris* L., treated with zinc and cadmium. *Environ. Pollut.* 52, 103–115. doi:10.1016/0269-7491(88)90084-X
- Vanobberghen, F., 2011. La phytoremédiation en Wallonie: évaluation du potentiel d'assainissement des sols contaminés en métaux lourds.
- Vasseur, P., Cossu-Leguille, C., 2003. Biomarkers and community indices as complementary tools for environmental safety. *Environ. Int.* 28, 711–717. doi:10.1016/S0160-4120(02)00116-2
- Vigano, L., Arillo, a, Melodia, F., Arlati, P., Monti, C., 1998. Biomarker responses in cyprinids of the middle stretch of the River Po, Italy. *Environ. Toxicol. Chem.* 17, 404–411. doi:10.1897/1551-5028(1998)017<0404:bricot>2.3.co;2
- Vitória, A.P., Rodriguez, A.P.M., Cunha, M., Lea, P.J., Azevedo, R.A., 2003.

- Structural changes in radish seedlings exposed to cadmium. *Biol. Plant.* 47, 561–568. doi:10.1023/B:BIOP.0000041062.00539.7a
- von Caemmerer, S., Farquhar, G.D., 1981. Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves. *Planta* 153, 376–387. doi:10.1007/BF00384257
- Wade, M.J., Davis, B.K., Carlisle, J.S., Klein, A.K., Valoppi, L.M., 1993. Environmental transformation of toxic metals. *Occup. Med.*
- Wahid, A., 2006. Influence of atmospheric pollutants on agriculture in developing countries: A case study with three new wheat varieties in Pakistan. *Sci. Total Environ.* 371, 304–313. doi:10.1016/j.scitotenv.2006.06.017
- Walker, D.J., Lutts, S., Sánchez-García, M., Correal, E., 2014. *Atriplex halimus* L.: Its biology and uses. *J. Arid Environ.* doi:10.1016/j.jaridenv.2013.09.004
- Walker, D.J., Moñino, I., González, E., Frayssinet, N., Correal, E., 2005. Determination of ploidy and nuclear DNA content in populations of *Atriplex halimus* (Chenopodiaceae). *Bot. J. Linn. Soc.* 147, 441–448. doi:10.1111/j.1095-8339.2004.00379.x
- Walker, D.J., Romero, P., de Hoyos, A., Correal, E., 2008. Seasonal changes in cold tolerance, water relations and accumulation of cations and compatible solutes in *Atriplex halimus* L. *Environ. Exp. Bot.* 64, 217–224. doi:10.1016/j.envexpbot.2008.05.012
- Wang, C., Zhang, S.H., Wang, P.F., Hou, J., Zhang, W.J., Li, W., Lin, Z.P., 2009. The effect of excess Zn on mineral nutrition and antioxidative response in rapeseed seedlings. *Chemosphere* 75, 1468–1476. doi:10.1016/j.chemosphere.2009.02.033
- Wang, Y., Jiang, X., Li, K., Wu, M., Zhang, R., Zhang, L., Chen, G., 2014. Photosynthetic responses of *Oryza sativa* L. seedlings to cadmium stress: physiological, biochemical and ultrastructural analyses. *Biometals* 27,

389–401. doi:10.1007/s10534-014-9720-0

- Weeks, J.M., 1995. The value of biomarkers for ecological risk assessment: academic toys or legislative tools? Weeks. 1995. value biomarkers Ecol. risk Assess. Acad. toys or Legis. tools?. Appl. Soil Ecol. 2 215-216. 4, 215–216.
- Werner, C., Correia, O., Beyschlag, W., 2002. Characteristic patterns of chronic and dynamic photoinhibition of different functional groups in a Mediterranean ecosystem. Funct. Plant Biol. 29, 999 – 1011. doi:10.1071/PP01143
- Whitmarsh, J., Govindjee, 1999. The Photosynthetic Process, in: Concepts in Photobiology. pp. 11–51. doi:10.1007/978-94-011-4832-0
- Wu, F., Zhang, G., Dominy, P., 2003. Four barley genotypes respond differently to cadmium: lipid peroxidation and activities of antioxidant capacity. Environ. Exp. Bot. 50, 67–78. doi:10.1016/S0098-8472(02)00113-2
- Xu, Q., Min, H., Cai, S., Fu, Y., Sha, S., Xie, K., Du, K., 2012. Subcellular distribution and toxicity of cadmium in *Potamogeton crispus* L. Chemosphere 89, 114–120. doi:10.1016/j.chemosphere.2012.04.046
- Yachandra, V., DeRose, V., Latimer, M., Mukerji, I., Sauer, K., Klein, M., 1993. Where plants make oxygen: a structural model for the photosynthetic oxygen-evolving manganese cluster. Science (80-.). 260, 675–679. doi:10.1126/science.8480177
- Ying, R.-R., Qiu, R.-L., Tang, Y.-T., Hu, P.-J., Qiu, H., Chen, H.-R., Shi, T.-H., Morel, J.-L., 2010. Cadmium tolerance of carbon assimilation enzymes and chloroplast in Zn/Cd hyperaccumulator *Picris divaricata*. J. Plant Physiol. 167, 81–87. doi:10.1016/j.jplph.2009.07.005
- Yruela, I., 2005. Copper in plants. Brazilian J. Plant Physiol. doi:10.1590/S1677-04202005000100012
- Zembala, M., Filek, M., Walas, S., Mrowiec, H., Kornaś, A., Miszański, Z.,

- Hartikainen, H., 2010. Effect of selenium on macro- and microelement distribution and physiological parameters of rape and wheat seedlings exposed to cadmium stress. *Plant Soil* 329, 457–468. doi:10.1007/s11104-009-0171-2
- Zervoudakis, G., Angelopoulos, K., Salahas, G., Georgiou, C.D., 1998. Differences in Cold Inactivation of Phosphoenolpyruvate Carboxylase among C4 Species: The Effect of pH and of Enzyme Concentration. *Photosynthetica* 35, 169–175. doi:10.1023/A:1006998420652
- Zhang, X., Zhang, X., Gao, B., Li, Z., Xia, H., Li, H., Li, J., 2014. Effect of cadmium on growth, photosynthesis, mineral nutrition and metal accumulation of an energy crop, king grass (*Pennisetum americanum* × *P. purpureum*). *Biomass and Bioenergy* 67, 179–187. doi:10.1016/j.biombioe.2014.04.030
- Zhao, F.-Y., Liu, W., Zhang, S.-Y., 2009. Different responses of plant growth and antioxidant system to the combination of cadmium and heat stress in transgenic and non-transgenic rice. *J. Integr. Plant Biol.* 51, 942–50. doi:10.1111/j.1744-7909.2009.00865.x
- Zhou, W., Zhao, D., Lin, X., 1997. Effects of Waterlogging on Nitrogen Accumulation and Alleviation of Waterlogging Damage by Application of Nitrogen Fertilizer and Mixtalol in Winter Rape (*Brassica napus* L.). *J. Plant Growth Regul.* 16, 47–53. doi:10.1007/PL00006974
- Zhu, R., Macfie, S.M., Ding, Z., 2005. Cadmium-induced plant stress investigated by scanning electrochemical microscopy. *J. Exp. Bot.* 56, 2831–2838. doi:10.1093/jxb/eri275
- Zorrig, W., 2011. Recherche des déterminants contrôlant l’accumulation du cadmium chez la laitue “*Lactuca sativa*.” Montpellier, SupAgro.

Résumé

La contamination par les métaux issus des activités anthropiques a des conséquences importantes sur les écosystèmes et la santé humaine. En effet, ces éléments, par nature non biodégradables, présentent une forte écotoxicité et pourraient être impliqués dans de nombreuses pathologies. Il est donc aujourd'hui indispensable non seulement de mieux connaître les effets de ces polluants sur les organismes vivants, mais aussi de mettre en œuvre des solutions durables, visant à limiter leurs risques. Dans ce contexte, les plantes représentent un objet d'étude intéressant. En effet, celles-ci, directement confrontées aux composés toxiques du milieu, pourraient non seulement être utilisées en tant que marqueurs de la toxicité du milieu, mais aussi en tant qu'outil de stabilisation des polluants.

Les semences d'*Atriplex halimus* L. sont exposées à 50-4000 μM de Cd, de Cu et de Zn pour étudier l'effet de ces trois métaux sur la germination et la croissance des jeunes plantules. Les résultats ont montré que le stade de la germination est plus résistant au stress métallique que le stade de la croissance. Le Cd a montré la toxicité la plus élevée entre les trois métaux utilisés, et parmi les paramètres physiologiques, la longueur des racines semble être le meilleur indicateur de la toxicité métallique.

Pour comprendre les mécanismes de toxicité et de tolérance d'*A. halimus* au stress des métaux lourds, les plantules, âgées de 70 jours, sont traitées en conditions hydroponiques par 50, 200, 400, 650 et 1350 μM de Cd pendant 23 jours. La croissance, exprimée en masse sèche, longueur des pousses, surface foliaire, taux de croissance relative, et la photosynthèse, exprimée en photosynthèse nette, teneur en pigments et fluorescence chlorophyllienne ont été significativement réduits avec l'augmentation du Cd. Cependant, les activités des enzymes antioxydantes ont été induites par le Cd. L'exposition au Cd a perturbé aussi la nutrition minérale. La tolérance d'*A. halimus* au stress de Cd pourrait être liée à sa capacité à éviter la translocation de ce métal vers les parties aériennes et l'induction de ses enzymes antioxydantes.

Mots-clés : germination ; photosynthèse ; fluorescence chlorophyllienne ; stress oxydatif ; enzymes antioxydantes.

Abstract

Contaminations by heavy metals coming from various anthropic activities affected the ecosystems and the human health. Indeed, these elements, which are non biodegradable, are highly ecotoxic and could be implied in different human diseases. It is today essential not only to better know the effects of these pollutants on the living organisms, but also to develop adapted solutions, in order to limit the risks. In this context, plants are really interesting. Indeed, plants, which are directly confronted with the toxic compounds of the medium, could be not only used as biomarkers of toxicity of the medium, but also as a tool for stabilization of the pollutants.

Atriplex halimus L. seeds were exposed to 50-4000 μM of Cd, Cu and Zn to study the effect of these metals on germination and seedlings growth. Results showed that the germination stage is more resistant to metal stress than seedling growth. Cd showed the highest toxicity among the three metals used, and among the physiological parameters, root length seems to be the best indicator of metal toxicity.

To understand the mechanisms of toxicity and tolerance of *A. halimus* to heavy metal stress, seedlings 70 days old were cultivated hydroponically and treated by 50, 200, 400, 650 and 1350 μM of Cd for 23 days. Growth, expressed as dry mass, shoot length, specific leaf area, relative growth rate and photosynthesis, expressed as net photosynthetic rate, stomatal conductance, pigments contents and chlorophyll fluorescence were significantly reduced by increasing Cd concentration. However, the activities of antioxidative enzymes were induced by Cd. Exposures to Cd disturbed also mineral nutrition. The tolerance of *A. halimus* to Cd stress might be related with its capacity to avoid the translocation of great amounts of Cd in its aboveground tissues and higher activities of enzymatic antioxidants in the leaf.

Key words: germination; photosynthesis; chlorophyll fluorescence; oxidative stress; antioxidative enzymes.