

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique

## Université Constantine 1



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département de Biochimie et BMC

### Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de Master en Biochimie  
Option: Analyse Protéomique et Santé

**Etude de l'activité de la peroxydase (POD) et de la catalase  
(CAT) chez *Lens culinaris* contaminée par le cadmium**

Préparé par:

*Bounab Sarah*

*Sahli Imene Nour El Houda*

Soutenu le 26 Juin 2014

Jury de soutenance:

Prèsident : NOUADRI T.

M.C.A., Université Constantine 1.

Encadreur : MECHAKRA A.

Professeur, Université Constantine 1.

Examineur : BOUKHALFA H.

M.A.A., Université Constantine 1.

Année Universitaire 2013-2014

# *Remerciements*

En premier lieu, nous tenons à remercier notre DIEU, notre créateur pour nous avoir donné la force pour accomplir ce travail.

On souhaite adresser nos remerciements les plus sincères aux personnes qui nous ont apporté leur aide et qui ont contribué à l'élaboration de ce mémoire ainsi qu'à la réussite de cette formidable année universitaire.

On tient à remercier sincèrement Mme A.Mechakra, qui, en tant que Encadreur de mémoire, nous a donné la possibilité de réaliser ce travail au sein de laboratoire de Biologie et Environnement (LBE), pour la confiance, pour ses précieux conseils de tout ordre, sa disponibilité, sa patience et sa gentillesse. S'est toujours montré à l'écoute tout au long de la réalisation de ce mémoire, ainsi pour l'inspiration, l'aide et sans qui ce mémoire n'aurait jamais vu le jour.

Nous remercions Mr T. NOUADRI, Docteur à l'Université de Constantine 1 qui a accepté de présider le jury de ce mémoire.

Nous remercions Mme H. BOUKHALFA, Docteur à l'Université de Constantine 1 qui a accepté de juger ce travail.

Nos remerciements s'adressent également à Mlle Asma Benhamdi pour son précieux temps, sa générosité, ses conseils son aide et la grande patience dont elle a su faire preuve malgré ses charges.

On exprime notre gratitude à toutes les personnes rencontrées lors des recherches effectuées et qui ont accepté de répondre à nos questions avec gentillesse.

Enfin, on adresse nos plus sincères remerciements à tous nos proches et amis, qui nous ont toujours soutenue et encouragées au cours de la réalisation de ce mémoire

*Merci à tous et à toutes*

## *IMENE NOUREL HOUDA*

*Je dédie ce memoire :*

*A mes chers parents : MOUHAMED et BAYA*

*A ma chère sœur IBTIHAL et mon cher frère YOUSRI*

*A tous les membres de ma famille SAHLI et LABED*

*A tous mes collègues et amis*

*A ma proche et meilleures amie RANDA*

*A ma collaboratrice dans ce travail : SARAH*

*A mon co-encadreur Mlle Asma Benhamdi qui n'a pas de  
m'aider et m'encourager sagment aux moments de détresse*

*Et*

*A tous les étudiants d'Analyse Proteomique et Santé LMD.*

## *Dédicace*

*Avec l'aide du tout Puissant, j'ai pu réaliser ce modeste travail  
que je dédie :*

*A mes chers parents sur qui j'ai pu compter et me resourcer  
d'affection et de bénédictions durant toute ma vie ;*

*A ma belle sœur Mina, a mes deux frères, Abdel-Raouf, Hamza et  
qui m'ont beaucoup soutenue et encouragée ;*

*A mon co-encadreur Mlle Asma Benhamdi qui n'a pas cessé de  
m'aider et  
m'encourager sagement aux moments de détresse ;*

*A mes chers amis : B.Maha, B.Hannen, M, Imene, mes cousine  
Nihad, Nedjoua et Meriem ;*

*Biensur a mo collaboratrice Imene Nour El Houda*

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

◻ Sarah Bounab ◻

# *Sommaire*

INTRODUCTION	1
<b>Synthèse bibliographique</b>	
<b>1. Le stress oxydant</b>	2
1.1. Les radicaux libres	2
1.1.1. Les différents radicaux libres oxygénés	2
1.1.2. Origine et destinée des ROS	3
1.1.3. Marqueurs du stress oxydatif et Principales cibles biologiques des ROS	5
1.1.3.1. L'acide désoxyribonucléique ou ADN	5
1.1.3.2. Les protéines	5
1.1.3.3. Les lipides membranaires	5
1.2. Les défenses anti-oxydantes	6
1.2.1. Antioxydants enzymatiques	6
1.2.2. Antioxydants non enzymatiques	7
1.2.2.1. Vitamine E	7
1.2.2.2. <i>Vitamine C (acide ascorbique)</i>	7
1.2.2.3. Glutathion	7
1.3. Facteurs favorisant le stress et son implication dans les pathologies	7
1.4. Le stress oxydant chez les plantes	8
1.4.1. Système antioxydant	10
1.4.2. Catalase	12
1.4.3. Peroxydase	12
<b>2. Les métaux lourds</b>	15
2.1. Définition	15
2.2. Origine des métaux lourds et contamination de l'environnement	15
2.3. Le cadmium	15
2.3.1. Les risques de la toxicité du cadmium sur la santé humaine	16
2.3.2. Origine anthropique	16
2.3.2.1. Rejets d'origine industrielle	16
2.3.2.2. Les pratiques agricoles	16
2.4. Le cadmium et les plantes	17
2.4.1. Phytotoxicité du cadmium	17
2.4.2. Effet du cadmium sur la croissance	17
2.4.3. Effets sur les processus métaboliques	17
2.4.4. Induction d'un stress oxydatif par le cadmium	18
2.5. Réponses des plantes au cadmium	18
2.5.1. Absorption	18
2.5.2. Chélation, séquestration	19
2.5.3. Translocation	19

<b>Matériel et Méthodes</b>	20
1. Matériel végétal et conditions de culture	20
1.1. Préparation des pots	20
1.2. Préparation des graines	20
2. Traitement métallique par le cadmium (Cd)	20
3. Extraction	21
3.1. Broyage	21
3.2. Extraction proprement dite	21
4. Dosage des enzymes antioxydantes et des protéines	21
4.2. La catalase (CAT)	21
4.3. La peroxydase (POD)	22
4.4. Dosage des protéines	22
5. Analyse des résultats	22
<b>Résultats et Discussion</b>	23
1. Effet du Cd sur la croissance des plantules	23
1.1. Résultats du premier essai	23
1.2. Résultats du deuxième essai	24
2. Effet du Cd sur le système antioxydant	28
2.1 Effet du Cd sur l'activité de la peroxydase	28
2.2. Effet d Cd sur l'activité de la CAT	29
<b>Conclusion</b>	34
<b>Références bibliographiques</b>	

## ABREVIATIONS

ADN	: Acide DésoxyréboNucléique
APX	: Ascorbate PeroXydase
BSA	: Bovin Serum Albumin
CAT	: Catalase
Chl	: Chlorophylle
DHAR	: DéHydroAscorbate Réductase
GPX	: Glutathion PeroXydase
GR	: Glutathion Réductase
GSH	: Glutathion sous forme réduite
GSSG	: Glutathion sous forme oxydée
GST	: Glutathion –S- Transférase
LDL	: Low Density Lipoprotéine
MDHAR	: MonoDéhydroAscorbate Réductase
NAD	: Nicotinamide Adénine Dinucléotide
NADPH	: Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
POD	: Peroxydase
ROS	: Reactive Oxygen Species
SOD	: Super Oxyde Dismutase
UV	: UltraViolet
Vit	: Vitamine

## **Liste de tableaux**

Tableau 1- Différents radicaux libres oxygénés.

Tableau 2- Les antioxydants enzymatiques.

Tableau 3- Sources d'espèces réactives de l'oxygène lors du fonctionnement cellulaire intrinsèque chez les plantes.

Tableau 4- Rôle et localisation subcellulaire des principaux antioxydants enzymatiques.

Tableau 5- les antioxydants non enzymatiques.

Tableau 6- Représente les applications de la CAT et de la POD.

## Liste des figures

- Figure 1- Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqué en biologie
- Figure 2- Effet du Cd sur le phénotype des plantules de *lens culinaris* (lentilles) après 29 jours.
- Figure 3- La moyenne de la croissance des parties aériennes après 7jours.
- Figure 4- La moyenne de la croissance des parties aériennes arrosées a l'eau distillée (pH 4.5) pendant 7jours.
- Figure 5- Effet du Cd sur de la croissance des plantules après 7jours
- Figure 6- Effet de Cd sur l'activité enzymatique du POD.
- Figure 7- Effet du Cd sur l'activité enzymatique du CAT

# *Introduction*

## **INTRODUCTION**

Actuellement, de nombreux problèmes de pollution de l'environnement sont générés par les émissions industrielles et les déchets urbains liés aux activités humaines. Ils résident dans la contamination du sol, de l'eau et de l'air par divers composants organiques et inorganiques [1 ; 2]. Les substances polluantes présentes dans le sol sont nombreuses ; les plus répandues sont les hydrocarbures, les solvants, les pesticides, les matières plastiques, l'amiante et les métaux lourds.

Parmi les polluants inorganiques du sol, les métaux peuvent représenter un danger pour les êtres vivants. Si certains éléments (oligo-éléments), présents à l'état de traces, sont essentiels pour l'organisme, d'autres éléments tels que le plomb, le mercure, le cadmium et l'arsenic, peuvent provoquer des effets toxiques [3].

L'un des mécanismes impliqués dans la toxicité des métaux est l'induction d'espèces réactives oxygénées (ROS) [4], c'est-à-dire, des molécules réactives contenant de l'oxygène produit dans les réactions d'oxydoréduction [5]. La formation de ROS résulte du stress oxydatif qui crée un état de déséquilibre entre la défense anti-oxydante et la production des radicaux [6]. Ces derniers peuvent causer des dommages oxydatifs aux membranes lipidiques, à l'ADN et les protéines, et leur oxydation peut conduire à un dysfonctionnement cellulaire et une lésion tissulaire [7 ; 8]. Ces réactions se traduisent par une modification des activités des enzymes antioxydantes (glutathion peroxydase, GPx; superoxyde dismutase, SOD, catalase, CAT) et soutiennent indirectement le système de défense antioxydant en catalysant la conjugaison des polluants avec GSH (glutathion-S-transférase, GST) [9].

Dans le but de définir et de mesurer les effets des polluants sur un écosystème, nous avons étudié les réponses antioxydatives d'une plante (*Lens culinaris*) provoquées par le cadmium présent dans le sol. Pour cela, nous avons dosé les activités de la peroxydase (POD) et de la catalase (CAT) dans les parties aériennes et les racines de la plante cultivée *in-vitro*

## 1. Le stress oxydant

L'oxygène, molécule indispensable à la vie, est susceptible d'entraîner des effets dommageables dans l'organisme via la formation de radicaux libres et d'espèces oxygénées activées (ROS). C'est vers le milieu des années 50 que ces notions ont été évoquées par Gerschman et Hartman pour expliquer le processus de vieillissement et son lien avec la toxicité de l'oxygène et la «free radical theory». En 1969, les Américains McCord et Fridovich isolent à partir de globules rouges humains, un système enzymatique antioxydant, la superoxyde dismutase (SOD), capable d'éliminer l'anion superoxyde, démontrant ainsi pour la première fois, que notre organisme produit des ROS.

Dans les systèmes biologiques, le stress oxydant est un déséquilibre entre la production et la destruction des radicaux libres par des systèmes de défenses anti-oxydantes. Les radicaux libres sont une forme particulière d'espèces chimiques (atomes ou molécules) qui possèdent un électron célibataire (ou non apparié) [10], [11].

### 1.1. Les radicaux libres

#### 1.1.1. Les différents radicaux libres oxygénés

**Tableau 1-Différents radicaux libres oxygénés**

Le radical	La réaction	Références
l'anion superoxide	$O_2 + e^- \Rightarrow O_2^{\cdot-}$ $ONOO^- + H^+ \rightarrow \cdot OH + NO_2^{\cdot}$	[12],[13]
le peroxyde d'hydrogène H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	$2O_2^{\cdot-} + 2H^+ \Rightarrow H_2O_2 + O_2$	[14],[12]
le radical hydroxyle •OH	$O_2^{\cdot-} + H_2O_2 \rightarrow \cdot OH + \cdot OH + O_2$	[12],[15]
Oxyde nitrique		[16],[17]
Peroxynitrite	$O_2^{\cdot-} + NO^{\cdot} \rightarrow OONO^-$	[18]

### **1.1.2. Origine et destinée des ROS**

Le dioxygène est une molécule bi-radicalaire susceptible de récupérer quatre électrons, mais ses capacités oxydantes sont limitées par une barrière cinétique importante. En présence de rayonnements de métaux ou d'enzymes, il est capable de capter un électron pour donner le radical superoxyde  $O_2\cdot$  qui est un radical modérément réactif [19].

Ce radical est le substrat essentiel des enzymes, les superoxydes dismutases (SOD), qui le transforment en eau oxygénée ( $H_2O_2$ ). Celle-ci peut avoir plusieurs destinées. En présence de métaux, elle est transformée en radical  $\cdot OH$  par la réaction de Fenton. Ce dernier est extrêmement réactif et va oxyder très rapidement les molécules voisines, formant parfois d'autres radicaux libres [20 ; 21] (**Figure-1**).

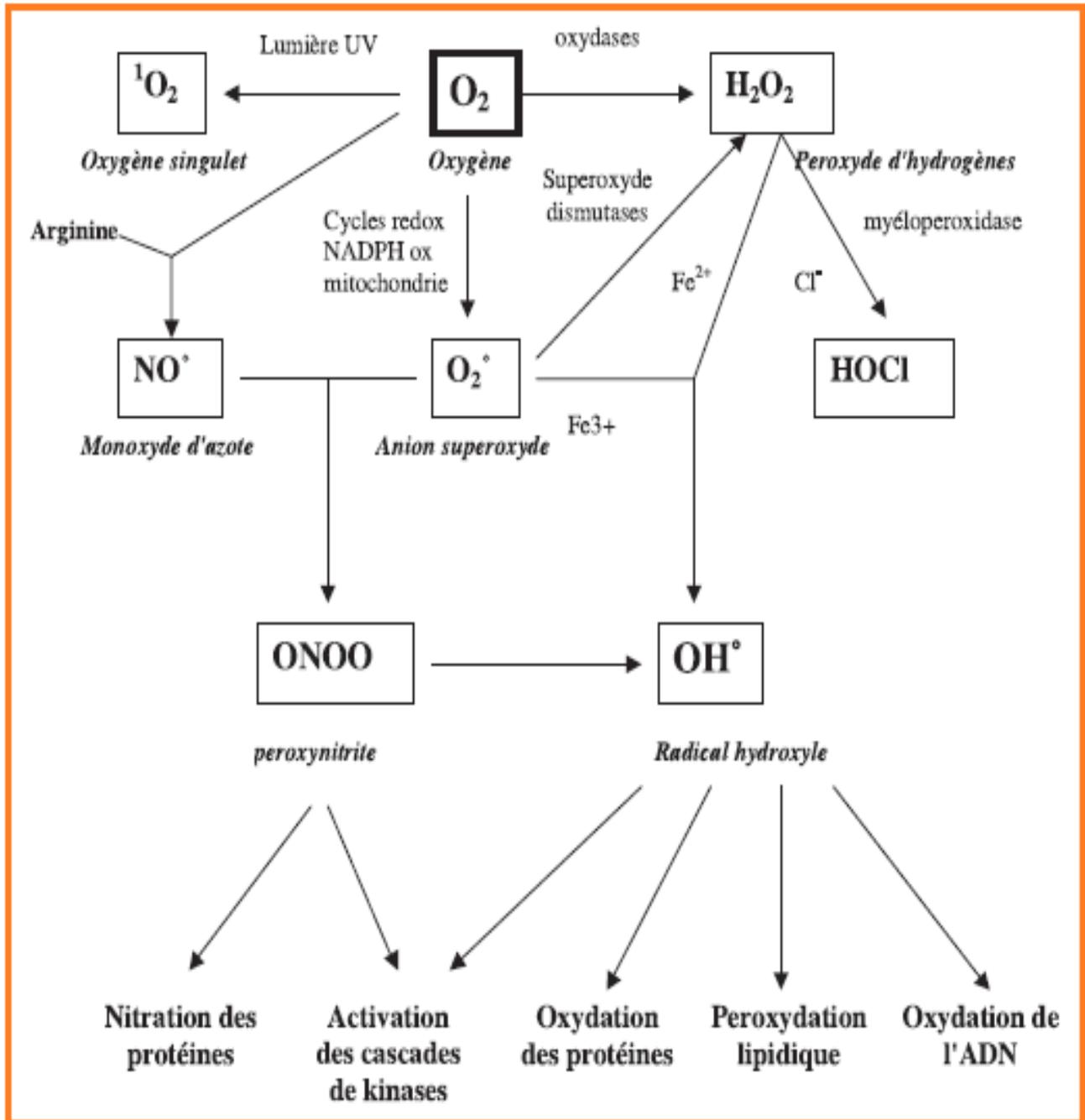


Figure 1- Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l’oxygène impliqué en biologie [22]

### **1.1.3. Marqueurs du stress oxydatif et Principales cibles biologiques des ROS**

#### **1.1.3.1. L'acide désoxyribonucléique ou ADN**

L'ADN est une cible privilégiée pour les ROS qui entraînent des mutations et conduisent à des altérations du message génétique impliquées dans le déclenchement du cancer et le vieillissement [23].

#### **1.1.3.2. Les protéines**

Les deux principaux marqueurs biologiques de l'oxydation des protéines sont la formation de carbonyles protéinés et de groupes nitrotyrosines. Les carbonyles protéinés et les nitrotyrosines sont tous deux très stables et ne sont pas généralement retrouvés chez les patients, faisant d'eux des marqueurs biologiques utiles et fiables [24].

L'attaque radicalaire d'un acide aminé provoque l'oxydation de certains résidus avec, pour conséquences, l'apparition de groupements carbonylés, des clivages de chaînes peptidiques et des ponts bi-tyrosine intra- et inter-chaînes. La plupart des dommages sont irréparables et peuvent entraîner des modifications fonctionnelles importantes. Certaines protéines oxydées sont peu dégradées et forment des agrégats qui s'accumulent dans les cellules et dans le compartiment extracellulaire [23].

#### **1.1.3.3. Les lipides membranaires**

Les lipides membranaires peuvent être altérés par le radical hydroxyle, ce qui conduit à la mort cellulaire [23].

Les principaux marqueurs de la peroxydation lipidique sont les substances régissantes aux malonaldéhyde/acide thiobarbiturique, les diènes conjugués, les hydro peroxydes lipidiques et les isoprostanes [25].

L'attaque radicalaire des lipoprotéines circulantes aboutit à la formation de LDL oxydées, qui seront captées par des récepteurs spécifiques des macrophages. Les macrophages se transforment petit à petit en cellules spumeuses (rôle important dans les premières étapes de l'athérosclérose) [26].

## 1.2. Les défenses antioxydants

### 1.2.1. Antioxydants enzymatiques

On cite parmi les quelles superoxide dismutase, catalase, glutathion réductase, monodéhydroascorbate réductase, ascorbate peroxydase, gaïacol peroxydase.

**Tableau 2-Les antioxydants enzymatiques**

Enzyme	Réaction	Reference
Superoxide dismutase (SOD)	$2\text{O}_2^- + 2\text{H}_3\text{O}^+ \longrightarrow \text{O}_2 + 2\text{H}_2\text{O} + 2\text{H}_2\text{O}$	[27 ; 28]
Catalase (CAT)	$2\text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow \text{O}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$	[29 ; 30]
Glutathion-S-transférase	$\text{GSH} + \text{R-X} \longrightarrow \text{GSH} + \text{HX}$	[31 ; 32]
Gaïacol peroxydase (GPX)	$2\text{H}_2\text{O}_2 + 4 \text{ gaïacol (2 méthoxy phénol) } \xrightarrow{\text{GPX}} \text{ Tétragaïacol } + 8\text{H}_2\text{O}$	[33]
Ascorbate peroxydase (APX)	$\text{H}_2\text{O}_2 + 2 \text{ ascorbate } \xrightarrow{\text{APX}} 2\text{monohydroascorbate} + 2\text{H}_2\text{O}$	[34]
Monodéhydro-ascorbate réductase (MDHAR)	$\text{monodéhydroascorbate} + 2\text{NAD} \xrightarrow{\text{MDHAR}} \text{Ascorbate} + 2\text{NAD}^+$	[35]
Glutathion réductase (GR)	$\text{GSSG} + 2 \text{ NADPH } \xrightarrow{\text{GR}} \text{GSH} + 2 \text{ NADP}^+$	[36 ; 37]

### **1.2.2. Antioxydants non enzymatiques**

Certaines substances ont la propriété de piéger et de détruire les espèces réactives de l'oxygène. Il s'agit de composés facilement oxydables présents dans le cytoplasme (glutathion, acide ascorbique) ou dans les membranes cellulaires (vitamine E, caroténoïdes).

#### **1.2.2.1. Vitamine E**

La vitamine E regroupe la famille des tocophérols ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ ). A cause de son caractère hydrophobe, elle peut s'insérer au sein des acides gras de la membrane cellulaire et les lipoprotéines. Elle joue un rôle protecteur en empêchant la propagation de la peroxydation lipidique induite par un stress oxydant [38].

#### **1.2.2.2. Vitamine C (acide ascorbique)**

C'est l'un des principaux antioxydants hydrosolubles présents dans les fluides intra- et extracellulaires. La vit C peut directement réagir avec des espèces réactives de l'oxygène comme HO• ou O<sub>2</sub>• [38].

#### **1.2.2.3. Glutathion**

En situation de stress oxydant, le rôle protecteur et détoxifiant du glutathion réside principalement dans sa fonction de co-substrat des glutathion peroxydases. Mais il fait aussi l'objet d'interactions synergiques avec d'autres composants du système de protection antioxydante tels que la vit C, la vit E et les superoxydes dismutases [39].

### **1.3. Facteurs favorisant le stress oxydant et son implication dans les pathologies**

Les sources de stress oxydant peuvent avoir diverses origines, .... endogènes comme la xanthine oxydase, oxydation de l'hémoglobine et exogènes (mode de vie : tabagisme, alcool ; environnement : pollution radiation) [23].

Le stress oxydant représente un des facteurs potentialisant la genèse de maladies plurifactorielles telles que les maladies cardiovasculaires, les rhumatismes, le cancer et les maladies neurodégénératives. L'augmentation de la peroxydation lipidique est observée au stade précancéreux chez des femmes atteintes de dysplasie mammaire ou cervicale [40].

L'activité de l'enzyme Mn-SOD est augmentée dans la muqueuse des malades atteints d'adénocarcinome de l'estomac, sans doute en réaction à la présence excessive des ROS [41].

La maladie d'Alzheimer survient suite à une augmentation de la peroxydation lipidique, de l'oxydation des protéines [42], une altération de l'ADN mitochondrial [43] et une augmentation de l'activité de la Cu/Zn SOD [44].

La maladie de Parkinson peut être due à la diminution de la quantité du glutathion réduit (GSH) et de l'activité du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale [45 ; 46].

#### **1.4. Le stress oxydant chez les plantes**

Chez les végétaux, le stress oxydant peut être provoqué par des variations trop brutales de l'environnement (sécheresse, exposition au froid, chaleur, rayons UV, ...) [47]. Il peut également être de nature biotique comme l'attaque par des insectes et des animaux. Ces facteurs vont bouleverser le métabolisme de la plante, conduisant à la formation de composés réactifs qui peuvent induire différentes réactions au niveau des organites cellulaires par divers processus [35] (voir tableau 3).

**Tableau 3-Sources d'espèces réactives de l'oxygène lors du fonctionnement cellulaire intrinsèque chez les plantes [48]**

Site cellulaire	ROS produit	Processus	Réactions
Chloroplaste	$^1\text{O}_2$	Excitation de la chlorophylle	$\text{Chl}^* + \text{O}_2 \longrightarrow \text{Chl} + ^1\text{O}_2$
	$\text{O}_2\cdot^-$	Transfert d'électrons photosynthétique	$\text{Ferrédoxine} + \text{O}_2 \longrightarrow \text{Ferrédoxine} + \text{O}_2\cdot^-$
	$\text{H}_2\text{O}_2$	Superoxyde dismutase	$\text{O}_2\cdot^- \longrightarrow \text{H}_2\text{O}_2$
Mitochondrie	$\text{O}_2\cdot^-$	Transfert d'électrons de la respiration	
	$\text{H}_2\text{O}_2$		$\text{O}_2\cdot^- \longrightarrow \text{H}_2\text{O}_2$
Peroxisome	$\text{O}_2\cdot^-$	Xanthine oxydase	$\text{Xanthine} + \text{O}_2 \longrightarrow \text{acide urique} + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2\cdot^-$
	$\text{O}_2\cdot^-$	Transfert d'électron : régénération $\text{NAD}^+$ et $\text{NADP}^+$	
	$\text{H}_2\text{O}_2$	Superoxyde dismutase	$\text{O}_2\cdot^- \longrightarrow \text{H}_2\text{O}_2$
	$\text{H}_2\text{O}_2$	Photorespiration	$2\text{Glycolate} + \text{O}_2 \longrightarrow 2\text{Glyoxylate} + \text{H}_2\text{O}_2$
	$\text{H}_2\text{O}_2$	Métabolisme de l'urée	$\text{Acide urique} + \text{O}_2 \longrightarrow \text{Allantoin} + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{CO}_2 + \text{O}_2\cdot^-$
Reticulum endoplasmique	$\text{O}_2\cdot^-$	Détoxication cellulaire	<b>Oxydation, hydroxylation, désamination, déhalogénéation et désaturation.</b>

#### **1.4.1. Système antioxydant**

Le système antioxydant se compose de deux groupes de molécules de dégradation, enzymatiques et non-enzymatiques. Le premier englobe SOD, CAT, APX, DHAR, MDHAR et GPX ; le deuxième comprend le glutathion, et les caroténoïdes.

**Tableau 4- Rôle et localisation subcellulaire des principaux antioxydants enzymatiques [48]**

Enzyme antioxydante	cibles	Produit finale	Localisation	Références
<i>Superoxyde dismutase (SOD) EC 1.15.1.1</i>	$O_2^{\cdot-}$	$H_2O_2$	Chloroplaste, mitochondrie, Peroxysome, apoplaste et cytosol	[49]
<i>Catalase (CAT) EC 1.11.1.6</i>	$H_2O_2$	$H_2O$	Peroxysome, cytosol	[50]
<i>Ascorbate peroxydase (APX) EX 1.11.1.11</i>	$H_2O_2$	$H_2O$	Chloroplaste, mitochondrie, Peroxysome, apoplaste et cytosol	[51 ; 52]
<i>Déhydroascorbat réductase (DHAR) EC 1.8.5.1</i>	<b>DHA</b>	<b>Asc</b>	Cytosol,plaste	[53]
<i>Monodéhydroascorbat e réductase (MDHAR) EC 1.6.5.4</i>	<b>MDA</b>	<b>Asc</b>	Stroma, plaste	[53]
<i>Gluthation peroxydase (GPX) EC 1.11.1.9</i>	<b><math>H_2O_2RO</math></b> <b>OH</b>	<b><math>H_2O_2RO</math></b> <b>H</b>	Cytosol,Chloroplaste, mitochondrie,apoplaste, peroxysome	[54]

**Tableau 5- les antioxydants non enzymatiques**

<b>Le glutathion</b>	Il est important car c'est le substrat de plusieurs enzymes antioxydantes [55]. Il peut également régénérer la vitamine E [56] et réagir avec les radicaux $HO^{\cdot}$ et $O_2^{\cdot-}$ directement et ainsi casser la chaîne d'oxydation [57].
<b>Les caroténoïdes</b>	des molécules liposolubles. Leur potentiel antioxydant pour lutter contre la peroxydation lipidique a été démontré très tôt [58] et ils sont capables de réagir avec les radicaux libres [57].

Parmi les enzymes de stress oxydant, nous nous sommes intéressés à la catalase et la peroxydase

### **1.4.2. La catalase**

La catalase est une enzyme commune dans presque tous les organismes vivants exposés à l'oxygène [59]. Elle joue un rôle très important dans la protection de la cellule contre les dommages oxydatifs par des ROS et possède l'un des nombres les plus élevés de turnover de toutes les enzymes ; une molécule de catalase peut convertir des millions de molécules de peroxyde d'hydrogène en eau et oxygène chaque seconde [60].

L'enzyme est un tétramère contenant quatre groupes de porphyrine hème (fer) qui lui permettent de réagir avec le peroxyde d'hydrogène. Son pH optimal varie entre 6.8 et 7.5 et sa température de 45 ° C [61 ; 62]

Le rôle cellulaire de la catalase est de convertir rapidement le peroxyde d'hydrogène, un sous-produit nocif de nombreux processus métaboliques, en d'autres substances moins dangereuses afin d'éviter d'endommager les cellules et les tissus [62]. Une carence en catalase peut augmenter la probabilité de développer un diabète de type 2 [63].

La catalase se trouve généralement dans les peroxysomes, soit, les cellules végétales impliquées dans la photorespiration (l'utilisation de l'oxygène et la production de dioxyde de carbone) et la fixation symbiotique de l'azote [64]. Elle est appliquée dans la production du fromage et d'autres applications voir tableau 5.

### **1.4.3. La Peroxydase**

La superfamille dite des « peroxydases de plantes, champignons et bactéries » [65] est composée de protéines présentant toutes une structure tridimensionnelle similaire [66; 67]. Elles réduisent l'eau oxygénée en eau, mais oxydent des substrats très divers. La superfamille est séparée en trois classes qui diffèrent principalement par leur séquence peptidique primaire. Les peroxydases sont des glycoprotéines contenant de la ferriprotoporphyrine IX comme groupe prosthétique et du calcium ; elles sont majoritairement présentes dans les parois [68 ; 69] et jouent de grands rôles dans la croissance, le développement et le système de défense des plantes.

Les peroxydases de la classe III, présentes chez les plantes, sont capables d'agir à partir de l'oxygène seul pour oxyder l'auxine [70 ; 71] selon la réaction suivante :



Les peroxydases exercent des fonctions diversifiées dans les plantes. Elles utilisent l'eau oxygénée comme accepteur d'électrons provenant de diverses molécules, tels les précurseurs de la lignine ou des phénols (flavonoïdes ou autres). En plus, elles peuvent catalyser l'oxydation de quelques molécules en présence d'oxygène. C'est le cas de l'auxine (acide 3-indolylacétique), une des hormones contrôlant la croissance et le système de défense des plantes [72].elle a plusieurs applications comme la dégradation de certains colorants des rejets industriels (voir tableau 5)

**Tableau 6-Les applications de la CAT et de la POD**

Catalase	Peroxydase
Elimination du peroxyde d'hydrogène à partir de lait avant la production fromage [73].	Dégradation de certains colorants des rejets industriels [77].
Utilisation dans des emballages de produits alimentaires [74].	Utilisé lors d'actions de dépollution en précipitant les composés phénoliques [78].
Un usage limité dans l'hygiène des lentilles de contact [75].	Traitement contre le cancer en utilisant la spécificité de l'oxydation de l'AIA (Acide $\beta$ indole acétique) [79].
Outil pour l'apprentissage de l'effet des enzymes sur les vitesses de réaction.	Utilisé comme biomarqueur dans l'apparition de certains cancers en activant certaines molécules cancérogènes [80].

## **2. Les métaux lourds**

### **2.1. Définition**

Le terme de métaux lourds est arbitraire et imprécis. Il est utilisé pour des raisons de simplicité et il recouvre des éléments ayant des propriétés métalliques (ductilité, conductivité, densité, stabilité des cations, spécificité de ligand...) [81].

Sous cette appellation figurent des éléments qui, pour certains, sont effectivement des métaux tels que Ni, Cu, Zn, Pb, Hg, Al... mais aussi des métalloïdes tels que chrome, zinc, cuivre, nickel, plomb, arsenic, cadmium et mercure [82].

### **2.2. Origine des métaux lourds et contamination de l'environnement**

Les métaux lourds sont des constituants naturels de tous les écosystèmes et on les trouve dans l'atmosphère, l'hydrosphère, la lithosphère et la biosphère. Leur distribution dans l'environnement procède de deux origines :

L'une, naturelle est le résultat de processus géogéniques comme l'érosion, les précipitations géochimiques de roches [83 ; 84].

L'autre, relève des activités anthropogéniques, provoquées par les activités industrielles, et aussi via des solides organiques tels les boues d'assainissement, le compost, les fertilisants et les pesticides, etc [85].

### **2.3. Le cadmium**

Le cadmium est un métalloïde non essentiel au développement des organismes des animaux ou végétaux. En revanche, ses propriétés physiques et chimiques, proches de celles du zinc et du calcium, lui permettent de traverser les barrières biologiques et de s'accumuler dans les tissus. La croûte terrestre renferme en moyenne de 0,1 à 0,2 mg de cadmium par kg de sol sec, avec des différences importantes selon l'origine des sols. Les gisements sédimentaires jouent un rôle déterminant dans l'accumulation du cadmium, avec dans certains sites, des teneurs pouvant atteindre 300 mg/Kg [86]

### **2.3.1. Risques de la toxicité du cadmium sur la santé humaine**

Le cadmium est identifié comme un polluant extrêmement toxique. Dans le cas d'une accumulation du cadmium dans les strates superficielles des sols, il peut être absorbé par les plantes, ce qui représente un problème majeur pour la santé humaine. Une exposition au cadmium entraîne un grand nombre d'effets nocifs, les lésions rénales et le cancer figurant parmi les plus graves [87].

Une analyse des concentrations des métaux lourds dans les produits alimentaires en France montre que la contribution des végétaux dans la contamination alimentaire est importante, elle dépasse 60 % de la totalité ingérée par les individus non-fumeurs [88].

### **2.3.2 Origine anthropique**

Les pratiques humaines (industrielles ou agricoles) conduisent aussi à l'enrichissement des sols en cadmium.

#### **2.3.2.1. Rejets d'origine industrielle**

Le cadmium se retrouve dans les déchets industriels stockés sur des anciennes friches industrielles ainsi que dans les produits en fin de vie comme les batteries et les piles à Cd/Ni et les effluents liquides issus des usines. Les retombées atmosphériques provenant de l'activité industrielle et du trafic urbain favorisent également la pollution des sols et des eaux de surface et souterraines par le cadmium. Ces facteurs représentent la source principale de contamination dans les zones urbaines [89].

#### **2.3.2.2. Pratiques agricoles**

Les produits chimiques utilisés en agriculture, tel que les fongicides, les insecticides, les herbicides peuvent contenir plusieurs métaux toxiques comme Cu, Cd, Zn et Pb et peuvent donc contribuer à la contamination des terres agricoles. D'autre part, l'utilisation répétée d'eaux usées peut aussi contribuer à l'accumulation de ce métal dans les sols ; en effet, ces eaux contiennent du cadmium à des concentrations plus élevées que les eaux normales [89].

## **2.4. Le cadmium et les plantes**

Le cadmium constitue le quatrième métal le plus toxique pour les plantes vasculaires. Cependant, la sensibilité au cadmium varie suivant les espèces et même les cultivars d'une même espèce. Un nombre restreint de plantes tolèrent et/ou accumulent de fortes teneurs du Cd, mais toutes les plantes manifestent des symptômes de toxicité qui apparaissent également chez les plantes tolérantes pour de plus fortes concentrations en métal [90 ; 91 ; 92].

### **2.4.1. Phytotoxicité du cadmium**

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 [93 ; 94].

### **2.4.2. Effet du cadmium sur la croissance**

L'effet du cadmium sur la plante se manifeste par une réduction de la croissance des parties aériennes et des racines [95] affectant ainsi la production de la biomasse. Ces effets peuvent être liés à la perturbation de l'équilibre de certaines hormones de croissance, notamment l'auxine [96], à une action délétère du cadmium sur la composition des parois cellulaires [97], ainsi qu'à des perturbations de la machinerie photosynthétique, notamment la structure des chloroplastes et la biosynthèse de la chlorophylle [98 ; 99]. Il est important de noter que le cadmium n'affecte pas la croissance de toutes les plantes avec la même sévérité, certaines espèces végétales sont capables de croître et de se développer [100].

### **2.4.3. Effets sur les processus métaboliques**

L'inhibition de la croissance par le cadmium s'explique par l'altération de l'équilibre hydrique de la plante ou/et effets directs et indirects sur la photosynthèse, [101 ; 102]. Le cadmium peut induire une réduction de la teneur en chlorophylle [103]. Dans certains cas, la disponibilité en CO<sub>2</sub> peut être réduite par un abaissement de la conductance des stomates observée [104].

#### **2.4.4. Induction du stress oxydatif par le cadmium**

Le cadmium peut induire un stress oxydatif, en effet, sa présence dans les plantes provoque la production des radicaux libres (ROS), capables d'endommager les structures cellulaires [105 ; 106].

Parmi ces radicaux, le peroxyde d'hydrogène inhibe certaines enzymes du cycle d'assimilation photosynthétique du carbone (cycle de Calvin-Benson) [107] ; les radicaux libres OH<sup>•</sup> sont capables d'arracher des électrons aux macromolécules organiques cellulaires, provoquant ainsi la peroxydation des lipides membranaires, la destruction des protéines et la dénaturation de l'ADN et les formes actives de l'oxygène singulier (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) entraînent une inhibition de la photosynthèse [55].

Chez les plantes, le cadmium inhibe ou stimule les activités des enzymes de défense. Ces modifications diffèrent selon l'espèce étudiée, l'organe, l'âge de la plante et la concentration du cadmium utilisée [108 ; 109 ; 110 ; 111].

### **2.5. Réponses des plantes au cadmium**

Les plantes réagissent à la pollution par Cd par différents phénomènes ; l'absorption, la translocation, la chélation et la séquestration.

#### **2.5.1. L'absorption**

Le cadmium dissous, présent dans la plupart des sols dans la gamme de concentrations des nanomoles [112], est absorbé par les racines selon sa concentration dans sol et sa disponibilité biologique. Cette dernière peut être influencée par le pH du sol, le contenu en matières organiques et la concentration des autres éléments minéraux. Le transport membranaire du cadmium dans les cellules est alors vraisemblablement réalisé par des transporteurs d'autres ions divalents en particulier du fer et du zinc ; et les canaux à calcium [113 ; 94 ], ainsi que d'autres transporteurs tels que les acides carboxyliques, les acides organiques comme le citrate, l'oxalate ou le malate et les acides aminés comme l'histidine et la proline. Ils peuvent avoir un rôle important dans la tolérance des plantes aux métaux et dans la détoxification de ces éléments [114 ; 115 ; 116]. La majorité des ions de cadmium est retenue dans les racines, et de petites quantités sont transportées vers les parties aériennes [117].

### **2.5.2. Chélation, Séquestration**

Les voies de séquestration de Cd dans la racine des plantes jouent un rôle en déterminant la vitesse de translocation vers les parties aériennes. Après l'entrée dans le cytosol, le cadmium, qui a une forte affinité pour les thiolates, est en grande partie chélaté par le glutathion ou par des peptides dérivés du glutathion : les phytochélatines mais aussi par des acides organiques comme le citrate. Les phytochélatines sont synthétisées en réponse à l'exposition à différents ions métalliques et le cadmium en est le plus puissant activateur [94]. Le complexe Cd-phytochélatines, formé dans le cytosol, serait transporté dans la vacuole par un transporteur. Le cadmium libre pouvant également être transporté dans la vacuole. Dans le cytosol, la formation d'un complexe entre le cadmium et le glutathion, permet le transfert du cadmium libre dans le xylème grâce à une pompe d'efflux. Un efflux du complexe entier cadmium-phytochélatine à partir du parenchyme du xylème est possible [94].

### **2.5.3 Translocation**

Après son efflux dans le xylème, le cadmium, libre et lié aux phytochélatines, est transporté vers les parties aériennes de la plante par la sève [118 ; 119]. Dans les plantes normales, la teneur en Cd des feuilles est comprise entre 0,1-3 µg/g, chez les plantes qui l'excluent, elle est de 0,03 µg/g et chez les plantes accumulatrices, de 20 µg/g (Reeves et Baker, 2000). En général, la teneur en cadmium des plantes diminue dans l'ordre suivant : racines > tiges > feuilles > fruits > graines [120].

## **1. Matériel végétal et conditions de culture**

La plante utilisée dans ce travail est l'espèce *Lens culinaris* (lentilles).

### **1.1. Préparation des pots**

La mesure du volume du premier arrosage a été testée sur le premier pot de culture. Sous le pot rempli de tourbe, est placé un béccher afin de récupérer le volume d'eau qui va s'écouler. Le volume du premier arrosage correspond au quart du volume que le sol absorbe pendant 48h. Pour cela, sur 200 ml d'eau utilisée pour l'arrosage, 80 ml se sont écoulés. Après 48 h, un autre volume de 40 ml s'est écoulé. Ainsi, le volume de 20 ml est retenu pour le premier arrosage des autres pots.

Le poids de la tourbe utilisée dans chaque pot est 50 g.

### **1.2. Préparation des graines**

Les graines de *Lens culinaris* ont été triées et désinfectées à l'hypochlorite de sodium (eau de javel) à 0,2 % les lentilles sont mis dans la solution de 100 ml sous agitation pendant 5 minutes, puis rincées abondamment à l'eau distillée jusqu'à se débarrasser de l'eau de javel. L'opération est répétée 10 fois.

Pour la germination des graines, 2 séries de pots ont été préparés ; chaque série contient 6 pots. La première servira pour le dosage de l'activité des enzymes antioxydantes et la deuxième pour suivre la croissance des plantes : longueur des parties racinaires et aériennes.

Dans chaque pot, 20 graines de lentilles sont placées entre deux couches de sol (de **la tourbe**). La couche supérieure est ajustée à environ 2 cm au-dessus des graines.

## **2. Traitement par le cadmium**

**1<sup>er</sup> essai** : Cinq solutions de Cd (10  $\mu$ M, 25  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 200  $\mu$ M) sont préparées à partir d'une solution de 500  $\mu$ M de CdCl<sub>2</sub> ; elles seront utilisées pour le premier arrosage des semences. Le pH de la tourbe est neutre dans ce cas la .

Les graines sont mises à germer dans des conditions environnementales ambiantes du mois de Mars, à l'air libre. L'arrosage se poursuit à une moyenne de 10 ml par jour par de l'eau distillée.

**2<sup>e</sup> essai** : La solution mère est préparée à 5000  $\mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$  et les dilutions à 500  $\mu\text{M}$ , 1000  $\mu\text{M}$  et 2500  $\mu\text{M}$ . Dans ce cas, 4 pots ont été préparés, un pour le contrôle et les trois concentrations de cadmium. Dans chaque pot sont semés 30 graines de lentille.

### **3. Extraction**

#### **3.1. Broyage**

Les feuilles et les racines des plantes congelées dans l'azote liquide, sont broyées à l'aide d'un mortier. Les broyats sont conservés dans des boîtes de Pétri au congélateur jusqu'à utilisation.

La solution d'extraction est préparée avec du tampon phosphate 0,1M à pH 7,5 additionné de 0,1 % de Triton X100 et de 1 % de PVP. Pour 0,5 g du broyat, on ajoute 3 ml de solution.

#### **3.2. Extraction proprement dite**

Pour chaque plante, on a préparé deux tubes secs, un pour le broyat des racines et le 2<sup>e</sup> pour le broyat de la partie aérienne. A l'intérieur de chaque tube, on a mis 3 ml de la solution d'extraction et on a effectué une agitation au vortex.

Les tubes sont laissés pendant une heure en agitant de temps en temps jusqu'à solubilisation. L'homogénat est ensuite centrifugé à 4 °C pendant 15 min à 8 000.g, chaque ml de surnageant est récupéré dans des eppendorfs pour être utilisés pour les dosages.

### **4. Dosage des enzymes antioxydantes et des protéines**

#### **4.2. La catalase (CAT)**

Le dosage de la catalase est effectué selon la méthode de Chance and Maehly (1955) , [121]. La décomposition du peroxyde d'hydrogène est déterminée par la diminution de l'absorbance à 240 nm ( $\epsilon=39.4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

Le mélange réactionnel contient 2,9 ml de 0,1 M tampon phosphate pH 7,0 et 0,1 ml de 20 mM du peroxyde d'hydrogène. La lecture est effectuée à 240 nm directement après l'addition de l'extrait enzymatique, à chaque minute, durant 2 ou 3 mn au maximum.

Calcul de l'activité de la CAT :

$$\text{Abs} \times V_{\text{total}} / \varepsilon \times V_{\text{Echantillon}} = \text{resultant}$$

$$\text{Act spécifique} = \text{Resultant} / [\text{P}]$$

### **4.3. La peroxydase (POD)**

Le dosage de la peroxydase est effectué selon la méthode de Chance and Machly (1967), [122]. Le purpurogalline formé entre l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et le pyrogallol par l'action de la peroxydase, est déterminé par la mesure de l'absorbance à 420 nm contre un blanc.

0,5 ml de l'extrait enzymatique est ajouté au mélange réactionnel contenant 2 ml de tampon phosphate 0,1 M, pH 6,8, 1 ml de pyrogallol 0,01M et 1ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,05 M. Le mélange est incubé à 25° pendant 5 mn. La réaction est arrêtée par l'addition de 1 ml de 2,5 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Le blanc est préparé par l'addition de l'extrait enzymatique après H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> et l'activité enzymatique est exprimée en unité, soit 0,1 absorbance mn<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de protéine.

Calcul de l'activité spécifique de la POD :

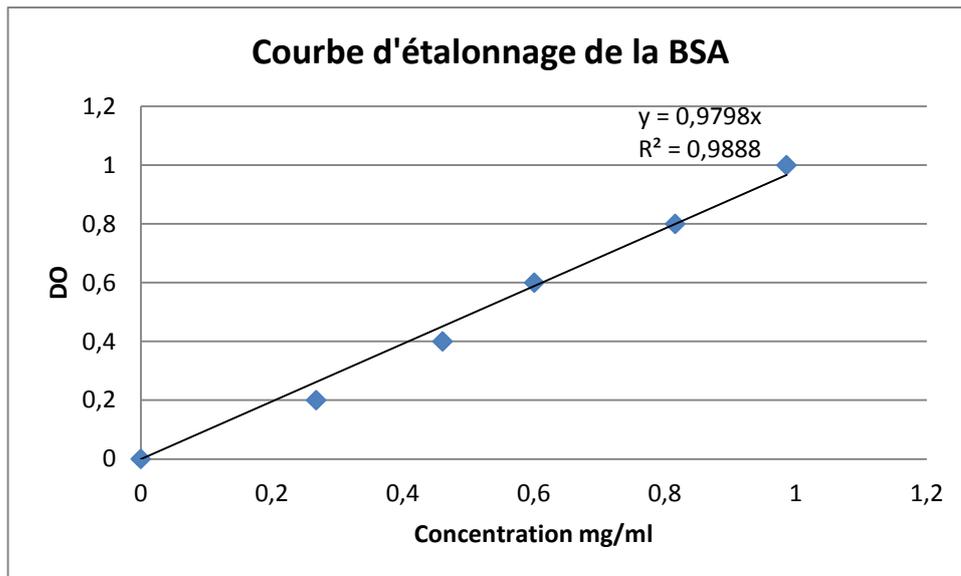
$$\text{Abs} = \text{Abs Echantillon} - \text{Abs Blanc}$$

$$0,1 \text{ Unité} = \text{Abs}/0,1$$

$$\text{Act spécifique} = 0,1 \text{ Unité} / [\text{P}]$$

### **4.4. Dosage des protéines**

Les concentrations de protéines sont quantifiées selon la méthode de Lowry et al., (1951). Le principe de cette méthode est basé sur la liaison du réactif de Folin-Ciocalteu de couleur verte avec les liaisons peptidiques des protéines, conduisant à la formation d'un complexe coloré bleu foncé dont on mesurera l'absorbance à 750 nm en utilisant la BSA comme protéine étalon.



## **5. Analyse des résultats**

Les résultats des activités enzymatiques de la catalase et la peroxydase ont été traité par GraphPAD.

### 3. Résultats et discussion

#### 3.1. Effet du Cd sur la croissance des plantules

##### 3.1.1. Résultats du premier essai

Les résultats de la croissance de la plante *Lens culinaris* après 3, 7 et 29 jours en fonction des concentrations de Cd de 10 à 200  $\mu\text{M}$  et a pH neutre sont présentés dans la figure 2.

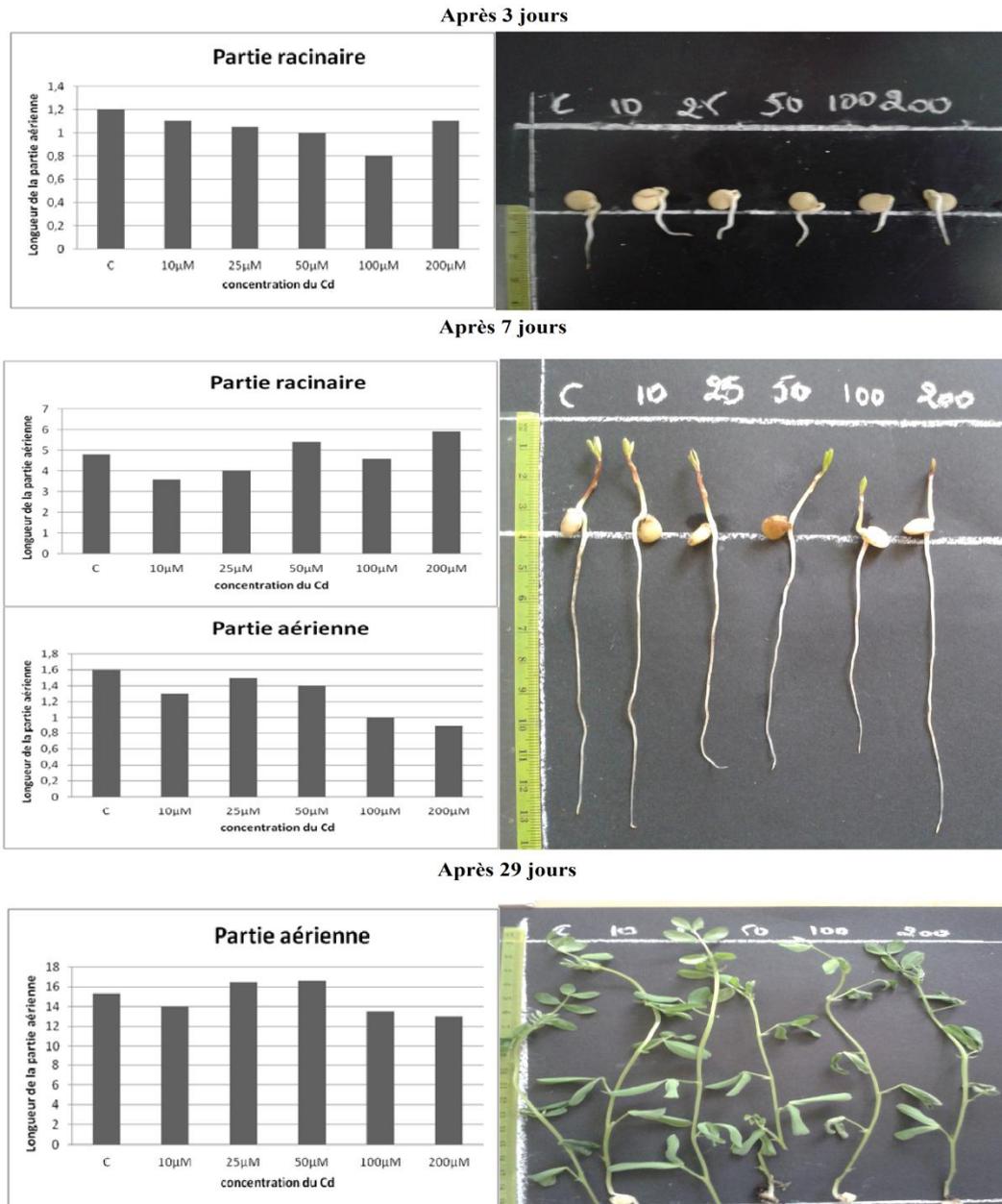


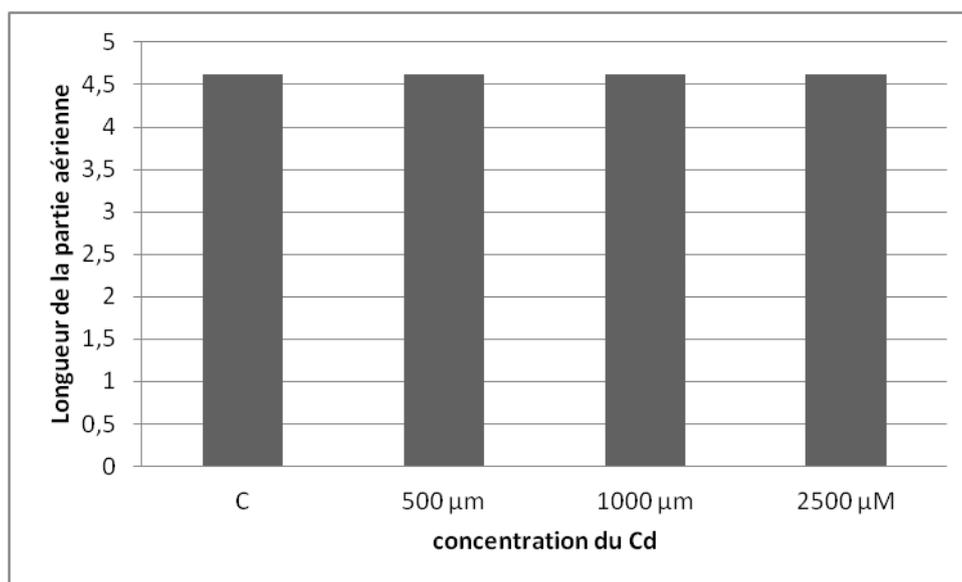
Figure 2- Effet du Cd sur le phénotype des plantules de *Lens culinaris* (lentilles) après 3, 7 et 29 jours

Les résultats de la **fig. 2** ne montrent aucune différence de phénotype des plantules ; ce qui indique que les concentrations utilisées n'ont entraîné aucun effet sur la croissance de la plante. Cela s'explique probablement par une non-absorption du Cd par la plante due à la nature du sol. Ces résultats diffèrent de ceux obtenus par Cosio en 2005 [113] et Clemens en 2006 [94] qui ont travaillé sur terrain, contrairement à nos essais réalisés en pots avec de la tourbe.

### 3.1.2. Résultats du deuxième essai

Etant donné que les concentrations de Cd de 10 à 200  $\mu\text{M}$  (premier essai) n'ont donné aucun effet sur la croissance de la plante *Lens culinaris*, nous avons augmenté les concentrations du deuxième essai à 500-2500  $\mu\text{M}$  (**figure 3**).

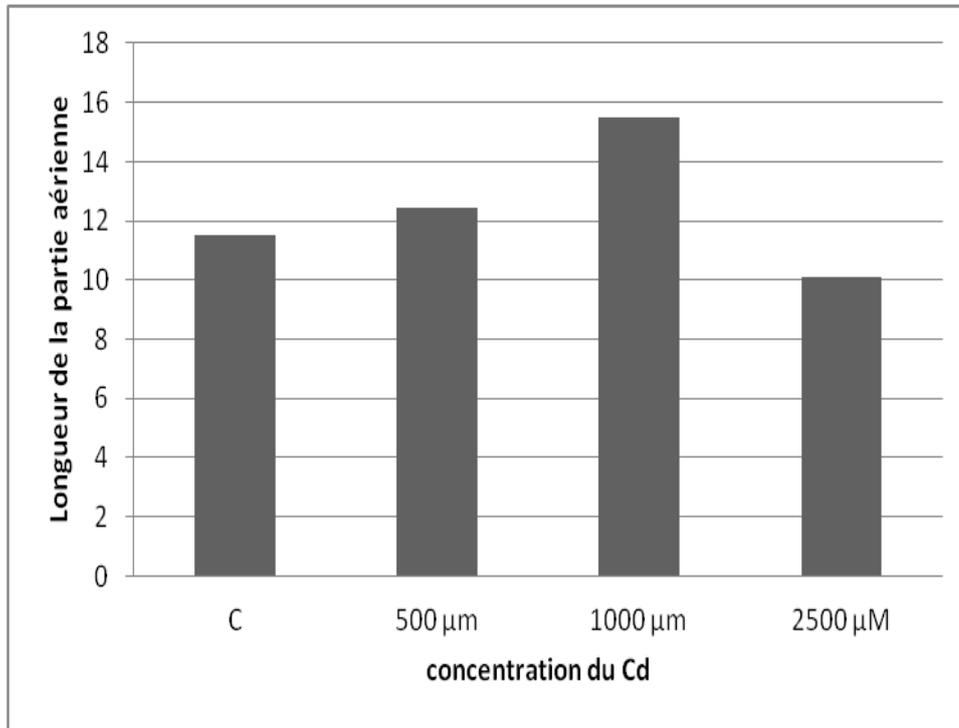
Malgré les fortes concentrations de Cd utilisées, on ne remarque toujours aucun effet du métal sur la croissance de la plante après 7 jours.



**Figure 3- Moyenne de la croissance des parties aériennes a pH neutre après 7jours**

D'après la littérature, l'effet des métaux sur la croissance des plantes nécessite un pH du sol adéquat [123]. Après une semaine et un ajustement du pH à 4,5, nous avons observe

une plus forte croissance de la plante par rapport au contrôle jusqu'à 1000  $\mu\text{M}$ , au-delà de cette concentration, la croissance diminue (**figure 4**). Cela indique les effets variables de Cd sur la plante selon sa concentration dans le sol.



**Figure 4- Moyenne de la croissance des parties aériennes arrosées à l'eau distillée à pH 4.5 pendant 7 jours**



**Figure 5- Effet du Cd sur de la croissance des plantules après 7jours et a pH=4.5**

Plusieurs chercheurs ont en effet montré que les faibles valeurs de pH favorisent l'accumulation de Cd dans les tissus végétaux [123 ; 124 ; 125]. Tudoreanu et Phillips (2004) ont même montré l'existence d'une relation linéaire entre le pH du sol et l'absorption du cadmium. Par conséquent, le Cd a été apparemment absorbé devient un oligoélément vu qu'il y'avait une augmentation de la croissance jusqu'à 1000  $\mu\text{M}$  où la croissance atteint son maximum.

Les faibles concentrations de Cd dans le milieu stimulent la croissance de plusieurs plantes [126; 127] par hyperpolarisation de la membrane cytoplasmique à la surface racinaire, augmentant ainsi le potentiel transmembranaire qui présente une source d'énergie [128].

Aux fortes concentrations de Cd, la croissance des plantules est réduite à cause d'une affection de la croissance au niveau des deux partie de la plante, racinaire et aérienne [129]. De nombreux travaux font état d'une inhibition de la croissance après traitement par le cadmium de plantes variées telles que l'haricot [130], le saule et le peuplier [131 ; 93], le riz [91 ; 132], le tournesol [133] et des plantes du genre *Brassica* comme le colza [134] et la moutarde indienne [135].

En conclusion, les résultats des deux essais montrent les différents effets du cadmium du sol sur la croissance des plantes. En effet, ce métalloïde est considéré comme l'un des éléments phytotoxiques [136]. Sa toxicité représente un grand problème agricole dans le sol [137] en raison de sa grande solubilité dans l'eau et sa forte mobilité dans le système sol-plante [138]. Cd peut être absorbé par les racines de la plante *via* la voie apoplastique de la cellule et peut facilement entrer dans son corps.

### 3.2. Effet du Cd sur le système antioxydant

La réponse des enzymes antioxydantes à un stress oxydatif provoqué par un métal aide à soulager les dommages cellulaires en limitant les ROS [139].

#### 3.2.1 Effet du Cd sur l'activité de la peroxydase

L'effet de la concentration de Cd sur les activités de la peroxydase (POD) sont présentés dans la figure 5.

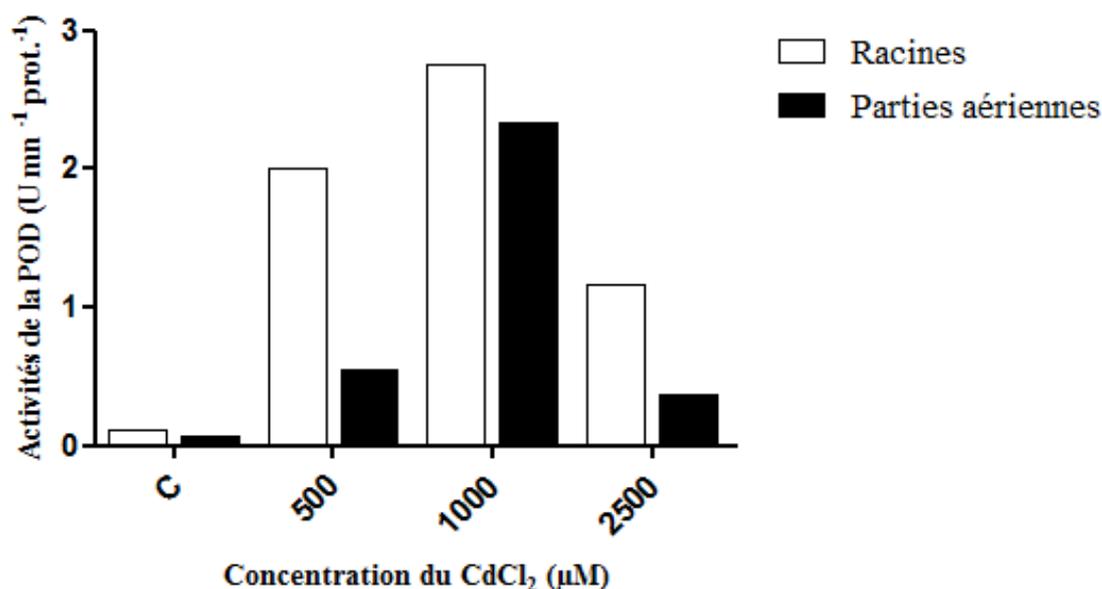


Figure 6- Effet du Cd sur l'activité du POD

La figure 6 montre que l'activité de la POD augmente avec l'augmentation de la concentration du Cd dans les deux parties de *Lens culinaris*; elle atteint son maximum à 1000 μM de Cd. Aux plus fortes concentrations du Cd, spécialement à 2500 μM, l'activité diminue dans la partie aérienne. La diminution dans la partie racinaire est moins importante,

La diminution de l'activité de la POD pourrait indiquer l'effet toxique de Cd. Elle peut s'expliquer par l'élimination de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par les racines, d'où la faible activité dans les feuilles. Elle peut être également due à la production excessive de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> qui devient un inhibiteur de la POD et qui provoque donc la diminution de son activité [140].

La diminution de l'activité de la POD à fortes concentrations de Cd a été aussi observée dans les racines des deux cultivars de peuplier [141] et la plante *Hibiscus cannabinus* L [142].

Plusieurs auteurs ont observé soit une augmentation de l'activité de la POD, soit sa diminution chez les plantes stressées par Cd [143; 144]. Son augmentation a été observée chez certains cultivars de *Hibiscus cannabinus* L [142], du peuplier [141] et de *Dittrichia viscosa* [145].

La POD est une enzyme antioxydante importante dans les plantes, elle participe à plusieurs processus biologiques tels que le développement cellulaire, la lignification, la biosynthèse d'éthylène, la défense contre le stress, etc [139].

Le cadmium, comme les autres métaux lourds, provoque la génération de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> soit directement, soit indirectement par l'activité de la SOD et l'activation de la POD est la conséquence de l'élimination de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> comme réaction de défense [145]

### 3.2.2. Effet d Cd sur l'activité de la CAT

Les résultats de l'activité de la catalase (CAT) sont présentés dans la **figure 7**. Ils montrent la présence d'une activité dans les feuilles du contrôle de *Lens culinaris*, alors que cette activité est presque absente dans les racines. Après traitement avec le Cd, on constate la diminution de l'activité du CAT dans les feuilles alors qu'elle augmente dans les racines, cette activité atteint une valeur maximale à 1000 µM dans la partie aérienne.

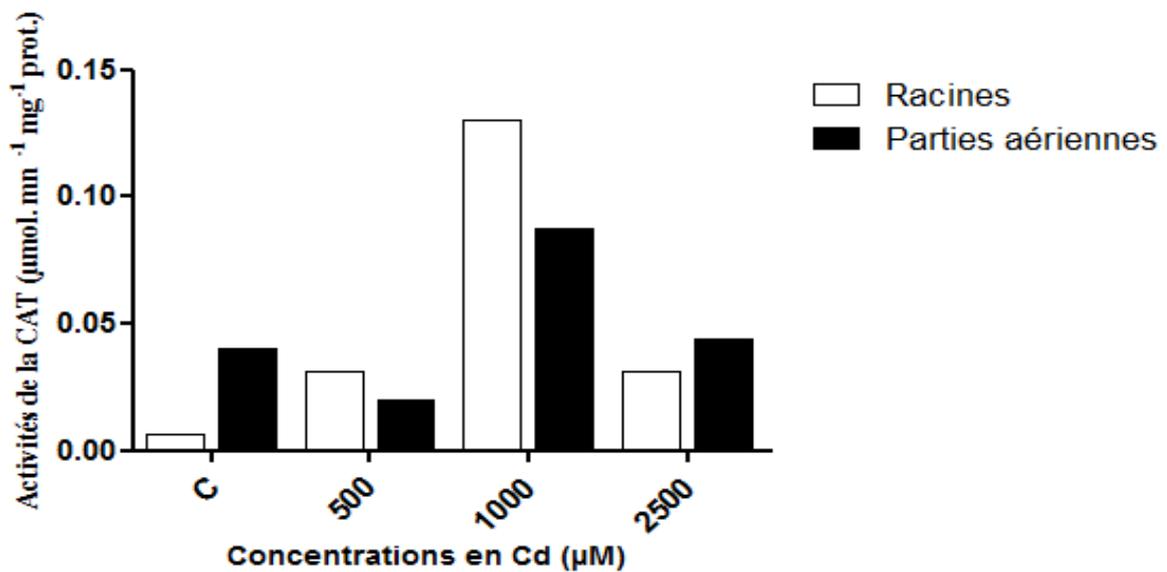


Figure 7- Effet de Cd sur l'activité de la CAT

La catalase est l'enzyme oxydoréductase la plus universelle qui catalyse la dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau et dioxygène. Elle est requise pour la désintoxication des ROS dans les plantes [139]. La présence d'une activité catalase dans les feuilles de lentille avant traitement en Cd peut s'expliquer par la présence de l'enzyme dans le peroxysome pour éliminer le peroxyde d'hydrogène qui se forme lors du cycle photorespiratoire suite à l'action de la glycolate oxydase [146].

La diminution de CAT dans les feuilles après un traitement par de faibles concentrations de Cd peut s'expliquer soit par une inhibition de l'enzyme par le métal, soit par l'élimination des ROS dans les racines. Ces résultats sont similaires à ceux de LI Feng-Tao (2013) [142] qui ont montré que l'activité de la CAT dans les feuilles des deux plantes étudiées a diminué dans tous les traitements de Cd en comparaison avec le contrôle ; dans les racines la CAT a par contre été stimulée.

L'activité maximale de la CAT obtenue à 1000 µM de Cd, peut être due à la forte production des ROS ; dans ce cas, la CAT a été bien stimulée par le Cd qui est donc un inducteur efficace du stress oxydant [147 ; 148]. Ces résultats concordent avec ceux constatés par Jin et al. (2008) [149] où l'activité de CAT a été significativement stimulée dans les feuilles de *Sedum alfredi* et avec ceux de Vitoria et al. (2001) [150] qui ont trouvé

que Cd induisait l'augmentation de l'activité de la CAT dans les tissus de radis. L'étude de Amin Mohamed et al. (2012) [151] montre au contraire une diminution de l'activité de la CAT chez *Brassica juncea* stressé par le Cd.

L'activité de la CAT régresse lorsque la concentration de Cd est très forte, ce qui suppose une accumulation de concentrations importantes de Cd dans le système racinaire soient qui serait responsables d'une inhibition du système anti-oxydant [152]. Ces résultats sont similaires à ceux rapportés par certains auteurs qui indiquent que l'activité de la CAT diminue souvent après une exposition à des concentrations élevées de Cd [153]. C'est ainsi qu'une réduction de l'activité du CAT a été observé en réponse du Cd chez *B. juncea* par Ahmad et al. (2011) [106], Markovska et al. (2009) [154] et chez *B. napus* par Meng et al. (2009) [155].

Par ailleurs, nos résultats montre ne quasi absence de l'activité du CAT dans la partie racinaire du contrôle, ce qui serait dû à l'absence de radicaux libres ou tout autre stress oxydatif.

On observe que le traitement par le Cd stimule l'activité enzymatique de la CAT aux concentration les plus faibles jusqu'au 1000  $\mu\text{M}$  où elle atteint le maximum. Cela est dû à la production des ROS suite au stress oxydatif induit par le Cd. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus chez *Lycopersicon esculentum* L par Hana Sbartai et al. (2012) [156] et chez la plante Fuhong 991 d'*Hibiscus cannabinus* L par LI Feng-Tao et al. (2013) [142] qui ont trouvé que Cd provoquait l'activation de la CAT dans les racines.

L'activité du CAT régresse lorsque la concentration de Cd est très forte, ce qui indique l'effet inhibiteur du Cd et une forte production des ROS. Chez Fuhong 991, l'activité culmine à certaines concentrations puis elle diminue dans les racines [142] aussi chez les racines de tomates (*Lycopersicon esculentum* L) ils ont observés que l'activité du CAT augmente avec le traitement en Cd et aux fortes concentrations de ce dernier elle diminue ce qui est similaire a nos résultats.

La catalase est une enzyme contenue dans les peroxysomes et dans le cytosol, d'où sa forte activité dans les feuilles où elle catalyse la réduction du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire. Elle a le même rôle que la POD qui nécessite la présence d'un substrat particulier, alors que la CAT n'en n'a pas besoin.

En comparant l'activité de la CAT et l'activité du POD, on constate que  $H_2O_2$  a été beaucoup plus éliminé et converti en  $H_2O$  par la POD qui a montré de fortes activités dans les feuilles et les racines de tous les traitements du Cd. On déduit que le  $H_2O_2$  a plus d'affinité pour la POD que pour la CAT [157].

# *Conclusion*

## **Conclusion**

Le cadmium (Cd) est un métalloïde présent dans les sols pollués ; il peut être transféré rapidement vers les plantes où il peut être soit accumulé, soit être hautement toxique.

Ce travail a pour but de mesurer l'effet de Cd dans le sol sur la croissance et le stress oxydatif d'une plante cultivée en pots (la lentille ou *Lens culinaris*). La contamination par une solution du Cd à différentes concentrations a entraîné une stimulation de la croissance jusqu'à un niveau donné de concentration, puis diminution de la croissance au-delà de cette concentration. Cela indique qu'à faible concentration, le métalloïde agit comme un oligo-éléments et qu'à forte concentration, il devient toxique. Dans ce cas, le métal induit la génération des espèces réactives (les ROS) et provoque un stress oxydant qui conduit à la stimulation des systèmes de défense de la plante, particulièrement le système enzymatique antioxydant, dans ce cas les activités de la catalase (CAT) et de la peroxydase (POD).

L'addition de Cd dans le sol utilisé pour les tests de culture a stimulé l'activité des deux enzymes ; cette réponse montre une tolérance de *Lens culinaris* au Cd, mais à la plus forte concentration utilisée (2500  $\mu\text{M}$ ), les deux enzymes sont inhibées. Cela signifie qu'il y a eu production d'un niveau élevé de ROS qui vont inhiber les enzymes antioxydantes.

Ces réactions peuvent se produire également chez l'homme où la contamination par les métaux est essentiellement d'origine alimentaire ou par l'eau. Dans ce cas, le cadmium s'accumule préférentiellement dans les reins et peut entraîner une atteinte rénale (néphrite) qui peut évoluer jusqu'à l'insuffisance rénale. Cd est également un cancérigène reconnu chez l'homme, il doit être considéré comme le plus préoccupant pour la santé parmi les métaux lourds.

Les plantes peuvent ainsi être utilisées comme biomarqueurs de la pollution de l'environnement. En perspective, il serait intéressant d'étudier l'effet des métaux sur les habitants des zones pollués. Pour cela, des tests préalables sur les plantes seraient suivis par une évaluation de l'effet de cette pollution sur la santé et la mesure les activités des enzymes antioxydantes de ces personnes.

*Références*  
*Bibliographiques*

- [1] Adriano D.C., 2001. In: Trace Metals in Terrestrial Environments: Biogeochemistry, Bioavailability and Risks of Metals (2e éd). New York : Springer-Verlag Ed., 866 p.
- [2] Alkorta I., Hernandez-Allica J., Becerril J.M., Amezaga I., Albizu I and Garbisa C., 2004. Recent findings on the phytoremediation of soils contaminated with environmentally toxic heavy metals and metalloids such as zinc, cadmium, lead and arsenic. *Environmental Science and Biotechnology* 3: 71-90.
- [3] Marschner H., 1995. Mineral nutrition of higher plants (2e éd). London: Academic Press Ed., 889p.
- [4] Ercal N., Gurer-Orhan H. and Aykin-Burns N., 2001. Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal-induced oxidative damage. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 1: 529–539.
- [5] Dowling D.K., Simmons L.W., 2009. Reactive oxygen species as universal constraints in life-history evolution. *Proceedings Biological Sciences* 276: 1737–1745.
- [6] Halliwell B., Gutteridge J., 2007. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press.
- [7] Hoffman D.J., Ohlendorf H.M., Marn C. M. and Pendleton G.W.P., 1998. Association of mercury and selenium with altered glutathione metabolism and oxidative stress in diving ducks from the San Francisco bay region, USA. *Environmental Toxicology and Chemistry* 17: 167–172.
- [8] Valavanidis A., Vlahogianni T., Dassenakis M. and Scoullou M., 2006. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicology and environmental safety* 64: 178–189.
- [9] Costantini D., Verhulst S., 2009. Does high antioxidant capacity indicate low oxidative stress?. *Functional Ecology* 23: 506–509.
- [10] Wolin M.S., 1996. Reactive oxygen species and vascular signal transduction mechanisms. *Microcirculation* 3: 1-17.
- [11] Wolin M.S., Ahmed M. and Gupte S.A., 2005. Oxidant and redox signaling in vascular oxygen sensing mechanisms : basic concepts ,current controversies, and potential importance

of cytosolic NADPH. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 289: 159-173.

[12] Halliwell B., 1997. Antioxidants and human disease: a general introduction. *Nutrition Reviews* 55: 44–49.

[13] Harman D., 2000. Aging: overview. *Annals of the New York Academy of Sciences* 928: 1–21

[14] Halliwell B., Gutteridge J.M., 1984. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochemical Journal* 219: 1–14.

[15] Ashok B., Ali R. 1999, The aging paradox: free radical theory of aging. *Experimental Gerontology* 34: 293–303.

[16] Halliwell B., 1996. In: *Handbook of antioxidants*. Cadenas E., Packer L. editors . Uric acid: an example of antioxidant evaluation. New York: Marcel Dekker Ed., 243–256p

[17] Fang Y.Z., Yang S., Wu G., 2002. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition* 18: 872–879.

[18] Wiernsperger N.F., 2003. Oxidative stress as a therapeutic target in diabetes: revisiting the controversy. *Diabetes Metabolism* 29: 579-85.

[19] Ji l.l., 1998. Exercice at old age:does it increase or alleviate oxidative stress?. *Annals of the New York Academy of Sciences* 928: 236-247.

[20] Morel Y., Barouki R., 1999. Repression of gene expression by oxidative stress. *Biochemical Journal* 342: 481-496.

[21] Vergely C., Goirand F., Ecarnot-Laubriet A., Renard C., Moreau J.-C and Guillaud D., 2003. NF- $\kappa$ B activation in hydrogen peroxide-treated human endothelial cells. *Experimental Biology and Medicine* 228: 855-865.

[22] Favier A., 2003. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *Mécanisme biochimique* 108-115.

[23] Haleng J., Pincemail J., Defraigne J.O., Charlier C., Chapelle J.P., 2007. Le stress oxydant. *Revue Medicale de Liege* 62: 628-638.

[24] Levine R.L., Garland D., Oliver C.N., Amici A., Climent I., Lenz A.G., Ahn B.W., Shaltiel S and Mc Cord J.M., 2000. The evolution of free radicals and oxidative stress. *The American Journal of the Medical Sciences* 108: 652-659.

[25] Serafini M., Laranjinha J.A., Almeida L.M., Maiani G., 2000. Inhibition of human LDL lipid peroxidation by phenol-rich and their impact on plasma total antioxidant capacity in humans. *Journal Of Nutritional Biochemistry* 11: 585\_590.

[26] Nakajima K., Nakano T., Tanaka A., 2006. The oxidative modification hypothesis of atherosclerosis : The comparison of atherogenic effects on oxidized LDL and remnant lipoproteins in plasma. *Clinica chimica acta* 367: 36-47.

[27] Akihiko H., Yuichiro K., Teruko I., Masaki O., Hiroshi M., 1993. Conjugation of copper-zinc superoxide dismutase with succinylated gelatin: Pharmacological activity and cell-lubricating function. *Bioconjugate Chemistry* 4: 490–498.

[28] Andersen H.R., Nielsen J.B., Nielsen F., Grandjean P., 1997. Anti oxidative enzyme activities in human erythrocytes. *Clinical Chemistry* 43: 562-568. [29] Vainshtein B.K., Melik-Adamyan W.R., Barynin V.V., Vagin A.A., Grebenko A.I., Borisov V.V., Bartels K.S., Fita I and Rossmann M.G., 1986. Three-dimensional structure of catalase from *Penicillium vitale* at 2.0 Å resolution. *Journal of Molecular Biology* 188: 49-61.

[30] Niki L., Reynaert S.W., Aesif T., McGovern., Amy Brown., Emiel F.M., Wouters., Charles G., Irvin Yvonne M.W and Janssen-Heininger., 2007. Catalase Overexpression Fails to Attenuate Allergic Airways Disease in the Mouse. *The Journal of Immunology* 178: 3814-3821.

[31] Bartling D.R., Radzio U., Steiner E.W., 1993. A glutathione S-transferase with glutathione peroxidase activity from *Arabidopsis thaliana*. *European Journal of Biochemistry* 216: 579-586.

[32] Gattas G.J., Kato M., Soares-Vieira J.A., Siraque M.S., Kohler P., Gomes L., Rego M.A and Bydlowski S.P., 2004. Ethnicity and glutathione S-transferase (GSTM1/GSTT1) polymorphisms in a Brazilian population. *Brazilian Journal Of Medical And Biological Research* 337: 451-458.

[33] Albert F., Anderson A.J., 1987. The effect of *Pseudomonas putida* colonisation on root surface peroxidase. *Plant Physiology* 85: 537-541.

- [34] Raven E.L., Lad L., Sharp K.H., Mewies M. and Moody P.C., 2004. Defining substrate specificity and catalytic mechanism in ascorbate peroxidase. *Biochemical Society Symposia* 71: 27-38.
- [35] Noctor G., Foyer C.H., 2000. Homeostasis of adenylate status during photosynthesis in a fluctuating environment. *Journal Of Experimental Botany* 51: 347-356.
- [36] Meister A., 1988. Glutathione metabolism and its selective modification. *Journal Of Biological Chemistry* 33: 17205–8.
- [37] Deponte M., 2013. Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta* 5: 3217–66.
- [38] Vertuan S., Angusti A., Manfredini S., 2004. The antioxidants and pro-oxidants network: an overview. *Current Pharmaceutical Design* 10: 1677-1694.
- [39] Gerard-Monnier D., Chaudiere J., 1996. Metabolism and antioxidant function of glutathione. *Pathologie Biologie* 44: 77-85.
- [40] Boyd N.F., McGuire V., 1991. The possible role of lipid peroxidation in breast cancer risk. *Free Radical Biology and Medicine* 10: 185-90.
- [41] Janssen A.M., Bosman C.B., van Duijn W., Oostendorp-van de Ruit M.M., Kubben F.J., Griffioen G., Lamers C.B., Van Krieken J. H., Van de Velde C.J and Verspaget H.W., 2000. Superoxide dismutases in gastric and esophageal cancer and the prognostic impact in gastric cancer. *Clinical Cancer Research* 6: 3183-92
- [42] Smith M.A., Rudnicka-Nawrot M., Richey P. L., Praprotnik D., Mulvihill P., Miller C.A., Sayre L. M and Perry G., 1995. Carbonyl-related posttranslational modification of neurofilament protein in the neurofibrillary pathology of Alzheimer's disease. *Journal of neurochemistry* 64: 2660-6.
- [43] Mecocci P., MacGarvey U., Beal, M. F., 1994. Oxidative damage to mitochondrial DNA is increased in Alzheimer's disease. *Annals of neurology* 36: 747-51.
- [44] Marklund S.L., Adolfsson R., Gottfries C.G., Winblad B., 1985. Superoxide dismutase isoenzymes in normal brains and in brains from patients with dementia of Alzheimer type. *Journal of the neurological sciences* 67: 319-25.

- [45] Schapira A. H., Cooper J. M., Dexter D., Jenner P., Clark J.B and Marsden C.D., 1989, Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *Lancet*. 1: 1269.
- [46] Di Monte D.A., Chan P., Sandy M.S., 1992. Glutathione in Parkinson's disease: a link between oxidative stress and mitochondrial damage?. *Annals of neurology* 32: 111-5.
- [47] Mittler R., 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* 9: 405-410.
- [48] Ramel F., 2009. Implication des sources solubles dans les réponses aux stress xénobiotique et oxydatif chez *Arabido thaliana*. Thèse doctorat, université Rennes1. 17-47.
- [49] Bowler C., Montagu M.V., Inzé D., 1992. Superoxide dismutase and stress tolerance. . *Plant Physiol. Plants Moleculare Biology* 43: 83–116
- [50] Willekens H., Chamnongpol S., Davey M., Schraudner M., Langebartels C., Van Montagu M., Inzé D and Van Camp W., 1997. Catalase is a sink for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and is indispensable for stress defense in C3 plants. *The EMBO Journal*. 16: 4806–4816.
- [51] Asada K., Takahashi M., 1987. In: *Photoinhibition*. Kyle D.J., Osmond C., Arntzen C.J. editors. Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis. New York: Elsevier Ed., 227-297.
- [52] Asada K., 1992. Ascorbate peroxidase: a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. *Plant Physiology* 85: 235–241.
- [53] Mittler R., Vanderauwera S., Gollery M., Van Breusegem F., 2004. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science* 9: 490–498.
- [54] Yamamoto H., Miyake C., Dietz K. J., Tomizawa K., Murata N. and Yokota A., 1999. Thioredoxin peroxidase in the cyanobacterium *Synechocystis* Sp.PCC6803. *FEBS Lett* 447: 269\_273.
- [55] Halliwell B., Gutteridge J.M.C., 1999. *Free radicals in biology and medicine* (3rd ed). New York : Oxford University Press Ed., 936 p.
- [56] Reddy C.C., Scholz R.W., Thomas C.E., Massaro E.J., 1982. Vitamin E dependent reduced glutathione inhibition of rat liver microsomal lipid peroxidation. *Life Science* 31: 571-576.

- [57] Hermes Lima M., 2004. In: Functional Metabolism: Regulation and Adaptation. Storey, K.B., editor. Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. Hoboken : Wiley-Liss Ed., 319–368
- [58] Monaghan B.R., Schmitt F.O., 1932. The effects of carotene and of vitamin A on the oxidation of linoleic acid. *Journal of Biological Chemistry* 96: 387-395.
- [59] Switala J., Loewen, P.C., 2002. Diversity of properties among catalases. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 401: 145–154.
- [60] <http://www.rcsb.org/pdb/101/motm.do?momID=57> [61] Aebi H., 1984. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology* 105:121–126. [62] Gaetani G., Ferraris A., Rolfo M., Mangerini R., Arena S., Kirkman H., 1996. Predominant role of catalase in the disposal of hydrogen peroxide within human erythrocytes. *Blood* 4: 1595–9 [63] László G., Ágota L., William N., 2001. Blood Catalase Deficiency and Diabetes in Hungary. *Diabetes Care* 10: 1839–1840.
- [64] Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P., 2002. *Molecular Biology of the Cell* (4e ed.). Peroxisomes. New York : Garland Science Ed., 615-657 p. [65] Welinder K.G., 1992. Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases. *Current Opinion in Structural Biology* 2: 388–393.
- [66] Edwards S.L., Raag R., Wariishi H., Gold M.H., Poulos TL., 1993. Crystal structure of lignin peroxidase. *Procaryote National Academic Science* 90: 750-754.
- [67] Smulevich G., Jakopitsch C., Droghetti E., Obinger C., 2006. Probing the structure and bifunctionality of catalase-peroxidase (KatG). *Journal of Inorganic Biochemistry* 100: 568-585.
- [68] Blee K.A., Jupe S.C., Richard G., Zimmerlin A., Davies D.R and Bolwell G.P., 2001. Molecular identification and expression of the peroxidase responsible for the oxidative burst in French bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and related members of the gene family. *Plant Molecular Biology* 47: 607-620.
- [69] Takabe K., Takeuchi M., Sato T., Ito M and Fujita M., 2001. Immunocytochemical localization of enzymes involved in lignification of the cell wall. *Journal of Plant Research* 114: 509-515.

- [70] Gazaryan I.G., Lagrimini L.M., Ashby G.A., Thorneley R.N., 1996. Mechanism of indole-3-acetic acid oxidation by plant peroxidases: anaerobic stoppedflow spectrophotometric studies on horseradish and tobacco peroxidases. *Biochemical Journal* 313: 841-847.
- [71] Savitsky P.A., Gazaryan I.G., Tishkov V.I., Lagrimini L.M., Ruzgas T and Gorton L., 1999. Oxidation of indole-3-acetic acid by dioxygen catalysed by plant peroxidases: specificity for the enzyme structure. *Biochemical Journal* 340: 579-583.
- [72] Tognolli M., Penel C., Greppin H., Simon P., 2002. Analysis and expression of the class III peroxidase large gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Gene* 288: 129-138.
- [73] <http://www.worthington-biochem.com/CTL/default.html> [74] Alvan Hengge., 1999. how is catalase used in industry?. *General Biology* 33 : 77-82. [75] Cook J.N., Worsley J.L., 1996. Compositions and method for destroying hydrogen peroxide on contact lens. *Worldwide Database* 7 : 93 p.
- [76] Wood J.M., Decker H., Hartmann H., Chavan B., Rokos H., Spencer J.D., Hasse S., Thornton M.J., Shalhaf M., Paus R and Schallreuter K.U., 2009. Senile hair graying: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-mediated oxidative stress affects human hair color by blunting methionine sulfoxide repair. *FASEB J* 8 : 11-17.
- [77] Shaffiqu T.S., Roy J.J., Nair R.A., Abraham T.E., 2002. Degradation of textile dyes mediated by plant peroxidases. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 102: 315-326.
- [78] Dec J ., Bollag J.M., 1994. Use of plant material for the decontamination of water polluted with phenols. *Bioengineering and Biotechnology* 44: 1132-1139.
- [79] Kawano T., 2003a. Possible use of indole-3-acetic acid and its antagonist tryptophan betaine in controlled killing of horseradish peroxidase-labeled human cells. *Medical Hypotheses* 60: 664-666.
- [80] Plewa M.J., Wagner E.D., 1993. Activation of promutagens by green plants. *Annuaire Revue Genetique* 27: 93-113.
- [81] Raskin I., Kumar P.B.A.N., Dushenkov S., Salt D.E., 1994. Bioconcentration of heavy metals by plants. *Current Opinion in Biotechnology* 5: 285-90.
- [82] Koller E., 2004. *Traitement des pollutions industrielles*. Paris : Dunod Ed., 424 p

- [83] Sanita Di Toppi L., Gabbrielli R., 1999. Response to cadmium in higher plants. *Journal Environmental and Experimental Botany* 41: 105-130.
- [84] Baize D., Sterckeman T., 2001. The necessity of knowledge of the natural pedogeochemical background content in the evaluation of the contamination of soils by trace elements. *Science of the Total Environment* 264: 127-139.
- [85] Baize D., 1997. *Teneurs totales en éléments traces métalliques dans les sols*. France, Paris : INRA Ed., 408 p.
- [86] Juste C., Chassin P., Gomez A., Linères M., Mocquot B., 1995. Les micro-polluants métalliques dans les boues résiduaires des stations d'épuration urbaines. ADEME Ed., 209 p.
- [87] Godt J., Scheidig F., Grosse-Siestrup C., Esche V., Brandenburg P., Reich A., Groneberg D., 2006. The toxicity of cadmium and resulting hazards for human health. *Journal of Occupational Medicine and Toxicology* 1: 22-27.
- [88] Leblanc, J.C., P. Verger, T. Guerin and J.L. Volatier, 2004. In: INRA-DGAL Ed., *Etude de l'alimentation totale française. Mycotoxines, minéraux et élément traces*. Paris., 68p.
- [89] He Z.L., Yang X.E., Stoffella P.J., 2005a. Trace elements in agroecosystems and impacts on the environment. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 19: 125-140
- [90] Inouhe M., Ninomiya S., Tohyama H., Joho M., Murayama T., 1994. Different characteristics of roots in the cadmium-tolerance and Cd-binding complex formation between mono- and dicotyledonous plants. *Journal of Plant Research* 107: 201-207.
- [91] Fodor F., 2002. Physiological responses of vascular plants to heavy metals. In : Prasad, M.N.V., Strzatka, K. *Physiology and Biochemistry of Metal Toxicity and Tolerance in Plants*. Netherlands. Kluwer Academic Publisher Ed., 149–177 p
- [92] Lindberg S., Greger M., 2002. Plant genotypic differences under metal deficient and enriched conditions. In : *Physiology and Biochemistry of Metal Toxicity and Tolerance in Plants*, Prasad M.N.V. and Strzalka K. editors. Netherlands : Kluwer Academic Publishers Ed., 357-393.

- [93] Cosio C., Vollenweider P., Keller C., 2005. Localization and effects of cadmium in leaves of a cadmium-tolerant willow (*Salix viminalis* L.). I. Macrolocalization and phytotoxic effects of cadmium. *Journal Environmental and Experimental Botany* 58: 64-74.
- [94] Clemens S., 2006. Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. *Biochimie* 88: 1707-1719.
- [95] Zorrig W., Rouached A., Shahzad Z., Abdelly C., Davidian J.C., Berthomieu P., 2010. Identification of three relationships linking cadmium accumulation to cadmium tolerance and zinc and citrate accumulation in lettuce. *Journal of Plant Physiology* 167: 1239-1247.
- [96] Hasenstein K.H., Evans M.L., Stinemetz C.L., Moore R., Fondren W.M., Koon EC., Higby M.A., Smucker A.J., 1988. Comparative effectiveness of metal ions in inducing curvature of primary roots of *Zea mays*. *Plant Physiology* 86: 885-889
- [97] Chaoui A., El Ferjani E., 2005. Effects of cadmium and copper on antioxidant capacities, lignification and auxin degradation in leaves of pea (*Pisum sativum* L.) seedlings. *Comptes Rendus Biologies* 328: 23-31
- [98] Mobin M., Khan N.A., 2007. Photosynthetic activity, pigment composition and antioxidative response of two mustard (*Brassica juncea*) cultivars differing in photosynthetic capacity subjected to cadmium stress. *Journal of Plants Physioly* 164: 601-610
- [99] Ebbs S., Uchil S., 2008. Cadmium and zinc induced chlorosis in Indian mustard [*Brassica juncea* (L.) Czern] involves preferential loss of chlorophyll b. *Photosynthetica* 46: 49-55
- [100] Wojcik M., Vangronsveld J., D'Haen J., Tukiendorf A., 2005. Cadmium tolerance in *Thlaspi caerulescens*. II. Localization of cadmium in *Thlaspi caerulescens*. *Journal Environmental and Experimental Botany* 53: 163-171
- [101] Krupa Z., Baszynski T., 1995. Some aspects of heavy metal toxicity towards photosynthetic apparatus—direct and indirect effects on light and dark reactions. *Acta Physiologiae Plantarum* 17: 177-190.

[102] Mysliwa-Kurdziel B., Prasad M.N.V., Strzalka K., 2002. Heavy metal influence on the light phase of photosynthesis. In : *Physiology and Biochemistry of Metal Toxicity and Tolerance in Plants*. Prasad M.N.V., Strzalka K. editors. Netherlands : Kluwer Academic Publishers Ed., 229 \_255 p.

[103] Romanowska E., 2002. Gas exchange functions in heavy metal stressed plants. In : *Physiology and Biochemistry of Metal Toxicity and Tolerance in Plants*. Prasad M.N.V., Strzalka K. editors. Netherlands : Kluwer Academic Publishers Ed., 257- 285 p.

[104] Sandalio L.M., Dalurzo H.C., Gomez M., Romero-Puertas M.C., del Rio L.A., 2001. Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. *Journal of Experimental Botany* 52: 2115–2126.

[105] Szöllősi R., Varga IS., Erdei L., Mihalik E., 2009. Cadmium-induced oxidative stress and antioxidative mechanisms in germinating Indian mustard (*Brassica juncea* L.) seeds. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72: 1337-1342

[106] Ahmad P., Nabi G., Ashraf M., 2010. Cadmium-induced oxidative damage in mustard [*Brassica juncea* (L.) Czern. And Coss.] plants can be alleviated by salicylic acid. *South African Journal of Botany* 77: 36 – 44.

[107] Dat J., Vandenabeele S., Vranova E., Van Montagu M., Inze D., Van Breusegem F., 2000. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Journal Cellular and Molecular Life Science* 57: 779-795.

[108] Metwally A., Finkemeier I., Georgi M., Dietz K.J., 2003. Salicylic acid alleviates the cadmium toxicity in barley seedlings. *Plant Physiology* 132: 272-281.

[109] Hsu Y.T., Kao C.H., 2004. Cadmium toxicity is reduced by nitric oxide in rice leaves. *Plant Growth Regulation* 42: 227-238.

[110] Cho U.H., Seo N.H., 2005. Oxidative stress in *Arabidopsis thaliana* exposed to cadmium is due to hydrogen peroxide accumulation. *Plant Science* 168: 113-120.

[111] Singh R., Tripathi RD., Dwivedi S., Singh M., Trivedi PK., Chakrabarty D., 2010. Cadmium-induced biochemical responses of *Vallisneria spiralis*. *Protoplasma* 245: 97-103.

- [112] Wagner G.J., 1993. Accumulation of cadmium in crop plants and its consequences to human health. *Advances in Agronomy* 51: 173–212.
- [113] Rauser W.E., 1999. Structure and function of metal chelators produced by plants: the case for organic acids, amino acids, phytin, and metallothioneins. *Cellular Biochemistry and Biophysics* 31: 19-48
- [114] Siripornadulsil S., Traina S., Verma D.P., Sayre R.T., 2002. Molecular mechanisms of proline-mediated tolerance to toxic heavy metals in transgenic microalgae. *Plant Cell* 14: 2837-2847
- [115] Bäckor M., Fahselt D., Wu C.T., 2004. Free proline content is positively correlated with copper tolerance of the lichen photobiont *Trebouxia erici* (Chlorophyta). *Plant Science* 167: 151-157
- [116] Cataldo D.A., Garland T.R., Wildung R.E., 1983. Cadmium uptake kinetics in intact soybean plants. *Plant Physiology* 73: 844-848.
- [117] Salt D.E., Blaylock M., Kumar N., Dushenkov V., Ensley B.D., Chet I., Raskin I. 1995a. Phytoremediation : A novel strategy for removal of toxic metals from the environment using plants. *Biotechnology* 13: 468-474.
- [118] Gong JM., Lee D.A., Schroeder J.I., 2003. Long-distance root-to-shoot transport of phytochelatins and cadmium in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 10118-10123.
- [119] Zhang G., Fukami M., Sekimoto H., 2000. Genotypic differences in effects of cadmium on growth and nutrient compositions in wheat. *Journal of Plant Nutrition* 23: 1337-1350.
- [120] Chance B., Machly A.C. 1955. Assay of catalases and peroxidases. *Methods Enzymol* 2: 764–775.
- [121] Chance B, Machly A.C. 1967. *Methods of biochemical analysis*. In: Glick D. editors. New York: Interscience Publishers Inc.
- [122] Kirkham M.B., 2006. Cadmium in plants on polluted soils: Effects of soil factors, hyperaccumulation, and amendments. *Geoderma* 137: 19-32.

- [123] Waisberg M., Black W.D., Waisberg C.M., Hale B., 2004. The effect of pH, time and dietary source of cadmium on the bioaccessibility and adsorption of cadmium to/from lettuce (*Lactuca sativa* L. cv. *Ostinata*). *Food and Chemical Toxicology* 42: 835-842.
- [124] Tsadilas C.D., Karaivazoglou N.A., Tsotsolis N.C., Stamatiadis S., Samaras V., 2005. Cadmium uptake by tobacco as affected by liming, N form, and year of cultivation. *Environmental pollution* 134: 239-246.
- [125] Yanai J., Zhao F.J., McGrath S.P., Kosaki T., 2006. Effect of soil characteristics on Cd uptake by the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Environmental pollution* 139: 167-175.
- [126] Arduini I., Masoni A., Mariotti M., Ercoli L., 2004. Low cadmium application increase miscanthus growth and cadmium translocation. *Environmental and Experimental Botany* 52: 89-100.
- [127] Tang Y.T., Qiu R.L., Zeng X.W., Ying R.R., Yu F.M., Zhou X.Y., 2009. Lead, zinc, cadmium hyperaccumulation and growth stimulation in *Arabis paniculata* Franch. *Environmental and Experimental Botany* 66: 126-134.
- [128] Zorrig W., 2010. Recherche et caractérisation de déterminants contrôlant l'accumulation de cadmium chez la laitue "*Lactuca sativa*". Thèse doctorat, Université TUNIS EL MANAR. 22 p.
- [129] Ghnaya T., Slama I., Messedi D., Grignon C., Ghorbel M.H, Abdelly C., 2007. Cd-induced growth reduction in the halophyte *Sesuvium portulacastrum* is significantly improved by NaCl. *Journal of Plant Research* 120: 309-316.
- [130] Poschenrieder C., Günsé B., Barcelo J., 1989. Influence of cadmium on water relations, stomatal resistance and abscisic acid content in expanding bean leaves. *Journal of Plant Physiology* 90: 1365-1371.
- [131] Lunackova L., Sotnikova A., Masarovicova E., Lux A., Stresko V., 2003. Comparison of cadmium effect on willow and poplar in response to different cultivation conditions. *Journal of Plant Biology* 47: 403-411.
- [132] Aina R., Labra M., Fumagalli P., Vannini C., Marsoni M., Cucchi U., Bracale M., Sgorbati S., Citterio S., 2007. Thiol-peptide level and proteomic changes in response to

cadmium toxicity in *Oryza sativa* L. roots. *Environmental and Experimental Botany* 59: 381-392.

[133] Groppa M.D., Ianuzzo M.P., Tomaro M.L., Benavides M.P., 2007a. Polyamine metabolism in sunflower plants under long-term cadmium or copper stress. *Amino Acids* 32: 265-275.

[134] Larsson E.H., Bornman J.F. et Asp H., 1998. Influence of UV-radiation and Cd<sup>2+</sup> on chlorophyll fluorescence, growth and nutrient content in *Brassica napus*. *The Journal of Experimental Botany* 323: 1031-1039.

[135] Haag-Kerwer A., Schäfer H.J., Heiss S., Walter C. et Rausch T., 1999. Cadmium exposure in *Brassica juncea* causes a decline in transpiration rate and leaf expansion without effect on photosynthesis. *The Journal of Experimental Botany* 50: 1827-1835.

[136] DalCorso G., Silvia, F., Antonella F., 2010. Regulatory networks of cadmium stress in plants. *Plant Signaling & Behavior* 5: 663–667.

[137] Hasan S.A., Hayat S., Ahmad A., 2011. Brassinosteroids protect photosynthetic machinery against the cadmium induced oxidative stress in two tomato cultivars. *Chemosphere* 84: 1146–1451.

[138] Groppa M.D., Ianuzzo M.P., Rosales E.P., Va'zquez S.C., Benavides M.P., 2012. Cadmium modulates NADPH oxidase activity and expression in sunflower leaves. *Biology Plant* 56: 167–171.

[139] Bhaduri A.M., Fulekar M.H., 2012. Antioxidant enzyme responses of plants to heavy metal stress. *Environmental Science and Biotechnology* 11: 55–69.

[140] Asada K. 1994. In: Mullineaux P M Production and action of active oxygen species in photosynthetic tissues. Foyer C.H., editor. *Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defense Systems in Plants*. USA : CRC Press Ed., 77-104.

[141] Ge W., Jiao Y.Q., Sun B.L., Qin R., Jiang W.S., Liu D.H., 2012. Cadmium-mediated oxidative stress and ultrastructural changes in root cells of poplar cultivars. *South African Journal of Botany* 83: 98–108.

[142] Feng-tao L.I., Jian-min Q.I., Gao-yang Z.H., Li-hui LI., Ping-ping F.A, Ai-fen T.A., Jian-tang X.U., 2013. Effect of Cadmium Stress on the Growth, Antioxidative Enzymes and

Lipid Peroxidation in Two Kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) Plant Seedlings. *Journal of Integrative Agriculture* 4: 610-620.

[143] Meloni, D.A., Oliva, M.A., Martinez, C.A., Cambraia, J., 2003. Photosynthesis and activity of superoxide dismutase, peroxidase and glutathione reductase in cotton under salt stress. *Environmental And Experimental Botany* 49: 69–76.

[144] Flohe L., Ursini F., Fojta M., Fojtova M., 2008. Peroxidase: a term of many meanings. *Antioxid. Redox Signaling* 10: 1485–1490.

[145] Zhang F.Q., Wang Y.S., Lou Z.P., Dong J.D., 2007. Effect of heavy metal stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of two mangrove plantseedlings (*Kandelia candel* and *Bruguiera gymnorrhiza*). *Chemosphere* 67: 44-50.

[146] Del Rio L.A., Sandalio L.M., Corpas F.J., Palma J.M., Barroso J.B., 2006.

Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes. Production, scavenging, and role in cell signaling. *Environmental and Experimental Botany* 141: 330-335.

[147] Ranieri A., Castagna A., Scebba F., Careri M., Zagnoni I., Predieri G., Pagliari M., Sanità di Toppi L., 2005. Oxidative stress and PC characterisation in bread wheat exposed to Cd excess. *Plant Physiology and Biochemistry* 43: 45-54.

[148] Iannone M.F., Rosales E.P., Groppa M.D., Benavides M.P., 2010. Reactive oxygen species formation and cell death in catalase deficient tobacco leaf disks exposed to cadmium. *Protoplasma* 245: 15-27.

[149] Jin X., Yang X., Mahmood Q., Islam E., Liu D and Li H., 2008. Response of antioxidant enzymes, ascorbate and glutathione metabolism towards Cd in hyperaccumulator and nonhyperaccumulator ecotypes of *Sedum Alfredii* H. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23: 517-529.

[150] Vitoria A.P., Lea, P.J., Azevedo R.A., 2001. Antioxidant enzymes responses to cadmium in radish tissues. *Phytochemistry* 57: 701–710.

[151] Mohamed A.A., Castagna A., Ranieri A., Sanità di Toppi L., 2012. Cadmium tolerance in *Brassica juncea* roots and shoots is affected by antioxidant status and phytochelatin biosynthesis. *Plant Physiology and Biochemistry* 57: 15-22.

- [152] Das P., Samantaray S., Rout G.R., 1997. Studies on cadmium toxicity in plants: a review. *Environmental Pollution* 98: 29-36.
- [153] Shim I.S., Momose Y., Yamamoto A., Kim D.W., Usui K., 2003. Inhibition of catalase activity by oxidative stress and its relationship to salicylic acid accumulation in plants. *Plant Growth Regulation* 39: 285–292.
- [154] Markovska Y.K., Gorinova N.I., Nedkovska M.P., Miteva K.M., 2009. Cadmium induced oxidative damage and antioxidative responses in *Brassica juncea* plants. *Plant Biology* 53: 151-154.
- [155] Meng H., Hua S., Shamsi I.H., Jilani G., Li Y and Jiang L., 2009. Cd-induced stress on the seed germination and seedling growth of *Brassica napus* L., and its alleviation through exogenous plant growth regulators. *Plant Growth Regulation* 58: 47-59.
- [156] Sbartai H., Djebar M.R., Sbartai I., Berrabbah H., 2012. Bioaccumulation du Cd et du Zn chez les plants de tomates (*Lycopersicon esculentum* L.). *Comptes Rendus Biologies* 335: 585–593.
- [157] Lamhamdi M., Bakrima A., Aarab A., Lafont R., Sayah F., 2011. Lead phytotoxicity on wheat (*Triticum aestivum* L.) seed germination and seedlings growth. *Comptes Rendus Biologies* 334: 118–126.

## Résumé

Ce travail vise à évaluer l'accumulation du cadmium (Cd) au niveau des organes de jeunes plantules de *Lens culinaris* (lentilles), ainsi que son effet sur les activités enzymatiques intervenant dans le système antioxydant : catalase (CAT) et la peroxydase (POD). Des graines préalablement cultivées sur un sol de type tourbe ont subi un traitement par des concentrations croissantes en CdCl<sub>2</sub> (0, 500, 1000, 2500, µM) pendant 15 jours. Les résultats ont montré une augmentation des activités spécifiques de CAT et POD des deux parties de la plante (racines et feuilles) avec l'augmentation des concentrations de Cd. Le maximum est atteint à 1000 µM, au-delà, les activités diminuent. Ces résultats montrent que *Lens culinaris* possède un haut niveau de tolérance et à l'accumulation de Cd. Le traitement de Cd modéré (500 à 1000 µM) atténue le stress oxydatif dans la plante étudiée, tandis que l'addition de 2500 µM pourrait causer une augmentation de la production de ROS.

Ce travail montre que les lentilles (*Lens culinaris*) sont équipées d'un mécanisme antioxydant efficace contre le stress oxydatif induit par le cadmium jusqu'à la concentration de 1000 µM et qui protège la machinerie photosynthétique de la plantes contre les dommages. Cette plante pourrait servir de biomarqueur de la pollution des sols par les métaux et prévenir de l'effet de ces derniers sur la santé de la population environnante.

Mots Clès : peroxydase, catalase

## **Abstract**

This work aims to evaluate the accumulation of cadmium (Cd) in organs of young seedlings of *Lens culinaris* (lenses), as well as its effect on the enzyme activities involved in the antioxidant system: catalase (CAT) and peroxidase (POD). Seeds grown on a peat soil treated by increasing concentrations of CdCl<sub>2</sub> (0, 500, 1000, 2500, μM) for 15 days. The results showed an increase of the specific activities of CAT and POD of the two parts of the plant (roots and leaves) with increasing Cd concentrations. The maximum is reached at 1000 μM, beyond, activities declined. These results demonstrate that *Lens culinaris* has a high level of tolerance and accumulation of Cd. The treatment of moderate Cd (500 to 1000 μM) Attenuates oxidative stress in plants studied, while the addition of 2500 μM could cause an increase in the production of ROS. The moderate treatment of Cd (500 to 1000 μM) Attenuates oxidative stress in plants studied, while the addition of 2500 μM could cause an increase in the production of ROS.

This work shows that the lentils (*Lens culinaris*) are equipped with an effective antioxidant mechanism against oxidative stress induced by cadmium up to a concentration of 1000 μM, and protects the photosynthetic machinery of plants against damage. This plant could serve as a biomarker of pollution of soils by metals and prevent the effect of these on the health of the surrounding population.

**Keywords:** Peroxidase, Catalase, Oxidative Stress, Cadmium, *Lens culinaris*, stress oxydant,

## ملخص

يهدف هذا العمل لتقييم تراكم الكادميوم (الكادميوم) في أجهزة شتلات العدس (*lens culinaris*) وأثرها على أنشطة الانزيمات المشاركة في النظام المضاد للأكسدة : الكاتالاز (CAT) ، والبيروكسيداز (POD) .

البذور المزروعة في تراب من نوع الجفت عولجت بتركيزات مختلفة (0، 500، 1000، 2500) ميكرومولار من  $CdCl_2$  لمدة 15 يوما. أظهرت النتائج زيادة في الأنشطة الانزيمية المحددة ل CAT و POD من جزأين من النبات (الجنور والأوراق) مع زيادة تركيزات الكادميوم لتصل إلى الحد الأقصى في 1000 ميكرومولار. عدى عن ذلك فهي تتناقص

تظهر هذه النتائج أن *lens culinaris* لديها مستوى عال من التسامح في تراكم الكادميوم.

العلاج المعتدل بالكادميوم 500-1000 ميكرومولار يخفف من في النبتة المدروسة ، في حين أن إضافة 2500 ميكرومولار يمكن أن تسبب زيادة إنتاج ROS.

ويبين هذا العمل أن *lens culinaris* مجهزة بآلية مضادة للأكسدة فعالة ضد الإجهاد التأكسدي الذي يسببه الكادميوم إلى حد تركيز 1000 ميكرومولار ويحمي الجهاز الضوئي للنباتات من التلف. هذا النبات يمكن أن يكون بمثابة العلامات البيولوجية لتلوث التربة بالمعادن ومنع تأثيرها على صحة السكان المحيطين.

**الكلمات المفتاحية :** الإجهاد التأكسدي، الكاتالاز، البيروكسيداز، الكادميوم، *lens culinaris*

Année Universitaire:2013/2014

Bounab Sarah  
Sahli Imene Nour El houda

Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master en Biochimie  
Option : Analyse Protéomique Et Santé

**Theme : Etude de l'activité de la peroxydase (POD) et de la catalase (CAT) chez (*Lens culinaris*) contaminée par le cadmium**

### Résumé

Ce travail vise à évaluer l'accumulation du cadmium (Cd) au niveau des organes de jeunes plantules de *Lens culinaris* (lentilles), ainsi que son effet sur les activités enzymatiques intervenant dans le système antioxydant : catalase (CAT) et la peroxydase (POD). Des graines préalablement cultivées sur un sol de type tourbe ont subi un traitement par des concentrations croissantes en CdCl<sub>2</sub> (0, 500, 1000, 2500, µM) pendant 15 jours. Les résultats ont montré une augmentation des activités spécifiques de CAT et POD des deux parties de la plante (racines et feuilles) avec l'augmentation des concentrations de Cd. Le maximum est atteint à 1000 µM, au-delà, les activités diminuent. Ces résultats montrent que *Lens culinaris* possède un haut niveau de tolérance et à l'accumulation de Cd. Le traitement de Cd modéré (500 à 1000 µM) atténue le stress oxydatif dans la plante étudiée, tandis que l'addition de 2500 µM pourrait causer une augmentation de la production de ROS.

Ce travail montre que les lentilles (*Lens culinaris*) sont équipées d'un mécanisme antioxydant efficace contre le stress oxydatif induit par le cadmium jusqu'à la concentration de 1000 µM et qui protège la machinerie photosynthétique de la plantes contre les dommages. Cette plante pourrait servir de biomarqueur de la pollution des sols par les métaux et prévenir de l'effet de ces derniers sur la santé de la population environnante.

**Keywords:** peroxydase, catalase, stress oxydant, cadmium, *lens culinaris*

**Laboratoire de recherche: Biologie et Environnement, Université Constantine 1**

### Menmbre de Jury :

**Prèsident : NOUADRI T.**

M.C.A., Université Constantine 1.

**Encadreur : MECHAKRA A.**

Professeur, Université Constantine 1.

**Examineur : BOUKHALFA H.**

M.A.A., Univerité Constantine 1