



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE



وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

Université des Frères Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الإخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة و الحياة

قسم الكيمياء الحيوية والبيولوجيا الخلوية والجزيئية
Département de Biochimie et Biologie Cellulaire et Moléculaire

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master
Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie
Filière : Sciences Biologiques
Spécialité : Biochimie

Option : Analyse Protéomique et Santé

Thème

**Effet du Zn sur la croissance et le système antioxydant de
Lens culinaris cultivée sur milieu gélosé.**

Présenté et soutenu par :

HAFDI Roumeissa
BENNIOU Mohamed Elhadi

Le : 03/07/2016

Jury d'évaluation :

Présidente du jury :	Mme MECHAKRA A.	Prof. - UFM Constantine.
Encadreur :	Mme BENHAMDI A.	MCB - UFM Constantine.
Examinatrice :	Mme BENCHIHEUB M.	MCB - UFM Constantine.

Année Universitaire 2015-2016

Remerciements

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

*Nous adressons nos remerciements les plus sincères à notre encadrante, **Docteur BENHAMDI A.**, pour son précieux temps, sa générosité, ses conseils, son aide et sa grande patience malgré ses charges.*

*Nous exprimons notre profonde et respectueuse gratitude à **Mme MECHAKRA A.**, Professeur à l'université des Frères Mentouri de Constantine, qui nous a donné la possibilité de réaliser ce travail au sein du laboratoire de Biologie et Environnement (LBE), et qui nous a fait l'honneur de présider le jury de ce mémoire.*

*Nous adressons nos vifs et sincères remerciements à **Mme BENCHIHEUB M.**, Docteur à l'université des Frères Mentouri de Constantine, pour l'honneur qu'elle nous a fait en acceptant d'examiner ce travail.*

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

Dédicaces

Je dédie ce mémoire :

*A mes parents pour leur amour inestimable, leur confiance, leur soutien,
leurs sacrifices et toutes les valeurs qu'ils ont su m'inculquer, et m'avoir aidé
à arriver là où j'en suis ,
Merci pout tout.*

A mon frère : CHOUAIB

A mes soeurs et meilleures amies : IMENE et RAYANE

A toute la familles

A tous mes collègues et mes amis

Hafdi roumeissa

Je dédie ce mémoire à :

Mes parents :

Ma mère , qui a oeuvré pour ma réussite, de par son amour, son soutien, tous les sacrifices consentis et ses précieux conseils, pour toute son assistance et sa présence dans ma vie .

Mon père Abderhamne, qui peut être fier et trouver ici le résultat de longues années de sacrifices et de privations pour m'aider à avancer dans la vie.

Mes frères Khaled et Hamza et sœurs Maroua et Safa qui n'ont cessé d'être pour moi des exemples de persévérance, de courage et de générosité.

Pour chacun qui a partagé l'amphi, la salle et la bibliothèque à tous mes collègues Pour ceux qui me connaissent, même pour un instant de temps au cours de mon parcours scolaire

Benniou mohamed elhadi

Liste des figures

Figure 1 : Translocation du zinc à travers les vaisseaux du xylème	5
Figure 2 : Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqués en biologie.....	7
Figure 3 : Les principales cibles des ROS.....	8
Figure 4 : Modifications des chaînes latérales des acides aminés après attaque radicalaire.....	10
Figure 5 : Lésions de l'ADN suite à un stress oxydant.....	10
Figure 6 : Effet du zinc sur la croissance de <i>Lens culinaris</i> après 6 jours de croissance.....	19
Figure 7 : Effet du zinc sur la longueur des parties aériennes et racinaires de <i>Lens culinaris</i>	20
Figure 8 : Effet du Zn sur la teneur en MDA de <i>Lens culinaris</i>	21
Figure 9 : Effet du Zn sur la teneur des protéines totales de <i>lens culinaris</i>	23
Figure 10 : L'activité de la CAT dans les racines et les parties aériennes de <i>Lens culinaris</i>	24
Figure 11 : L'activité de la GST dans les racines et les parties aériennes de <i>Lens culinaris</i>	25

Liste des abréviations

ASC : acide ascorbique.

BSA : Bovin Serum Albumin.

CAT : Catalase.

CDNB : 1-chloro-2,4-dinitrobenzène.

EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid

ERO : Espèces réactives de l'oxygène.

ETM : Eléments trace métallique.

GPx : Glutathion peroxydase.

GR : Glutathion réductase.

GSH: Glutathion réduit.

GSSG : Glutathion disulfure.

GST: Glutathion S-transférase.

H₂O₂: Peroxyde d'hydrogène.

HO₂[°]: Radical hydroperoxyde.

HNE: 4-hydroxynonéal.

MDA: Malondialdéhyde.

NADPH oxidase : Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase.

ROS: Reactive oxygen species.

SH: Groupement thiol.

SOD: Superoxyde dismutase.

TBA: Acide Thio Barbiturique.

TNB: Acide thionitrobenzoïque.

PVP: polyvinylpyridine.

ZIP : Zinc-regulated transporters, Iron-regulated transporter-like Protein.

Table des matières

Liste des figures.....	i
Liste des abréviations.....	ii
Introduction.....	1

CHAPITRE 1: SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Les métaux lourds.....	2
1.1 Définition.....	2
1.2. Origine des métaux lourds.....	2
1.2.1. Origine naturelle.....	2
1.2.2. Origine anthropique.....	2
1.3. Les différents types de métaux lourds.....	2
1.3.1. Les métaux essentiels.....	2
1.3.2. Les métaux non essentiels.....	2
1.4. Toxicité et tolérance des métaux lourds.....	3
1.4.1. La modification de la perméabilité membranaire.....	3
1.4.2. Le développement d'un système antioxydant puissant	3
1.4.3. La chélation.....	3
1.5. Le zinc et les plantes.....	4
1.5.1. Définition	4
1.5.2. Rôle du zinc.....	4
1.5.3. Transport du zinc dans les plantes	4
1.5.3.1. Absorption	4
1.5.3.2. Translocation.....	5
1.5.3.3. Séquestration	5
1.5.4. Phytotoxicité du zinc	5
2. Le stress oxydatif.....	6
2.1. Les espèces réactives de l'oxygène	6
2.2. Origine des espèces réactives de l'oxygène.....	6
2.3. La production des ROS	7
2.4. Les cibles des ROS dans la cellule végétale.....	7
2.5. Conséquences du stress oxydatif.....	8
3. Le système de défense antioxydant	11

3.1. Les systèmes antioxydants enzymatiques.....	11
3.1.1. La superoxyde dismutase (SOD).....	11
3.1.2. La catalase.....	11
3.1.3. Les peroxydases (POD).....	12
3.1.4. La glutathion peroxydase (GPX).....	12
3.1.5. La Glutathion-S- transférase (GST).....	12
3.2. Les systèmes antioxydants non enzymatiques.....	13
3.2.1. Le glutathion.....	13
3.2.2. La vitamine E ou α -tocophérol.....	13
3.2.3. La vitamine C ou acide ascorbique (ASC).....	13

CHAPITRE 2 : MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Matériel végétal.....	15
2. Milieu utilisé et conditions de culture <i>in-vitro</i>	15
2.1. Stérilisation des graines.....	15
2.2. Choix des concentrations du Zn	15
2.3. Germination des graines.....	15
3. Méthodes de dosage biochimique.....	16
3.1 Préparation de l'extrait brut.....	16
3.2 Dosage du malonedialdéhyde (MDA).....	16
3.3 Dosage des protéines.....	17
3.4 Evaluation de l'activité de la catalase (CAT)	17
3.5 Evaluation de l'activité de la Glutathion S-transférase.....	17
4. Analyse statistique.....	18

CHAPITRE 3 : RÉSULTATS ET DISCUSSION

1. Effet du zinc sur la croissance de <i>Lens culinaris</i>	19
2. Effet du zinc sur la teneur de MDA (malondialdhyde).....	21
3. Effet du zinc sur la teneur des protéines totales	23
4. Effet du zinc sur l'activité de la CAT.....	24
5. Effet du zinc sur l'activité de la glutathion s-transférase.....	25
Conclusion.....	26
Références bibliographiques.....	29
Annexes	
Résumés	

Introduction

Un problème environnemental majeur, généré par les émissions industrielles et les déchets urbains dus aux activités humaines, réside dans la contamination du sol, de l'eau et de l'air par une diversité de composants organiques et inorganiques. Les substances polluantes présentes dans le sol sont extrêmement nombreuses et parmi les plus répandues il y a les hydrocarbures, les pesticides, les matières plastiques, l'amiante, les métaux lourds (ou éléments traces métalliques) et divers solvants (Adriano 2001; Alkorta et al. 2004).

Si certains éléments métalliques (ETM) ou oligo-éléments (Fe, Mn, Zn, Cu, Mo, Ni), présents à l'état de traces, sont essentiels pour l'organisme, l'accroissement de leur concentration peut représenter un danger pour l'environnement et pour les êtres vivants. Les autres éléments sont toxiques même à faible concentration (Marschner 1995). A cette catégorie appartiennent différents éléments, tels que le plomb, mercure, cadmium... Leur présence est fortement aggravée par les activités industrielles et anthropogéniques. Ce qui provoque la pollution de l'environnement (Adriano 2001; Alkorta et al. 2004).

Parmi les stratégies innovantes de dépollution, figure la phytoremédiation, c'est-à-dire l'utilisation de plantes et de leurs microbiotes pour éliminer, contenir ou rendre moins toxiques les contaminants environnementaux.

Comme seules quelques espèces sont susceptibles d'être utilisées pour la remédiation des sols contaminés par les ETM, les mécanismes de sensibilité, de tolérance, d'accumulation et de résistance aux ETM ont largement suscité l'intérêt des chercheurs ces dernières années. Il a ainsi été démontré que les végétaux capables de croître dans des milieux contaminés développent plusieurs stratégies pour se protéger de la toxicité chimique engendrée par la présence des ETM, comme leur précipitation, leur complexation ou leur compartimentation cellulaire grâce à un système antioxydant puissant (Chevrier 2013).

L'élément trace sélectionné dans ce travail est parmi les polluants métalliques les plus fréquemment rencontrés dans les sols, à savoir le zinc. C'est un oligoélément essentiel au développement des végétaux mais il s'avère toxique à forte dose.

L'objectif de ce travail est d'étudier, *in vitro*, l'effet du zinc sur la croissance et le système antioxydant d'une légumineuse : *Lens culinaris* par évaluation, dans les parties aériennes et racinaires :

- du niveau de la lipoperoxydation membranaire (déterminé par le dosage du Malondialdéhyde (MDA))
- de la teneur des protéines totales
- des activités de la glutathion S-tansférase et de la catalase.

Synthèse bibliographique

1. Les métaux lourds

1.1 Définition

Un métal lourd ou élément trace métallique (ETM) est tout métal de densité supérieure à 5 g/cm³, de numéro atomique élevé et présentant un danger pour l'environnement (Di Benedetto et al. 1997). Par ordre décroissant de toxicité, les métaux sont classés comme suit : Hg > Cr > Ti > Mo > Cu > Ni > Pb > Zn (Miquel 2014).

1.2. Origine des métaux lourds

Les métaux lourds sont des constituants naturels de tous les écosystèmes. Ils se trouvent dans l'atmosphère, l'hydrosphère, la lithosphère et la biosphère. Leur distribution dans l'environnement procède à deux origines : origine naturelle et anthropique (Aoun 2008).

1.2.1. Origine naturelle

Les métaux lourds entrent naturellement dans l'atmosphère à partir du transport, par le vent, de particules du sol, des éruptions volcaniques, des feux de forêts et des émissions d'aérosol marin. (Callender et Lollar 2003).

1.2.2. Origine anthropique

L'autre source des métaux est d'origine anthropique. Les principaux types de pollution anthropique, responsables de l'augmentation des flux de métaux, sont liés aux rejets urbains et industriels, aux pratiques agricoles, ... (Behanzin et al. 2015).

1.3. Les différents types de métaux lourds

1.3.1. Les métaux essentiels

Les métaux essentiels sont des éléments indispensables à l'état de trace pour de nombreux processus cellulaires (métabolisme des protéines, des glucides et des lipides, ...). Ils se trouvent en très faible proportion dans les tissus biologiques. Certains peuvent devenir toxiques lorsque la concentration dépasse un certain seuil. C'est le cas du cuivre (Cu), du nickel (Ni), du zinc (Zn), du fer (Fe), ... (Behanzin et al. 2015).

1.3.2. Les métaux non essentiels

Les métaux non essentiels ont un caractère polluant. Ils n'ont aucun effet bénéfique connu pour la cellule. Ils exercent des effets toxiques sur les organismes vivants même à faible concentration. C'est le cas du plomb (Pb), du mercure (Hg), du cadmium (Cd), ... (Baker et Walker 1990; Behanzin et al. 2015).

1.4. Toxicité et tolérance des métaux lourds

Le premier effet de toxicité des métaux lourds observable chez les végétaux est une inhibition de la croissance. Celle-ci s'accompagne très souvent par : des chloroses foliaires, importantes lésions nécrotiques, jaunissements progressifs, repliements ou dessèchements des feuilles...(Remon 2009).

Certaines plantes tolèrent des concentrations importantes en métaux dans leurs tissus. Cette tolérance est la conséquence de trois mécanismes principaux :

- la modification de la perméabilité membranaire. Cela permet de réduire l'entrée des métaux dans la cellule,
- le développement d'un système antioxydant puissant qui limite les dégâts des espèces réactives de l'oxygène,
- la chélation intracellulaire empêchant l'activité de l'ion métallique.

1.4.1. La modification de la perméabilité membranaire

Le transport à travers la membrane plasmique des cellules racinaires est un processus important car les ions ne peuvent pas diffuser librement à travers la double couche phospholipidique (Mitch 2002). La membrane plasmique peut limiter l'accumulation des ions toxiques soit par la modification de l'ensemble du flux ionique, soit par l'employabilité des systèmes ultra spécifiques empêchant le transport des ions toxiques (Meharg 1993).

1.4.2. Le développement d'un système antioxydant puissant

Le système antioxydant joue un rôle central dans la détoxification des métaux lourds ayant pénétré dans la cellule. Il contrôle la production des ROS par trois activités enzymatiques clefs. Ces enzymes occupent une place centrale dans les mécanismes de détoxification des ROS ; il s'agit des superoxyde-dismutases (SOD), catalases (CAT) et peroxydases (POX). Ces enzymes ont une action directe et complémentaire sur la cascade radicalaire (Boyd 1998).

1.4.3. La chélation

La chélation est la formation des complexes entre les métaux et les peptides ou les acides organiques ou bien entre les métaux et les ions inorganiques. Elle s'effectue au niveau de la paroi cellulaire ou à l'intérieur du cytoplasme. Il en résulte que le métal ne peut pas interférer avec les réactions métaboliques sensibles de la plante (Kabata-Pendias 2010).

1.5. Le zinc et les plantes

1.5.1. Définition

Le zinc est un élément chimique de symbole Zn et de numéro atomique 30. Sa masse atomique est de 65,39 g/mole.

Le zinc est classé comme le 24^{ème} élément le plus abondant dans la croûte terrestre avec une concentration de 70mg/Kg. Les principaux minerais du zinc sont des sulfures tels que la sphalérite (ZnS cubique) et la wurtzite (ZnS hexagonal), des carbonates tel que la smithsonite (ZnCO₃) et des silicates tel que la willémitte (Zn₂SiO₄).

Le zinc est utilisé essentiellement dans la protection du fer et de l'acier (galvanisation), les revêtements (35% de la consommation globale), les alliages (25%) et dans la production du cuivre (20%) (Moore 2012).

1.5.2. Rôle du zinc

Le zinc assure plusieurs rôles au niveau de la cellule :

- Il entre dans la composition d'un très grand nombre d'enzymes (plus de 300), il remplit trois types de fonctions : catalytiques, co-catalytiques ou structurales.
- Il intervient dans le métabolisme des sucres, des protéines et des phosphates,
- Il est impliqué dans la réplication et la transcription de l'ADN, via des métalloprotéines, et donc dans la régulation de l'expression des gènes.
- Il influence l'intégrité et la perméabilité des membranes et protège les lipides et les protéines membranaires du stress oxydant (Sadeghzadeh 2013).

Chez les végétaux, une carence en zinc entraîne des modifications morphologiques des feuilles (taille réduite et déformation). Chez les dicotylédones un raccourcissement de l'entre-nœud et de la tige est observé (Kabata-Pendias 2010; Sadeghzadeh 2013).

1.5.3. Transport du zinc dans les plantes

Le transport du zinc dans la plante s'effectue grâce trois mécanismes : l'absorption, la translocation et la séquestration.

1.5.3.1. Absorption

L'absorption est le mécanisme de transport du zinc du milieu de culture vers les racines. Elle est assurée par toute la surface des racines qui est en contact avec l'eau et ses substances dissoutes. La vitesse d'absorption du zinc dépend de l'espèce et des composition et concentration du milieu de croissance (Tsonev et Lidon 2012).

L'absorption du zinc se fait par des transporteurs spécifiques appelés ZIP (Zinc-regulated transporters, Iron-regulated transporter-like Protein). Il est transporté sous forme de cation libre ou bien sous forme chélatée avec les phytosidérophores (Von Wiren et al. 1996).

1.5.3.2. Translocation

La translocation est le transport du Zn au sein de la plante des racines vers les autres parties de la plante. Elle varie en fonction de l'espèce végétale et de la forme du métal.

Le déplacement du zinc des racines vers les parties aériennes est effectué à travers le xylème (voir figure 1) par circulation de la sève brute (Marcato 2007).

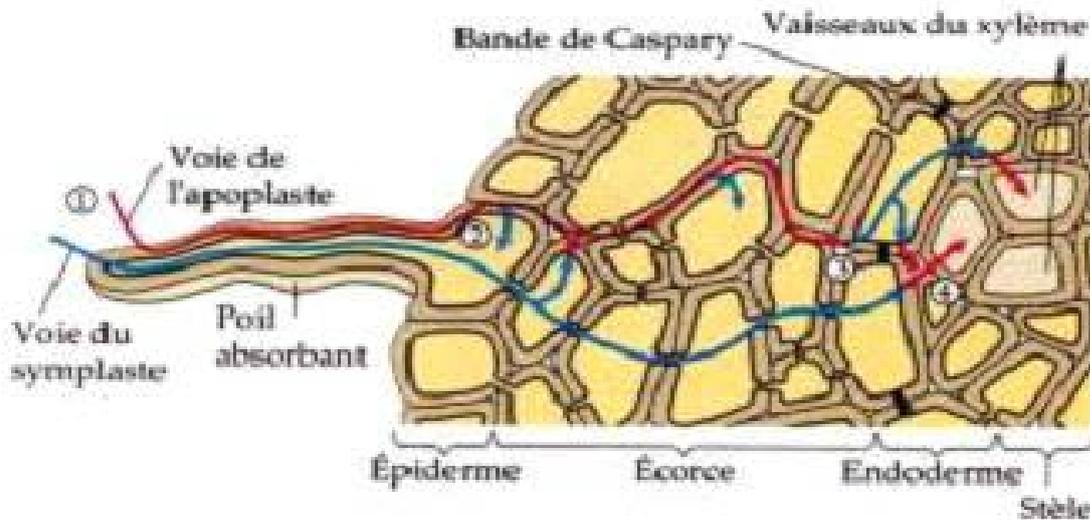


Figure 1 : Translocation du zinc à travers les vaisseaux du xylème (Marcato 2007): La translocation du zinc à travers les vaisseaux du xylème s'effectue par l'intermédiaire des symplastes et apoplastes.

1.5.3.3. Séquestration

La séquestration est la complexation des métaux par la méthionine, la phytochélatine et le Glutathion pour les transporter vers les vacuoles et les inactiver (Sheoran et al., 2009). Chez les plantes non accumulatrices, le zinc est séquestré dans les vacuoles des racines (Lasat et al. 2000). Chez les plantes hyperaccumulatrices, la séquestration se fait dans les vacuoles des parties aériennes (Milner et Kochian 2008).

1.5.4. Phytotoxicité du zinc

L'excès métallique est un facteur de stress entraînant des modifications importantes au niveau des processus physiologiques des plantes (Benavides, Gallego, et Tomaro 2005; Sharma et Dubey 2005). A fortes concentrations, les ions Zn^{2+} engendrent une toxicité

comparable à celle provoquée par des ETM qui n'ont pas de fonction connue dans le métabolisme de la plante.

La modification majeure concerne le noyau des cellules de l'extrémité des racines ; la chromatine est fortement condensée et certaines des cellules corticales montrent la rupture et la dilatation de leur membrane nucléaire en présence de 7.5 mM de zinc.

En plus du cytoplasme qui perd sa structure, la désintégration d'organites et le développement de vacuoles sont aussi observés (Garty, Karary, et Harel 1992 ; Rout et Das 2009).

2. Le stress oxydatif

Le stress oxydatif se définit comme étant un déséquilibre de la balance oxydants-antioxydants en faveur des oxydants (Atamer et al. 2008). Il se développe lorsque les radicaux libres des molécules oxydantes et les espèces réactives de l'oxygène (ERO) sont produits plus rapidement qu'ils ne peuvent être neutralisés par l'organisme (Tremellen 2008) .

2.1. Les espèces réactives de l'oxygène

Les espèces réactives de l'oxygène (ERO ou ROS) sont des dérivés de l'oxygène où certains électrons se trouvent dans un état énergétique excité et très réactionnel. Elles représentent la plus importante classe d'espèces réactives générées dans les organismes vivants et la cause majeure du stress oxydatif (Valko et al., 2007).

2.2. Origine des espèces réactives de l'oxygène

La molécule de dioxygène est en réalité bi-radicalaire. Elle possède, en effet, deux électrons célibataires sur des orbitales différentes. En présence de rayonnements, de métaux ou d'enzymes :

- Le dioxygène est capable de capter un électron pour donner le radical superoxyde O_2^{\bullet} qui est un radical modérément réactif (Ji 2001).

- Ce radical est le substrat des superoxydes dismutases (SOD) qui le transforment en eau oxygénée H_2O_2 (voir figure 2).

- L'eau oxygénée peut avoir plusieurs destinations. En présence de métaux, en particulier du Fe^{+2} , elle est transformée en radical hydroxyl OH^{\bullet} par la réaction de Fenton.

- Ce dernier est extrêmement réactif et va oxyder très rapidement les molécules voisines qui forment d'autres radicaux libres (MOREL et BAROUKI 1999).

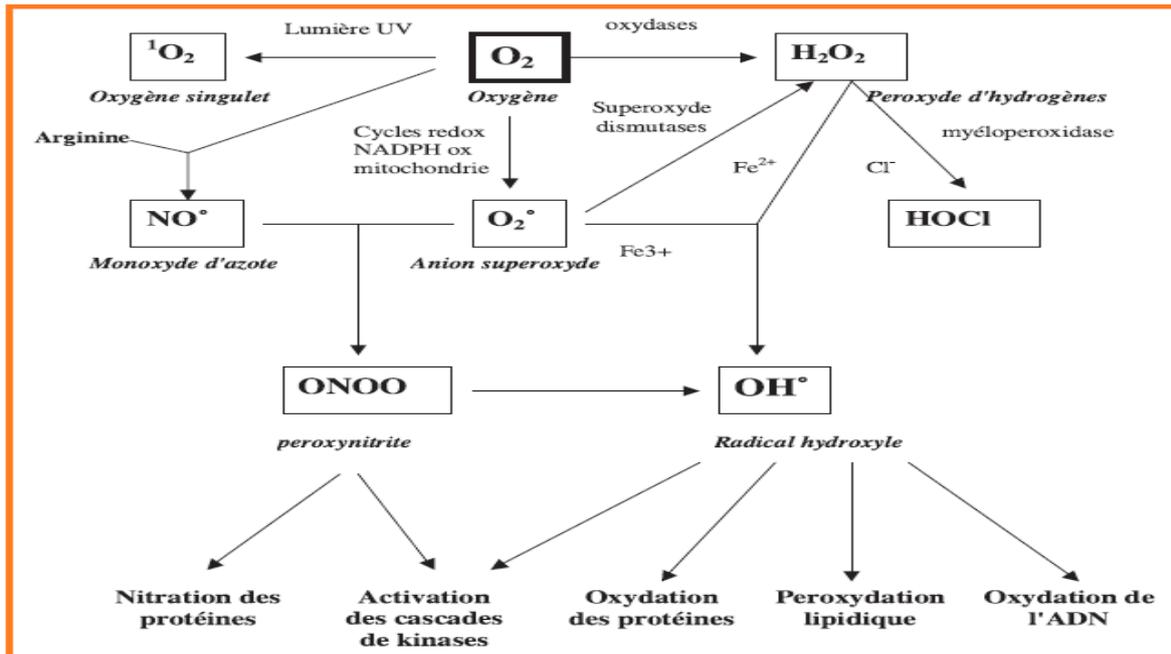


Figure 2 : Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène (Favier 2003). En présence de rayonnements, de métaux ou d'enzymes le dioxygène peut se transformer en plusieurs radicaux, ces derniers provoquent plusieurs dommages cellulaires.

2.3. La production des ROS

Même si les ROS sont formées au cours du métabolisme normal de la plante, l'augmentation de leur concentration intracellulaire provoque un stress oxydatif. En effet les stress induits par les métaux lourds, la sécheresse, la salinité, les chocs thermiques, les polluants atmosphériques... sont responsables d'une production accrue des ROS (Noctor et Foyer 1998; Dat et al. 2000; Van Breusegem et Dat 2006).

2.4. Les cibles des ROS dans la cellule végétale

Les formes réactives de l'oxygène sont de puissants agents oxydants capables d'altérer toute une série de cibles biologiques importantes qui sont : les protéines, les lipides, l'ADN...(voir figure 3). Les conséquences de ces altérations sont : inhibition de l'activité enzymatique, perturbation du métabolisme végétal (notamment la photosynthèse et la respiration), oxydation des protéines, altération des membranes cellulaires via l'induction du phénomène de peroxydation lipidique et apparition des cassures au sein de l'ADN. (Cheng 2003; Devi et Prasad 1999).

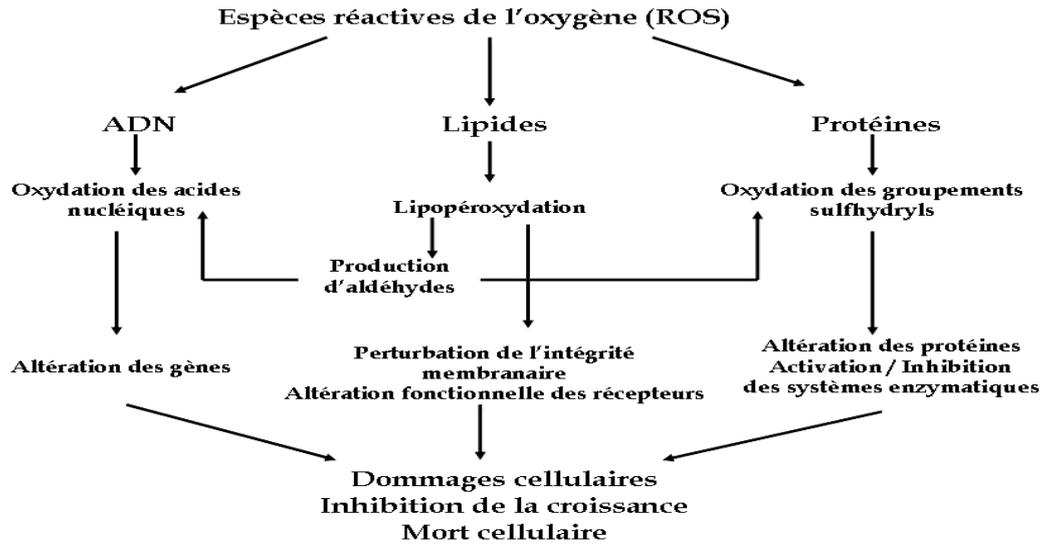


Figure 3 : Les principales cibles des ROS. Les principales cibles des ROS sont l'ADN, les lipides et les protéines. Lors d'une attaque de ces molécules par les ROS, l'oxydation des acides nucléiques, la lipopéroxydation et l'oxydation des groupements sulfhydryls sont observées (Devi et Prasad 1999).

2.5. Conséquences du stress oxydatif

Les conséquences majeures de l'attaque des ROS sont la perturbation de l'intégrité membranaire (par la peroxydation lipidique), l'altération des protéines (par oxydation de leurs groupements thiols) et l'altération des gènes (par oxydation de l'ADN).

➤ La peroxydation lipidique (lipoperoxydation)

Les lipides et principalement les acides gras polyinsaturés (PUFA) de la membrane cellulaire représentent la première cible des espèces réactives de l'oxygène (ERO). Le résultat est l'induction des processus de peroxydation lipidique et la formation des hydroxydes (Møller et al., 2007 et Michel et al. 2008).

Le processus de la peroxydation lipidique comprend trois étapes (Michel et al. 2008): initiation, propagation et terminaison.

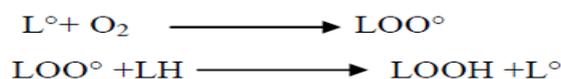
• Initiation

La phase d'initiation consiste en une abstraction d'un atome d'hydrogène d'un acide gras polyinsaturé. Elle est due à une attaque par un radical libre «R°» (le plus souvent OH° mais aussi O₂° et H₂O₂). Le résultat est l'apparition d'un radical lipidique «L°».



• Propagation

En réagissant avec l'oxygène moléculaire, la nouvelle molécule apparue dans la phase d'initiation «L°» forme un radical peroxyde (LOO°) instable (voir réaction ci-dessous). A son tour, ce radical réagit avec un autre acide gras afin de donner un hydroperoxyde (LOOH) et un nouveau radical lipidique.

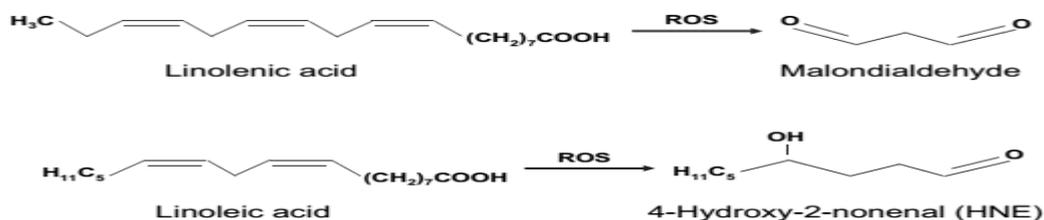


• Terminaison

Dans cette phase, les radicaux lipidiques réagissent ensemble pour donner des produits non radicalaires (voir réaction, ci-dessous). La réaction la plus fréquente est une réaction de dimérisation entre deux radicaux peroxydes (Michel et al. 2008)



Il a été découvert que plusieurs types d'hydroperoxydes sont produits pendant la peroxydation lipidique. Les plus réactifs et les plus étudiés sont les composés aldéhydiques tels que le 4-hydroxynonéanal (HNE) et le malondialdéhyde (MDA) résultant de l'attaque des acides linoléique et linolénique par OH° et O₂ (voir réaction ci-dessous).



Les hydroperoxydes formés sont toxiques pour les cellules et provoquent la baisse de la fluidité membranaire et l'altération des protéines membranaires (Gill et Tuteja 2010).

➤ L'oxydation des protéines

de nombreuses enzymes et protéines de transport sont sensibles à l'action des ROS (Stadtman et Levine 2000; Favier 2003). Les plus touchées sont celles comportant un groupement sulphydryle, SH, oxydable par le radical hydroxyle et le peroxyde d'hydrogène (Stadtman et Levine 2000).

Ces radicaux participent à la formation de groupements carbonyles sur la chaîne latérale de certains acides aminés (voir figure 4) et sont à l'origine de la dégradation irréversible des protéines.

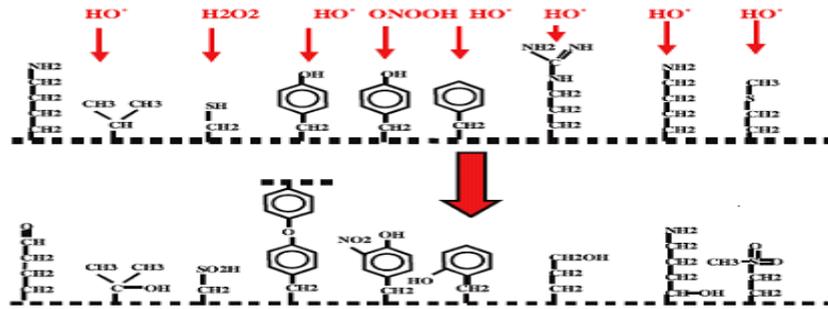


Figure 4 : Modifications des chaînes latérales de quelques acides aminés après attaque radicalaire (Favier 2003). L’histidine, l’arginine, la lysine ou encore la proline sont des cibles privilégiées du processus d’altération oxydative (Wong et al. 2008). De nombreux autres acides aminés sont également susceptibles d’être oxydés par les ROS.

➤ **Dommages de l’ADN**

Les acides nucléiques sont très sensibles aux radicaux libres. Les altérations oxydatives causées par les ROS sont considérées comme la source majeure de dommages spontanés sur l’ADN (voir figure 5). Le spectre des dégâts causés par les ROS est large avec des lésions différentes (Beckman et Ames 1997).

Les dommages de l’ADN affectent le développement et la croissance de tout l’organisme. Ils provoquent une réduction de la synthèse protéique ainsi qu’une destruction et une inactivation des protéines photosynthétiques. Ils peuvent aussi provoquer un arrêt ou une induction de la transcription, une induction des voies de transduction du signal et des erreurs de réplication, une destruction de la membrane cellulaire et une instabilité génomique (Cooke et al. 2003).

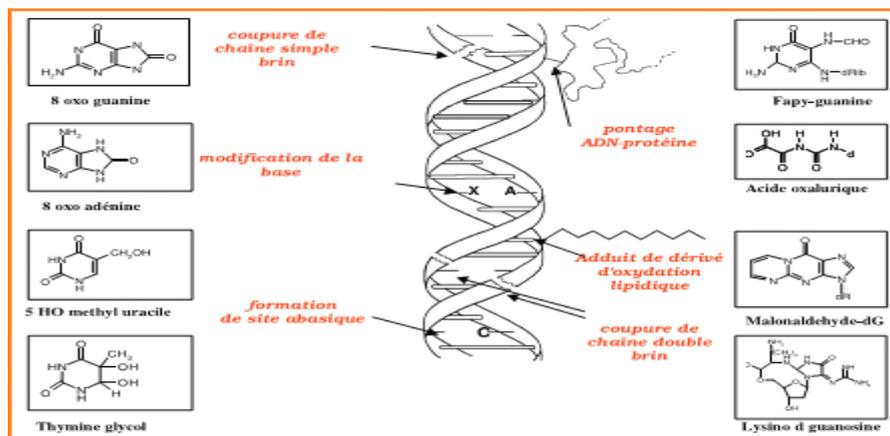


Figure 5 : Lésions de l’ADN formées suite à un stress oxydant (Favier 2003). Cinq classes principales de dommages oxydatifs provoqués par l’OH• peuvent être générées. Parmi elles, les bases oxydées, les sites abasiques, les adduits intra-caténaires, les cassures de brins et les pontages ADN-protéines. Des

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

3. Le système de défense antioxydant

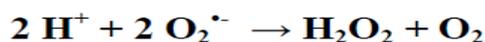
L'organisme est doué d'un ensemble de systèmes de défenses antioxydantes très efficaces afin de lutter contre la production excessive des espèces oxydantes. Ces antioxydants sont enzymatiques ou non-enzymatiques (MatÉs, Pérez-Gómez, et De Castro 1999).

3.1. Les systèmes antioxydants enzymatiques

Les antioxydants enzymatiques sont considérés comme la première ligne de défense contre les différentes espèces oxydantes. Leur rôle principal est de diminuer la quantité des ROS dans la cellule. Parfois, ces enzymes présentent une activité complémentaire et nécessitent des cofacteurs comme les Zn, Cu, Mn, Se, Fe pour exercer leurs fonctions (Favier 2003). Parmi les enzymes antioxydantes citons la superoxyde dismutase, la catalase, la peroxydase, la glutathion peroxydase et la glutathion s-transférase.

3.1.1. La superoxyde dismutase (SOD)

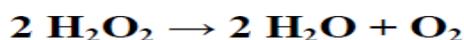
La SOD est l'une des plus importantes enzymes cellulaires à activité antioxydante. C'est une métalloprotéine "anti-O₂^{•-}" qui catalyse la dismutation de l'anion superoxyde en oxygène et en eau oxygénée (Salvayre, Auge, et Nègre-Salvayre 2003; Soullère et al. 2002).



On distingue trois classes de SOD : la SOD cytosolique (Cu- et Zn dépendante), la SOD mitochondriale (Mn-dépendante) et la SOD extracellulaire.

3.1.2. La catalase

La catalase est une enzyme intracellulaire, localisée principalement dans les peroxysomes. C'est une enzyme indispensable pour la détoxification des radicaux libres durant le stress. Elle catalyse la réaction de détoxification du H₂O₂ généralement produit par la SOD (voir réaction ci-dessous) (Salvayre, Auge, et Nègre-Salvayre 2003; Soullère et al. 2002).



3.1.3. Les peroxydases (POD)

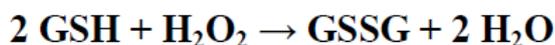
Les peroxydases sont des protéines à hème. Elles catalysent la réduction de l' H_2O_2 par de nombreux substrats, tels que les composés phénoliques et les précurseurs de lignine, (Halušková et al., 2010) selon l'équation suivante :



Dans la cellule végétale, la POD est impliquée dans plusieurs processus physiologiques : la lignification et la synthèse de la paroi cellulaire, le catabolisme des auxines et la défense contre le stress environnemental (Kim et al., 2010).

3.1.4. La glutathion peroxydase (GPX)

La glutathion peroxydase (GPX) est une enzyme Se-dépendante. Elle joue un rôle majeur dans la régulation de l'état redox des cellules vasculaires. Elle catalyse la réduction des hydroperoxydes et des peroxydes lipidiques en utilisant le glutathion réduit (GSH) comme donneur d'hydrogène (voir réaction ci-dessous) (Salvayre, Auge, et Nègre-Salvayre 2003; Soullère et al. 2002). Son rôle est d'aider les plantes à lutter contre le stress oxydatif (Noctor et al., 2002).



3.1.5. La Glutathion-S- transférase (GST)

Les glutathion-S-transférases (GSTs) sont une grande famille multifonctionnelle des enzymes de détoxification. Leur fonction principale consiste à catalyser la conjugaison des composés électrophiles avec le glutathion selon la réaction suivante :



Elles sont ubiquitaires et sont retrouvées principalement dans le cytoplasme et les mitochondries (Sheehan et al. 2001). Elles interviennent dans la réponse des plantes aux stress biotique et abiotique.

Dans l'organisme, elles catalysent la conjugaison du glutathion avec les herbicides et les métaux en les désactivant.

Les GST ont aussi des actions indirectes sur la détoxification des ROS. Elles permettent le transport du GSH vers les compartiments cellulaires subissant des dommages oxydatifs et assurent la liaison du GSH aux aldéhydes issus de la peroxydation lipidique.

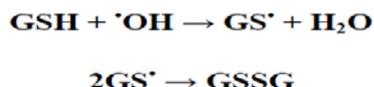
Les GST ont donc un rôle de transport intermembranaire, de liaison et de détoxification des xénobiotiques. Avec la GR et la GPX, elles jouent un rôle central dans la détoxification des ROS par le GSH (Gill et Tuteja 2010 ; Tan et al. 1986).

3.2. Les systèmes antioxydants non enzymatiques

En plus des enzymes, il existe des antioxydants non enzymatiques qui agissent comme des piègeurs des ROS et des xénobiotiques. Ils comprennent principalement le glutathion (GSH), l'acide ascorbique, les tocophérols, les caroténoïdes, les composés phénoliques,... Ces antioxydants sont impliqués dans les processus de détoxification ainsi que dans la croissance et le développement des plants (Ahmad 2014 ; Sharma et al. 2012).

3.2.1. Le glutathion

Le glutathion est le thiol le plus abondant dans les organismes et les systèmes vivants. Il est antioxydant par son caractère nucléophile et radicalaire (Baudin 2006). Il est impliqué dans les réactions suivantes :



Deux formes redox distinctes du glutathion sont observées : la forme réduite (GSH) est un tripeptide stable, à fort pouvoir réducteur et la forme oxydée (GSSG) est le glutathion disulfide.

3.2.2. La vitamine E ou α -tocophérol

La vitamine E (α -tocophérol) est l'antioxydant liposoluble majeur des lipides. Elle protège, *in vivo*, les structures moléculaires particulièrement sensibles à l'oxydation (double liaisons des acides gras polyinsaturés, bases nucléotidiques des brins d'ADN) et les structures condensées riches en lipides (membranes, lipoprotéines) (Neve 1991).

3.2.3. La vitamine C ou acide ascorbique (ASC)

L'acide ascorbique est un antioxydant omniprésent dans les plantes. Dans des conditions physiologiques normales, l'ASC existe principalement sous sa forme réduite dans les chloroplastes. Sa capacité de transférer des électrons dans un large éventail de réactions enzymatiques et non enzymatiques fait de lui le principal composé *ROS-détoxifiant* (Horemans et al. 2000 ; Smirnov 2000).

L'acide ascorbique assure plusieurs fonctions :

- Il intervient dans de nombreuses réactions enzymatiques fer dépendantes en tant que transmetteur d'électrons (Renaud 2003).
- Il est capable de réagir directement avec les espèces réactives oxygénées et azotées.
- Il réduit l'anion superoxyde sous forme acide ou basique.
- Il limite la peroxydation lipidique en réagissant avec les radicaux peroxyles et les complexes Oxoferryle.

Matériel et méthode

L'objectif de ce travail est l'étude de l'effet du Zn sur la croissance et la réponse du système antioxydant d'une légumineuse. La partie pratique a été réalisée au niveau du laboratoire de Biologie et Environnement, Campus Chaabat Ersas. Université des Frères Mentouri Constantine.

1. Matériel végétal

La plante utilisée dans ce travail est *Lens culinaris* (lentilles). Elle appartient à la famille des *Fabaceae*. Ses graines sont cultivées, *in-vitro* sur un milieu gélosé, avec différentes concentrations en Zn (pour une durée 6 jours).

2. Milieu utilisé et conditions de culture *in-vitro*

2.1. Stérilisation des graines

Les graines de *Lens culinaris* ont été triées puis désinfectées avec l'eau de javel à une concentration de 1%. Après agitation de 10 mn, les graines ont été rincées abondamment jusqu'à élimination de toute trace de l'eau de javel.

2.2. Choix des concentrations du Zn

Après plusieurs tests de croissance des graines de lentilles sur un milieu de culture, contenant différentes concentrations en Zn, six concentrations du zinc (0 μM , 100 μM , 750 μM , 3000 μM ; 5000 μM ; 100000 μM) sont choisies. Elles sont obtenues à partir d'une solution mère de zinc de 800 mM.

2.3. Germination des graines

Pour faciliter et homogénéiser leur germination, les graines sont ensuite mises à germer dans des boîtes de pétri stériles contenant le milieu de culture MS/2 solide (Classic Murashige et Skoog 1962). Le pH du milieu est ajusté à 4,5 (voir annexe 1). Les boîtes sont laissées 48 h dans le frigo.

Les graines sont ensuite transférées dans des bocaux à bouchon contenant 30 ml du milieu de culture traité avec différentes concentrations en Zn. Dans chaque Bocal, 10 graines de lentille sont semées.

Les bocaux sont ensuite placés dans la chambre de culture à 22°C, avec une photopériode de 16 h par jour pour une durée de 6 jours.

3. Méthodes de dosage biochimique

3.1 Préparation de l'extrait brut

➤ Broyage

La solution d'extraction est préparée avec du tampon phosphate (0,1M, pH 7,2) additionné de : 0,1 % de Triton X100, de 1 % de PVP et de 1 μ M d'EDTA.

Les feuilles et les racines des plantes (0,5g) sont broyées à l'aide d'un mortier avec 2ml de la solution d'extraction dans un bain de glace.

➤ Obtention de l'extrait brut :

L'homogénat est centrifugé à 4°C pendant 15 min à 12000g. Le surnageant est récupéré dans des tubes eppendorf à raison de 250 μ l par tube. Les tubes sont conservés au congélateur jusqu'à leur utilisation pour :

- l'évaluation du niveau de stress oxydatif (par le dosage du malonedialdéhyde),
- la détermination de la concentration des protéines,
- l'évaluation de l'activité de la CAT et de la GST.

3.2 Dosage du malonedialdéhyde (MDA)

Le MDA est dosé selon la méthode de Kosugi and Kikugawa, (1985) afin d'évaluer le niveau de la peroxydation des lipides (Kosugi et Kikugawa 1985). Le principe du dosage repose sur la réaction qui se produit entre le malondialdéhyde et l'acide thiobarbiturique (TBA), formant le dérivé coloré MDA-TBA₂, de couleur rose absorbant à 532 nm.

➤ Mode opératoire

Pour chaque échantillon, 150 μ l d'extrait est mélangé avec 1 ml de l'acide trichloroacétique (TCA à 10%) et 0.5 ml de l'acide thiobarbiturique (TBA à 2.5%). Le mélange est incubé à 95 °C pendant 30 min et la réaction est arrêtée par immersion des tubes dans la glace. Le mélange refroidi est centrifugé à 5000g pendant 10 min à 25 °C.

➤ Détermination de la concentration du MDA dans les échantillons

L'absorbance non spécifique à 600 nm est soustraite de l'absorbance à 532 nm et la concentration en MDA est déterminée par son coefficient d'extinction molaire 155 mM⁻¹ cm⁻¹. Elle est exprimée en μ mol/mg de protéine.

3.3 Dosage des protéines

Les protéines sont dosées par la méthode de Lowry et al., (1951). Le principe de cette méthode est basé sur la formation d'un complexe bleu foncé entre les liaisons peptidiques et les ions cuivre II. L'absorbance du complexe est mesurée à 750 nm. La protéine étalon utilisée est la BSA.

➤ Mode opératoire

Le mélange réactionnel contient 2 ml du réactif M (voir composition en annexe 2), 200 µl de l'échantillon, 200 µl du réactif de Folin-Ciocalteu. Le tout est homogénéisé au vortex puis laissé à l'obscurité pendant 30 min.

➤ Calcul de la concentration des protéines dans les échantillons

Après mesure de l'absorbance, la concentration des protéines de chaque échantillon est déterminée à partir d'une courbe d'étalonnage préalablement réalisée avec la BSA dans les mêmes conditions (voir annexe 2).

3.4 Evaluation de l'activité de la catalase (CAT)

La mesure de l'activité de la catalase est effectuée selon la méthode de Chance et Maehly (1955). La décomposition du peroxyde d'hydrogène est déterminée par la diminution de l'absorbance à 240 nm (Chance et Maehly 1955).

➤ Mode opératoire

Le mélange réactionnel contient 2,8 ml de tampon phosphate (0,5 M, pH 7,0) et 0,1 ml de peroxyde d'hydrogène (20 mM). La lecture est effectuée à 240 nm directement après l'addition de 0,1 ml de l'extrait enzymatique. Elle se fait chaque minute durant 2 ou 3 mn.

➤ Calcul de l'activité enzymatique spécifique de la CAT

L'activité enzymatique de la CAT = $Abs \times V_{total} / \epsilon \times V_{Echantillon}$

$\epsilon = 39,4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

L'activité enzymatique spécifique = L'activité enzymatique de la CAT / La concentration totale des protéines.

3.5 Evaluation de l'activité de la Glutathion S-transférase

L'évaluation de l'activité de la glutathion S-transférase est effectuée selon la méthode de Habig and Jakoby (1981) détaillée dans le Kit de SIGMA. Le principe est basé sur la mesure de l'absorbance à 340 nm du complexe Glutathione-2,4-Dinitrobenzene formé entre

le GSH et le CDNB par l'action de la GST.

➤ **Mode opératoire**

Le mélange réactionnel contient 1,8 ml de tampon phosphate (0,1 M et pH 6,5), 70 µl de glutathion (50 mM préparé dans le tampon phosphate pH 6,5) et 70 µl de CDNB (40 mM préparé dans l'éthanol à 95%). 70 µl de l'extrait enzymatique est ajouté au mélange qui est placé dans la cuve et le tout est mixé par inversion. L'absorbance est mesurée chaque minute pendant 3 minutes.

➤ **Calcul de l'activité enzymatique spécifique de la GST**

L'activité enzymatique de la GST = $\Delta \text{Abs} \times V_{\text{total}} / \epsilon \times V_{\text{Echantillon}}$

$\epsilon = 9.6 \text{ mM}^{-1}$.

Une unité correspond à la conjugaison de 1 µmole de 1-chloro-2,4-dinitrobenzene avec le glutathion réduit par minute. L'activité spécifique est exprimée en µmol/min/mg de protéines.

4. Analyse statistique

Les tests statistiques réalisés au cours de ce travail sont la moyenne \pm SEM (N=3) et l'analyse de la variance (ANOVA) suivie du test Tukey. L'analyse de la variance a été effectuée pour comparer les différentes classes de concentrations en Zn de chaque partie (aérienne et racinaire) par rapport à la classe des témoins. Le traitement des résultats est effectué à l'aide des logiciels : Excel 2007 et XLSTAT 2016 avec un seuil de signification de 0,05.

Résultats et discussion

1. Effets du zinc sur la croissance de *Lens culinaris*

Les résultats de la croissance de *Lens culinaris*, après 6 jours et en fonction des différentes concentrations en Zn (de 0 à 100000 μM), sont présentés dans la figure 6 :



Figure 6 : Effets du zinc sur la croissance de *Lens culinaris* après 6 jours de croissance.

D'après la figure 6, l'effet du zinc sur le phénotype des lentilles est remarquable. Les résultats montrent que la croissance des plantes atteint son maximum et dépasse même celle des témoins à une concentration en Zn de 100 μM . Au-delà de 100 μM elle commence à diminuer dans les deux parties de la plante.

La mesure de la longueur des parties aériennes et racinaires de *Lens culinaris* est résumée dans la figure 7.

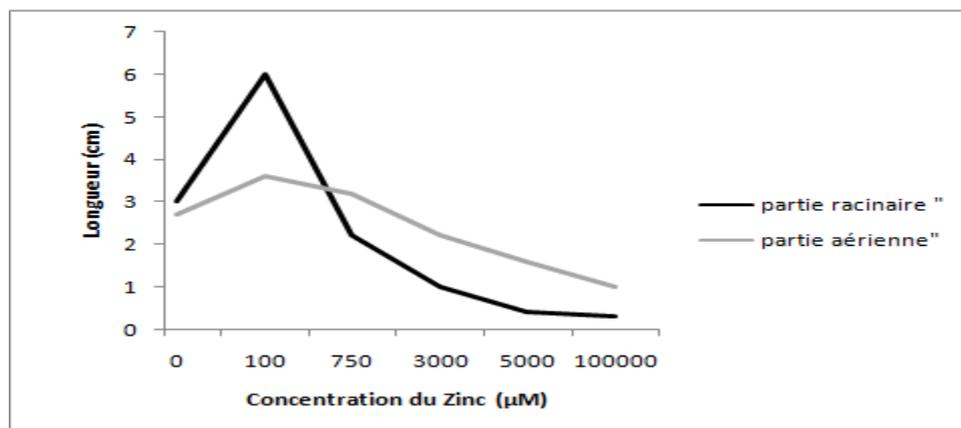


Figure 7 : Effet du zinc sur la longueur des parties aériennes et racinaires de *Lens culinaris* .

La figure 7 montre que la longueur la plus élevée, des deux parties de la plante, est atteinte à la concentration de 100 µM en Zn (6 cm pour la partie aérienne et 3,6 cm pour les racines). Au-delà de 100 µM, elle diminue progressivement jusqu'à atteindre la valeur la plus basse qui est observée à 100000 µM (1 cm pour la partie aérienne et 0,3 cm pour les racines).

Le Zn est le métal de transition le plus abondant après le fer. Il agit comme un élément nutritif pour les plantes et est impliqué dans diverses réactions métaboliques (Broadley et al. 2007 Vaillant et al. 2005), telles que l'activité des phytohormones, la synthèse des protéines, la photosynthèse, le métabolisme des glucides, la défense cellulaire...(Sadeghzadeh, 2013).

L'augmentation de la croissance des parties aériennes et racinaires observée à la concentration de 100 µM peut être attribuée au fait que le Zn maintient son rôle d'oligoélément à faibles concentrations (Broadley et al., 2007).

La diminution de la longueur des parties aériennes et racinaires des plantes, à une concentration supérieure à 100 µM, peut être causée par une réduction progressive du nombre de cellules de *Lens culinaris* (Nieman 1965 ; Vijayarengan et Mahalakshmi 2013).

Il est connu que les métaux sont susceptibles d'inhiber l'activité mitotique, de produire des anomalies cytologiques et de provoquer des mutations au niveau de l'ADN (Vijayarengan and Mahalakshmi, 2013). À des concentrations élevées, le zinc peut directement inhiber la croissance des racines en agissant sur la division cellulaire, l'élongation cellulaire ou la combinaison des deux. La conséquence est la réduction de la masse de la plante (Vijayarengan and Mahalakshmi, 2013). La réduction de la masse des parties racinaires limite l'absorption et la translocation des nutriments et de l'eau, ce qui induit une carence en

minéraux et une chlorose des feuilles. Ce sont les signes de la toxicité de la plante (Foy, 1988).

2. Effet du zinc sur la teneur du malondialdhyde (MDA)

Le niveau de la peroxydation lipidique a été évalué par la mesure de la concentration du MDA dans les deux parties de *Lens culinaris* (voir figure 8).

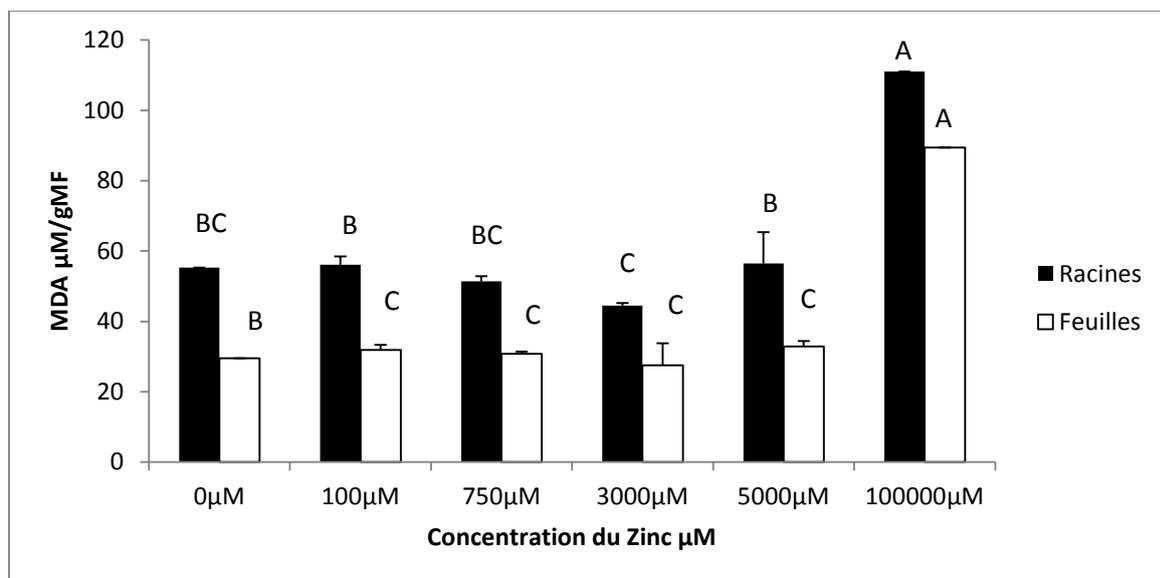


Figure 8 : Effet du Zn sur la teneur en MDA de *Lens culinaris*. Les lettres représentent les différences statistiques entre les six concentrations pour chaque partie de la plante (en utilisant l'ANOVA suivie par le test HSD de Tukey, $p < 0.05$).

La figure 8 montre que le niveau du MDA est plus élevé, dans son ensemble, dans les deux parties de la plante, par rapport au témoin. Il est plus élevé dans les parties racinaires qu'aériennes de la plante, quelle que soit la concentration du Zn dans le milieu de culture.

Dans les parties aériennes et à faibles concentrations en Zn (de 100 à 5000µM), la teneur en MDA dépasse celle du témoin mais elle est presque stable. A 100000 µM, elle augmente très significativement par rapport au témoin et aux classes précédentes.

Au niveau des racines, les variations des teneurs en MDA à faibles concentrations en Zn sont très peu significatives par rapport au témoin. Le MDA diminue à 3000 µM et atteint son maximum d'augmentation à 100000 µM.

Plusieurs travaux ont démontré l'augmentation de la peroxydation lipidique suite à une exposition aux métaux lourds (Gill et Tuteja 2010b ; Michel et al., 2008). En effet, une fois pénétrés dans la cellule, les métaux lourds produisent les espèces réactives de l'oxygène ROS.

Ces ROS vont attaquer les acides gras polyinsaturés de la cellule en provoquant des dommages cellulaires. Il a été prouvé que le premier site endommagé par les métaux lourds est la membrane cellulaire. Cela est dû à une attaque de ses acides gras polyinsaturés dont le produit est le malondialdéhyde (Aravind and Prasad, 2003 ; Dazy et al., 2009; Chaoui et al., 1997). La conséquence est la baisse de la fluidité membranaire et l'altération des protéines membranaires (Gill and Tuteja, 2010b).

Il a été admis que le MDA est un d'indicateur de stress abiotique et peut être utilisé comme bio marqueur du stress oxydatif (Funes et al., 2006). Nos résultats montrent que l'état de stress chez les lentilles est presque stable jusqu'à la concentration de 5000 μ M. Cela est peut être dû au fait que la plante a développé un système antioxydant puissant pour lutter contre les ROS et qu'il y a un équilibre entre la production des ROS et leur élimination. L'augmentation rapide du niveau du MDA à 100000 μ M est peut être due à une incapacité du système antioxydant et un déséquilibre de la balance oxydants-antioxydants en faveur des ROS (Atamer et al., 2008). Ceci est la définition du stress oxydatif.

3. Effet du zinc sur la teneur des protéines totales

La teneur des protéines totales mesurée chez *Lens culinaris*, en réponse à différentes concentrations de zinc, est présentée dans la figure 9.

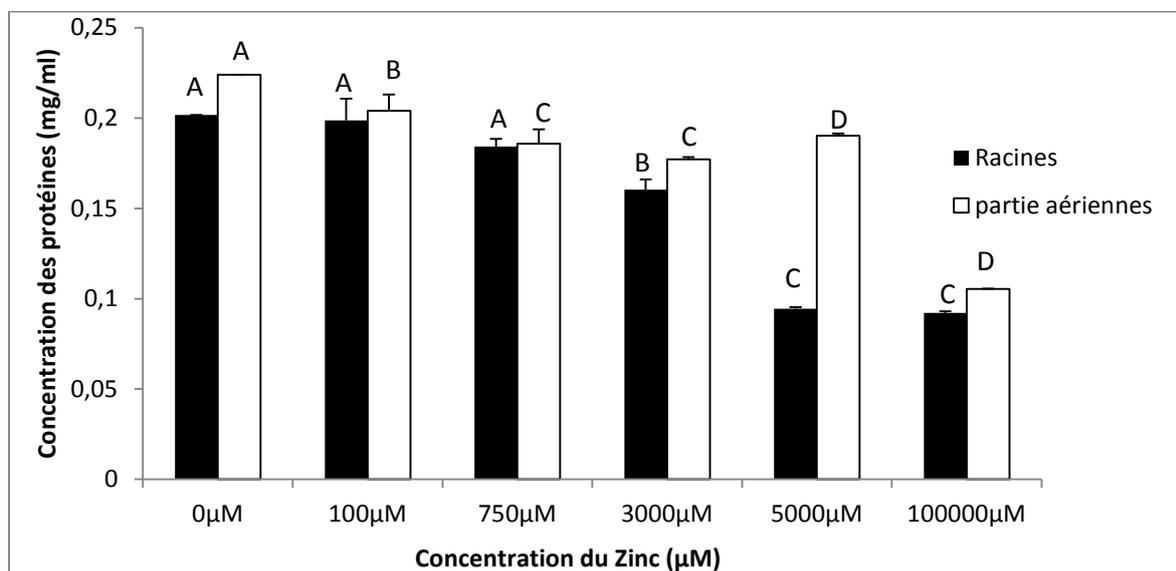


Figure 9 : Effet du Zn sur la teneur des protéines totales de *lens culinaris*. Les lettres représentent les différences statistiques entre les six concentrations pour chaque partie de la plante (en utilisant ANOVA suivie par le test HSD de Tukey, $p < 0.05$).

La figure 9 montre que, globalement, le taux des protéines est inversement proportionnel avec les concentrations croissantes du Zn. Il est plus élevé dans les parties aériennes.

Dans les parties racinaires, la diminution du taux des protéines, par rapport aux témoins, est très significative à 5000 et 100000 µM en Zn. Dans les parties aériennes elle l'est à 100000 µM.

Nos résultats montrent que les teneurs en MDA augmentent à fortes concentrations en Zn alors que celles des protéines diminuent. Ces résultats concordent avec ceux constatés chez *Atriplex halimus* : une relation inversement proportionnelle entre le contenu en MDA et les quantités de protéines totales est constatée (Mahi et al., 2015).

La diminution de la teneur des protéines est apparentée avec les métaux. Chez les feuilles de coton, et en présence du Cd, cette diminution est constatée (Daud et al., 2015).

La teneur en protéines peut être affectée, sous l'influence des métaux lourds, pour deux raisons : l'accroissement de l'activité des protéases et par conséquent l'hydrolyse des

protéines solubles (Gupta et al., 2015), ou bien l'inhibition de l'activité de certaines enzymes et l'inactivation des protéines portant des groupements thiols (Favier 2003).

4. Effet du zinc sur l'activité de la catalase (CAT)

L'activité de la CAT évaluée chez *Lens culinaris*, en réponse à différentes concentrations de zinc, est présentée dans la figure 10.

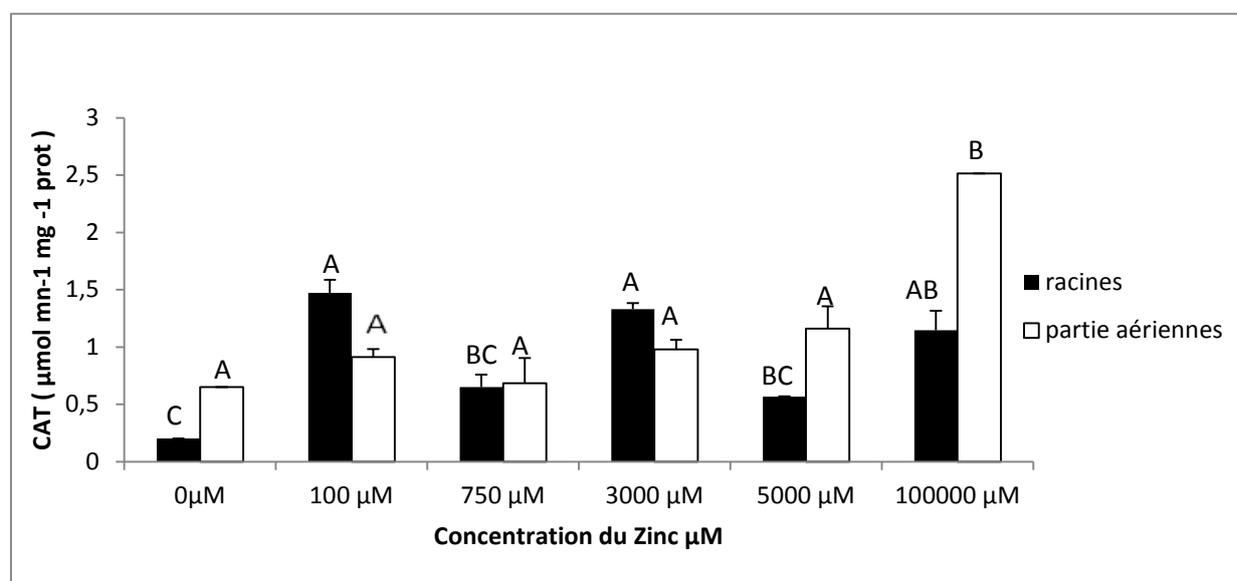


Figure 10 : L'activité de la CAT dans les racines et les parties aériennes de *Lens culinaris*. Les lettres représentent les différences statistiques entre les six concentrations pour chaque partie de la plante (en utilisant ANOVA suivie par le test HSD de Tukey, $p < 0.05$).

D'après la figure 10 la variation de l'activité de la CAT dépend de l'élévation des concentrations du zinc dans le milieu de culture. Dans les deux parties de la plante les activités de la CAT, à différentes concentrations en Zinc, dépassent celle des plantes témoins. Par rapport aux différentes classes, la CAT augmente dans les deux parties de la plante à 100 µM pour ensuite diminuer à la concentration de 750 µM. Elle augmente ensuite à nouveau de manière très significative à 3000, 5000 et 100000 µM en Zn au niveau des parties aériennes.

La CAT est une enzyme oxydoréductase qui catalyse la dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau et dioxygène. Elle a le même rôle que la peroxydase (POD) qui nécessite la présence d'un substrat particulier (Lamhamdi et al., 2011). Elle est requise pour la désintoxication des ROS dans la plante (Bhaduri and Fulekar, 2012).

La présence d'une activité de CAT dans les feuilles de lentilles, avant traitement par le Zn, peut s'expliquer par la présence de l'enzyme dans le peroxysome. Elle élimine le

peroxyde d'hydrogène qui se forme lors du cycle photorespiratoire suite à l'action de la glycolate oxydase (Luis et al., 2006) .

L'augmentation de l'activité de la CAT, suite au traitement du milieu par le Zn, peut être due à la forte production des ROS. Dans ce cas, la CAT a été bien stimulée par le Zn (l'inducteur du stress oxydant). Ces résultats concordent avec ceux constatés par Prasad et al., (1999) où l'activité de la CAT a été significativement stimulée dans les parties aériennes de *Brassica juncea*. Au contraire, l'étude de Sbartai et al., 2012 montre une diminution de l'activité de la CAT chez *Lycopersicon esculentum L.* suite à un traitement par le Zn.

5. Effet du zinc sur l'activité de la glutathion s-transférase (GST)

L'activité de la GST, évaluée chez *Lens culinaris*, en réponse à différentes concentrations de zinc, est présentée dans la figure 11.

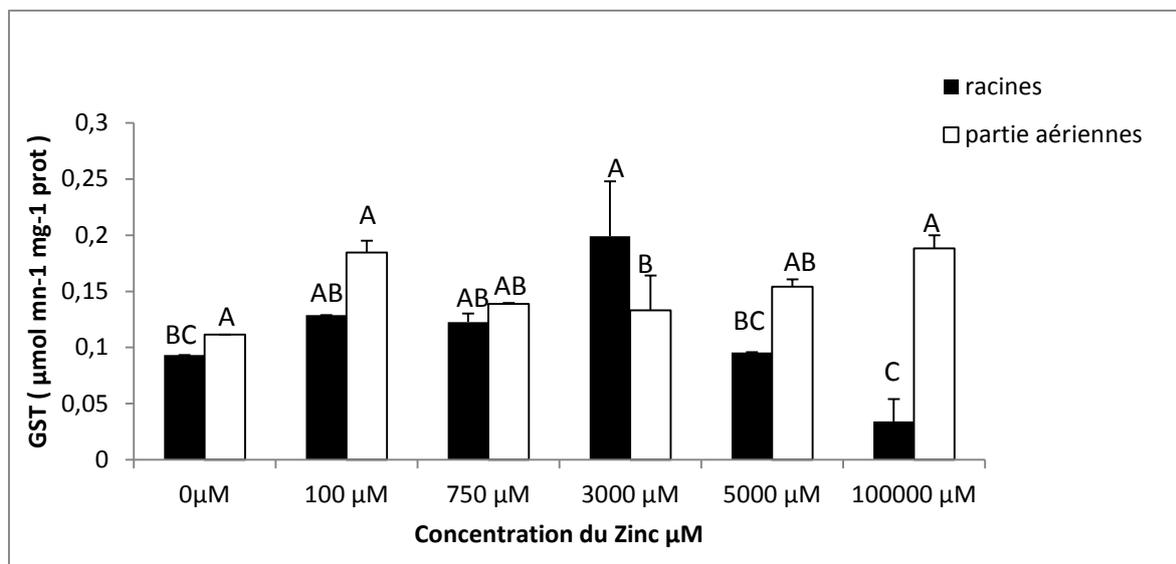


Figure 11 : L'activité de la GST dans les racines et les parties aériennes de *Lens culinaris*. Les lettres représentent les différences statistiques entre les six concentrations pour chaque partie de la plante (en utilisant ANOVA suivie par le test HSD de Tukey, $p < 0.05$).

La figure 11 montre que l'activité de la GST varie suite à la présence du Zn dans le milieu. Elle augmente dans les deux parties de la plante à 100 µM pour ensuite diminuer à la concentration de 5000 µM et 100000 µM au niveau des racines. Au niveau des feuilles, son activité dépasse toujours le témoin. Son maximum d'activité est atteint à 100 et à 100000 µM.

La GST joue un rôle primordial dans le mécanisme de détoxification des métaux lourds et des espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Konings and Penninga, 1985 ; Siritantikorn et al.

2007). Elle est responsable de la détoxification des composés xénobiotiques et endobiotiques par une liaison covalente du glutathion (GSH) à un substrat hydrophobe. Il se forme un conjugué de glutathion S-R moins réactif (Mohabatkar et al., 2010).

Les résultats de l'activité de la GST, au niveau des feuilles, sont similaires à ceux de la CAT. Plus la concentration des métaux dans le milieu de culture augmente plus la GST est activée pour lutter contre le stress induit par les métaux.

L'augmentation de l'activité de la GST, en réponse au stress métallique, a été rapportée antérieurement pour les plants de colza exposés à différentes concentrations de zinc (Wang et al., 2009) et chez les plantules de riz (*Oryza sativa* L. cv. N07-63) en présence du Cd (Hu et al., 2009) et chez *Hedysarum pallidum* en présence de l'antimoine (Benhamdi et al., 2014). Cette enzyme est définie comme un biomarqueur de contamination par les ETM (Cantú-Medellín et al., 2009) et les hydrocarbures aromatiques (Le Pennec and Le Pennec, 2003).

la diminution de l'activité de la GST dans les racines de lentilles à 100000 μM en Zn peut être expliquée par une inhibition de son activité par les ROS et le Zn (Vranová et al., 2002).

Conclusion

De nombreux problèmes de pollution sont provoqués par la présence de métaux lourds dans différents milieux. La contamination des milieux solide et aquatique provoque l'accumulation de ces métaux dans les plantes, *via* un transfert sol-plante et chez les humains et les animaux, à travers la chaîne alimentaire.

Le zinc (Zn) est un micronutriment essentiel pour la croissance des végétaux. Néanmoins l'accroissement de sa concentration le rend toxique et dangereux pour les plantes.

Ce travail a pour but d'étudier l'effet de Zn sur la croissance et la défense antioxydante d'une légumineuse cultivée, *in vitro*, dans un milieu MS/2. Le modèle biologique choisi pour cette étude est les lentilles (*Lens culinaris*).

Les résultats obtenus montrent que la croissance des plantes atteint son maximum et dépasse même celle des témoins à une concentration en Zn de 100 μM . Au-delà de 100 μM , ce dernier devient toxique et la croissance commence à diminuer dans les deux parties de la plante. Les variations des taux du MDA, dans les deux parties de la plante, sont peu significatives. A 100000 μM en Zn, le taux du MDA devient très important.

Les activités spécifiques de CAT et GST, dans les deux parties de la plante (racinaire et aérienne), atteignent respectivement leur maximum d'augmentation à 10000 μM et à 3000 μM , alors que la concentration des protéines diminue lorsque la concentration du Zn augmente.

L'évaluation du niveau du MDA, du taux des protéines et des activités enzymatiques, chez *Lens culinaris* ainsi que les résultats des travaux précédents effectués sur le mécanisme d'absorption, de croissance et de défense antioxydante, chez les plantes, permettent de proposer un mécanisme de tolérance *Lens culinaris* au Zn.

Lorsque le Zn est présent dans le milieu de culture, ce dernier est absorbé par les racines des lentilles. Une fois à l'intérieur des cellules, les molécules de Zn se lient avec les groupements thiols de certaines protéines et enzymes en les inactivant et les inhibant. Cela se traduit par une diminution du taux des protéines au niveau des lentilles.

Avant de se lier avec les groupements thiol, le Zn induit la production des ROS. En absence des enzymes antioxydantes, les ROS provoquent plusieurs dommages cellulaires. Le premier site endommagé est la membrane plasmique car les ROS attaquent ses acides gras polyinsaturés en produisant le MDA.

Jusqu'à 5000 μM du Zn, la stabilité du niveau du MDA montre que le système antioxydant des lentilles a pu minimiser les effets des ROS en les transformant en molécules non radicalaires. L'augmentation de l'activité de la CAT (qui assure la dismutation du H_2O_2)

et de la GST (qui agit contre les ROS et séquestre le Zn au niveau des vacuoles) confirme que le système antioxydant des lentilles est actif.

A 100000 μM , l'augmentation très rapide et très significative du niveau du MDA, montre que les plantes entrent dans un état de stress et que le système antioxydant est épuisé dans son ensemble malgré l'augmentation des activités de la CAT et la GST. Car le stress a lieu quand la *balance* entre la production des radicaux libres et leur destruction physiologique est positive.

Les lentilles sont des plantes tolérantes à la présence de Zn dans le milieu de culture et au niveau de leurs cellules en développant un système antioxydant puissant, mais au-delà d'une certaine concentration leur système antioxydant devient inefficace et les plantes entrent dans un état de stress.

Dans le but de compléter cette étude, il est préférable de :

- évaluer l'activité des autres enzymes antioxydantes (telles que : la peroxydase, la glutathion peroxydase, la glutathion S-transférase, la glutathion réductase, la phytochélatine synthase,...)

- déterminer les concentrations du Zn dans les deux parties de *Lens culinaris* ainsi que dans le milieu de culture après croissance pour pouvoir expliquer le mécanisme de phytoremédiation de cette plante.

Références bibliographique

- Ahmad, Parvaiz. 2014. *Oxidative damage to plants: antioxidant networks and signaling*. Academic Press.
- Alberts, Bruce, Dennis Bray, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, James D. Watson, et A. V. Grimstone. 1995. « Molecular Biology of the Cell (3rd edn) ». *Trends in Biochemical Sciences* 20 (5): 210–210.
- Aoun, Michel. 2008. « Action du cadmium sur les plants de moutarde indienne [Brassica juncea (L.) Czern] néoformés à partir de couches cellulaires minces et issus de semis. Analyses physiologiques et rôle des polyamines. » Université de Bretagne occidentale-Brest.
- Aravind, Parameswaran, et Majeti Narasimha Vara Prasad. 2003. « Zinc alleviates cadmium-induced oxidative stress in *Ceratophyllum demersum* L.: a free floating freshwater macrophyte ». *Plant Physiology and Biochemistry* 41 (4): 391–397.
- Asmann, Stephan, Karel Sigler, et Milan Höfer. 1996. « Cd²⁺-induced damage to yeast plasma membrane and its alleviation by Zn²⁺: studies on *Schizosaccharomyces pombe* cells and reconstituted plasma membrane vesicles ». *Archives of microbiology* 165 (4): 279–284.
- Atamer, A., A. Bilici, N. Yenice, S. Selek, N. Ilhan, et Y. Atamer. 2008. « The importance of paraoxonase 1 activity, nitric oxide and lipid peroxidation in hepatosteatosis ». *Journal of International Medical Research* 36 (4): 771–776.
- Baker, Alan JM, et Paul L. Walker. 1990. « Ecophysiology of metal uptake by tolerant plants ». *Heavy metal tolerance in plants: evolutionary aspects* 2: 155–165.
- Baudin, Bruno. 2006. « Stress oxydant et pathologies cardiovasculaires ». *mt cardio* 2 (1): 43–52.
- Beckman, Kenneth B., et Bruce N. Ames. 1997. « Oxidative decay of DNA ». *Journal of Biological Chemistry* 272 (32): 19633–19636.
- Behanzin, Gbèssohèlè Justin, Euloge S. Adjou, Abdou Ganiou Yessoufou, E. Dahouenon Ahoussi, et A. Sezan. 2015. « Effet des sels de métaux lourds (chlorure de Cobalt et chlorure de Mercure) sur l'activité des hépatocytes ». *Journal of Applied Biosciences* 83 (1): 7499–7505.
- Benavides, María P., Susana M. Gallego, et María L. Tomaro. 2005. « Cadmium toxicity in plants ». *Brazilian Journal of Plant Physiology* 17 (1): 21–34.
- Benhamdi, Asma, Alima Bentellis, Oualida Rached, Gijs Du Laing, et Aicha Mechakra. 2014. « Effects of antimony and arsenic on antioxidant enzyme activities of two steppic plant species in an old antimony mining area ». *Biological trace element research* 158 (1): 96–104.

- Bhaduri, Anwasha M., et M. H. Fulekar. 2012. « Antioxidant enzyme responses of plants to heavy metal stress ». *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* 11 (1): 55–69.
- Boyd, R. S. 1998. « Hyperaccumulation as a plant defensive strategy ». *Plants that Hyperaccumulate Heavy Metals: their role in phytoremediation, microbiology, archaeology, mineral exploration and phytomining*.
- Broadley, Martin R., Philip J. White, John P. Hammond, Ivan Zelko, et Alexander Lux. 2007. « Zinc in plants ». *New Phytologist* 173 (4): 677–702.
- Brun, M. 1998. « Phytoremédiation pour la dépollution des sols et la réhabilitation des sites ». *Environnement & technique*, n° 173: 42–44.
- Callender, E., et B. S. Lollar. 2003. « Treatise on Geochemistry ». *Chap 9*: 67–105.
- Cantú-Medellín, Nadiezhda, Norma O. Olgún-Monroy, Lía C. Méndez-Rodríguez, et Tania Zenteno-Savín. 2009. « Antioxidant enzymes and heavy metal levels in tissues of the black chocolate clam *Megapitaria squalida* in Bahia de La Paz, Mexico ». *Archives of environmental contamination and toxicology* 56 (1): 60–66.
- Chance, Britton, et A. C. Maehly. 1955. « [136] Assay of catalases and peroxidases ». *Methods in enzymology* 2: 764–775.
- Chaoui, Abdelilah, Salma Mazhoudi, Mohamed Habib Ghorbal, et Ezzedine El Ferjani. 1997. « Cadmium and zinc induction of lipid peroxidation and effects on antioxidant enzyme activities in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) ». *Plant Science* 127 (2): 139–147.
- Cheng, Shuiping. 2003. « Effects of heavy metals on plants and resistance mechanisms ». *Environmental Science and Pollution Research* 10 (4): 256–264.
- Chevrier, Émilie. 2013. « La phytoremédiation, une solution d’avenir pour le Québec ». Université de Sherbrooke. <http://savoirs.usherbrooke.ca/handle/11143/7111>.
- Classic Murashige, T., et F. Skoog. 1962. « A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures ». *Physiol. Plant* 15: 473–97.
- Cooke, Marcus S., Mark D. Evans, Miral Dizdaroglu, et Joseph Lunec. 2003. « Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease ». *The FASEB Journal* 17 (10): 1195–1214.
- Dat, J., Steven Vandenabeele, Eva Vranová, Marc Van Montagu, Dirk Inzé, et Frank Van Breusegem. 2000. « Dual action of the active oxygen species during plant stress responses ». *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* 57 (5): 779–795.
- Daud, M. K., He Quiling, Mei Lei, Basharat Ali, et S. J. Zhu. 2015. « Ultrastructural, metabolic and proteomic changes in leaves of upland cotton in response to cadmium stress ». *Chemosphere* 120: 309–320.

- Dazy, Marc, Jean-François Masfarau, et Jean-François Féraud. 2009. « Induction of oxidative stress biomarkers associated with heavy metal stress in *Fontinalis antipyretica* Hedw. » *Chemosphere* 75 (3): 297–302.
- Delannoy, Étienne, Philippe Marmey, Claude Penel, et Michel Nicole. 2004. « Les peroxydases végétales de classe III ». *Acta botanica gallica* 151 (4): 353–380.
- Devi, S. Rama, et M. N. V. Prasad. 1999. « Membrane lipid alterations in heavy metal exposed plants ». In *Heavy metal stress in plants*, 99–116. Springer. http://link.springer.com/10.1007/978-3-662-07745-0_5.
- Di Benedetto, M., S. Anfossi, E. Billiard, M. Bonnet, F. Henriot, F. Kraemer, L. Lechenne, M. Le Herissier, et S. Lorin. 1997. « Méthodes spectrométriques d'analyse et de caractérisation ». *Dossier SAM, les métaux lourds. Axe « Génie des Procédés », centre SPIN, Ecole des Mines de Saint-Etienne*. 49p.
- Dixit, Vivek, Vivek Pandey, et Radhey Shyam. 2001. « Differential antioxidative responses to cadmium in roots and leaves of pea (*Pisum sativum* L. cv. Azad) ». *Journal of Experimental Botany* 52 (358): 1101–1109.
- Dixon, David P., Adrian Laphorn, et Robert Edwards. 2002. « Plant glutathione transferases ». *Genome Biol* 3 (3): 3004–1.
- Favier, Alain. 2003. « Le stress oxydant ». *L'actualité chimique* 108. <http://www.lbmroanne.com/docs/stress%20oxydant/Favier.pdf>.
- Foy, Charles D. 1988. « Plant adaptation to acid, aluminum-toxic soils ». *Communications in Soil Science & Plant Analysis* 19 (7-12): 959–987.
- Funes, V., J. Alhama, J. I. Navas, J. López-Barea, et J. Peinado. 2006. « Ecotoxicological effects of metal pollution in two mollusc species from the Spanish South Atlantic littoral ». *Environmental Pollution* 139 (2): 214–223.
- Gaetani, Gian Franco, A. M. Ferraris, M. Rolfo, R. Mangerini, S. Arena, et H. N. Kirkman. 1996. « Predominant role of catalase in the disposal of hydrogen peroxide within human erythrocytes ». *Blood* 87 (4): 1595–1599.
- Garty, J., Y. Karary, et J. Harel. 1992. « Effect of low pH, heavy metals and anions on chlorophyll degradation in the lichen *Ramalina duriaei* (De Not.) Bagl. » *Environmental and experimental botany* 32 (3): 229–241.
- Gill, Sarvajeet Singh, et Narendra Tuteja. 2010a. « Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants ». *Plant physiology and biochemistry* 48 (12): 909–930.
- Gill, Sarvajeet Singh, et Narendra Tuteja. 2010b. « Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants ». *Plant physiology and biochemistry* 48 (12): 909–930.

- Gill, Sarvajeet Singh, et Narendra Tuteja. 2010c. « Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants ». *Plant physiology and biochemistry* 48 (12): 909–930.
- Halušková, L'ubica, Katarína Valentovičová, Jana Huttová, Igor Mistrík, et Ladislav Tamás. 2009. « Effect of abiotic stresses on glutathione peroxidase and glutathione S-transferase activity in barley root tips ». *Plant Physiology and Biochemistry* 47 (11): 1069–1074.
- Horemans, Nele, Christine H. Foyer, Geert Potters, et Han Asard. 2000. « Ascorbate function and associated transport systems in plants ». *Plant physiology and biochemistry* 38 (7): 531–540.
- Hosseini, Zahra, et Latifeh Poorakbar. 2013. « Zinc toxicity on antioxidative response in (*Zea mays* L.) at two different pH ». *Journal of Stress Physiology & Biochemistry* 9 (1). <http://cyberleninka.ru/article/n/zinc-toxicity-on-antioxidative-response-in-zea-mays-l-at-two-different-ph>.
- Hu, Yanling, Ying Ge, Chunhua Zhang, Ting Ju, et Wangda Cheng. 2009. « Cadmium toxicity and translocation in rice seedlings are reduced by hydrogen peroxide pretreatment ». *Plant Growth Regulation* 59 (1): 51–61.
- Ji, Li Li. 2001. « Exercise at old age: does it increase or alleviate oxidative stress? » *Annals of the New York Academy of Sciences* 928 (1): 236–247.
- Kabata-Pendias, Alina. 2010. *Trace elements in soils and plants*. CRC press.
- Konings, A. W. T., et P. Penninga. 1985. « On the importance of the level of glutathione and the activity of the pentose phosphate pathway in heat sensitivity and thermotolerance ». *International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics, Chemistry and Medicine* 48 (3): 409–422.
- Kosugi, Hiroko, et Kiyomi Kikugawa. 1985. « Thiobarbituric acid reaction of aldehydes and oxidized lipids in glacial acetic acid ». *Lipids* 20 (12): 915–921.
- Lamhamdi, Mostafa, Ahmed Bakrim, Ahmed Aarab, Rene Lafont, et Fouad Sayah. 2011. « Lead phytotoxicity on wheat (*Triticum aestivum* L.) seed germination and seedlings growth ». *Comptes rendus biologiques* 334 (2): 118–126.
- Lasat, Mitch M., Nicole S. Pence, David F. Garvin, Stephen D. Ebbs, et Leon V. Kochian. 2000. « Molecular physiology of zinc transport in the Zn hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* ». *Journal of Experimental Botany* 51 (342): 71–79.
- Le Pennec, Gaël, et Marcel Le Pennec. 2003. « Induction of glutathione-S-transferases in primary cultured digestive gland acini from the mollusk bivalve *Pecten maximus* (L.): application of a new cellular model in biomonitoring studies ». *Aquatic toxicology* 64 (2): 131–142.

- Lee, Jin-Ju, Hyun-Joo Jo, et Kwang-Hoon Kong. 2011. « A plant-specific Tau class glutathione S-transferase from *Oryza sativa* having significant detoxification activity towards chloroacetanilide herbicides ». *Bulletin of the Korean Chemical Society* 32 (10): 3756–3759.
- Luis, A., Luisa M. Sandalio, Francisco J. Corpas, José M. Palma, et Juan B. Barroso. 2006. « Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes. Production, scavenging, and role in cell signaling ». *Plant physiology* 141 (2): 330–335.
- Mahi, Zineb, Fabienne Dedaldechamp, Laurence Maurousse, Rémi Lemoine, et Moulay Belkhdja. 2015. « Etude de la Peroxydation Lipidique (MDA) et l'Activité Antioxydative (POD) Chez Deux halophytes: *Atriplex halimus* L. et *Atriplex canescens* (Pursh) Nutt sous l'Effet du Sel [Study of Lipid peroxidation (MDA) and antioxidative Activity (POD) In Two halophyte: *Atriplex halimus* L. and *Atriplex canescens* (Pursh) Nutt under Salt Effect] ». *International Journal of Innovation and Applied Studies* 10 (1): 450.
- Marcato, Claire-Emmanuelle. 2007. « Origine, devenir et impact du cuivre et du zinc des lisiers porcins. Rôle de la digestion anaérobie ».
- Marschner, Horst. 2011. *Marschner's mineral nutrition of higher plants*. Academic press.
- MatÉs, JosÉ M., Cristina Pérez-Gómez, et Ignacio Núñez De Castro. 1999. « Antioxidant enzymes and human diseases ». *Clinical biochemistry* 32 (8): 595–603.
- Meharg, Andrew A. 1993. « The role of the plasmalemma in metal tolerance in angiosperms ». *Physiologia Plantarum* 88 (1): 191–198.
- Michel, F., D. Bonnefont-Rousselot, E. Mas, J. Draï, et P. Thérond. 2008. « Biomarqueurs de la peroxydation lipidique: aspects analytiques ». In *Annales de Biologie Clinique*, 66:605–620.
- Milner, Matthew J., et Leon V. Kochian. 2008. « Investigating heavy-metal hyperaccumulation using *Thlaspi caerulescens* as a model system ». *Annals of botany* 102 (1): 3–13.
- Mishra, S., S. Srivastava, R. D. Tripathi, R. Govindarajan, S. V. Kuriakose, et M. N. V. Prasad. 2006. « Phytochelatin synthesis and response of antioxidants during cadmium stress in *Bacopa monnieri* L ». *Plant Physiology and Biochemistry* 44 (1): 25–37.
- Mitch, M. Lasat. 2002. « Phytoextraction of toxic metals: a review of biological mechanism ». *Journal of Environmental Quality* 31: 109–120.
- Mohabatkar, Hassan, Sasan Mohsenzadeh, et Babak Saffari. 2010. « A new member of Tau-class glutathione S-transferase from barley leaves ». <https://eldorado.tu-dortmund.de/handle/2003/26680>.

- Møller, Ian M., Poul Erik Jensen, et Andreas Hansson. 2007. « Oxidative modifications to cellular components in plants ». *Annu. Rev. Plant Biol.* 58: 459–481.
- Moons, Ann. 2003. « Osgstu3 and osgtu4, encoding tau class glutathione S-transferases, are heavy metal-and hypoxic stress-induced and differentially salt stress-responsive in rice roots ». *FEBS letters* 553 (3): 427–432.
- Moore, James W. 2012. *Inorganic contaminants of surface water: research and monitoring priorities*. Springer Science & Business Media.
- MOREL, Yannick, et Robert BAROUKI. 1999. « Repression of gene expression by oxidative stress ». *Biochemical Journal* 342 (3): 481–496.
- Neve, Jean. 1991. « Methods in determination of selenium states. » *Journal of trace elements and electrolytes in health and disease* 5 (1): 1–17.
- Nieman, R. H. 1965. « Expansion of bean leaves and its suppression by salinity ». *Plant Physiology* 40 (1): 156.
- Noctor, Graham, et Christine H. Foyer. 1998. « Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control ». *Annual review of plant biology* 49 (1): 249–279.
- Prasad, KVSK, P. Paradha Saradhi, et P. Sharmila. 1999. « Concerted action of antioxidant enzymes and curtailed growth under zinc toxicity in Brassica juncea ». *Environmental and Experimental Botany* 42 (1): 1–10.
- Remon, Esteban. 2009. « Tolérance et accumulation des métaux lourds par la végétation spontanée des friches métallurgiques: vers de nouvelles méthodes de bio-dépollution ». Citeseer.
- Renaud, A. 2003. « Fer, vitamine C et acide folique: convergence sanguine ». *Journal de Pédiatrie et de Puériculture* 16 (5): 281–283.
- Rout, Gyana Ranjan, et Premananda Das. 2009. « Effect of metal toxicity on plant growth and metabolism: I. Zinc ». In *Sustainable Agriculture*, 873–884. Springer.
- Sadeghzadeh, B. 2013. « A review of zinc nutrition and plant breeding ». *Journal of soil science and plant nutrition* 13 (4): 905–927.
- Salvayre, R., N. Auge, et A. Nègre-Salvayre. 2003. « Rôle de l'oxydation dans la genèse et la progression de l'athérosclérose ». *L'athérosclérose: Physiopathologie, Diagnostics, Thérapeutiques* 14: 269–290.
- Sbartai, Hana, Med Reda Djebar, Ibtissem Sbartai, et Houria Berrabbah. 2012. « Bioaccumulation du Cd et du Zn chez les plants de tomates (*Lycopersicon esculentum* L.) ». *Comptes Rendus Biologies* 335 (9): 585–593.
- Sharma, Pallavi, et Rama Shanker Dubey. 2005. « Lead toxicity in plants ». *Brazilian journal of plant physiology* 17 (1): 35–52.

- Sharma, Pallavi, Ambuj Bhushan Jha, Rama Shanker Dubey, et Mohammad Pessaraki. 2012a. « Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions ». *Journal of Botany* 2012. <http://www.hindawi.com/journals/jb/2012/217037/abs/>.
- Sharma, Pallavi, Ambuj Bhushan Jha, Rama Shanker Dubey, et Mohammad Pessaraki. 2012b. « Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions ». *Journal of Botany* 2012. <http://www.hindawi.com/journals/jb/2012/217037/abs/>.
- Sheehan, David, Gerardene MEADE, Vivienne M. FOLEY, et others. 2001. « Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily ». *Biochemical Journal* 360 (1): 1–16.
- Siritantikorn, Atchaisai, Katarina Johansson, Karin Åhlen, Rosanna Rinaldi, Tuangporn Suthiphongchai, Prapon Wilairat, et Ralf Morgenstern. 2007. « Protection of cells from oxidative stress by microsomal glutathione transferase 1 ». *Biochemical and biophysical research communications* 355 (2): 592–596.
- Smirnoff, Nicholas. 2000. « Ascorbic acid: metabolism and functions of a multi-faceted molecule ». *Current opinion in plant biology* 3 (3): 229–235.
- Soranzo, N., M. Sari Gorla, L. Mizzi, G. De Toma, et C. Frova. 2004. « Organisation and structural evolution of the rice glutathione S-transferase gene family ». *Molecular Genetics and Genomics* 271 (5): 511–521.
- Soulère, Laurent, Cécile Viodé, Jacques Périé, et Pascal Hoffmann. 2002. « Selective inhibition of Fe-versus Cu/Zn-superoxide dismutases by 2, 3-dihydroxybenzoic acid derivatives. » *Chemical and pharmaceutical bulletin* 50 (5): 578–582.
- Stadtman, Earl R., et Rodney L. Levine. 2000. « Protein oxidation ». *Annals of the New York Academy of Sciences* 899 (1): 191–208.
- Tan, K. H., D. J. Meyer, B. Coles, et B. Ketterer. 1986. « Thymine hydroperoxide, a substrate for rat Se-dependent glutathione peroxidase and glutathione transferase isoenzymes ». *FEBS letters* 207 (2): 231–233.
- Tremellen, Kelton. 2008. « Oxidative stress and male infertility—a clinical perspective ». *Human reproduction update* 14 (3): 243–258.
- Tsonev, Tsonko, et Fernando Jose Cebola Lidon. 2012. « Zinc in plants-An overview ». *Emirates Journal of Food and Agriculture* 24 (4): 322.
- Vaillant, N., F. Monnet, A. Hitmi, H. Sallanon, et A. Coudret. 2005. « Comparative study of responses in four *Datura* species to a zinc stress ». *Chemosphere* 59 (7): 1005–1013.

- Van Breusegem, Frank, et James F. Dat. 2006. « Reactive oxygen species in plant cell death ». *Plant physiology* 141 (2): 384–390.
- Vijayarangan, P., et G. Mahalakshmi. 2013. « Zinc toxicity in tomato plants ». *World Applied Sciences Journal* 24 (5): 649–653.
- Vranová, Eva, Dirk Inzé, et Frank Van Breusegem. 2002. « Signal transduction during oxidative stress ». *Journal of experimental botany* 53 (372): 1227–1236.
- Wang, Lawrence K., Jiaping Paul Chen, Yung-Tse Hung, et Nazih K. Shamma. 2009. *Heavy metals in the environment*. CRC Press.
- Wong, Chi Ming, Amrita K. Cheema, Lihua Zhang, et Yuichiro J. Suzuki. 2008. « Protein carbonylation as a novel mechanism in redox signaling ». *Circulation research* 102 (3): 310–318.
- Yannarelli, Gustavo G., Ana J. Fernández-Alvarez, Diego M. Santa-Cruz, et María L. Tomaro. 2007. « Glutathione reductase activity and isoforms in leaves and roots of wheat plants subjected to cadmium stress ». *Phytochemistry* 68 (4): 505–512.
- ZHANG, Chun-hua, Ze-ying WU, J. U. Ting, et G. E. Ying. 2013. « Purification and identification of glutathione S-transferase in rice root under cadmium stress ». *Rice Science* 20 (3): 173–178.
- Zhong-qiu, ZHAO, Zhu Yong-guan, et Cai Yun-long. 2005. « Effects of zinc on cadmium uptake by spring wheat (*Triticum aestivum*, L.): long-time hydroponic study and short-time ¹⁰⁹Cd tracing study ». *Journal of Zhejiang University SCIENCE A* 6 (7): 643–648.
- Zou, Yanping, Zhong-Ji Qian, Yong Li, Moon-Moo Kim, Sang-Hoon Lee, et Se-Kwon Kim. 2008. « Antioxidant effects of phlorotannins isolated from *Ishige okamurae* in free radical mediated oxidative systems ». *Journal of agricultural and food chemistry* 56 (16): 7001–7009.

Annexes

Annexe 1 : Composition du milieu MS/2 (M5519 de sigma)

Solution 1 : macroéléments

macro éléments	Quantité en g/L
Nitrate d'ammonium	1.65
Chlorure de calcium	0.44
Sulfate de magnésium	0.37
Nitrate de potassium	1.9
Phosphate monopotassique	0.17

Solution 2 : microéléments

micro éléments	Quantité en mg/L
Sulfate de fer	27.85
EDTA dissodique	37.25
Sulfate de manganèse	22.30
Sulfate de zinc	8.6
Acide borique	6.2
Iodure de potassium	0.83
Molybdate de sodium	0.25
Sulfate de cuivre	0.025
Chlorure de cobalt	0.025

Le milieu de culture comporte 5 ml de chacune des deux solutions minérales (macroéléments et oligoéléments selon Murashige et Skoog), le volume est complété par l'eau distillée jusqu'à 100 mL. 3g de saccharose et 1,5 g d'agar sont dissous dans les 100 ml.

Le pH du milieu est ajusté à 4,5. Le milieu de culture est autoclavé 20 minutes à 120°C.

Annexe 2: La courbe d'étalonnage de la BSA

A. Composition de la solution M

- Solution A : Carbonate de sodium (2%) dissous dans du Na OH (0.1N).
- solution B : Sulfate de cuivre (0.5%) dans l'eau distillée.
- Solution C : Tartrate double de sodium et potassium (1%) préparé dans l'eau distillée.

Solution M= 980 µl (A) + 100 µl (C) +100 µl (A)

B. Préparation du réactif de Folin

Le réactif de folin est composé de 5ml du folin et 5ml de NaOH (1N).

C. Préparation de la BSA et des séries de dilution.

La solution mère de la BSA est préparée avec une concentration de 1000 µg/ml.

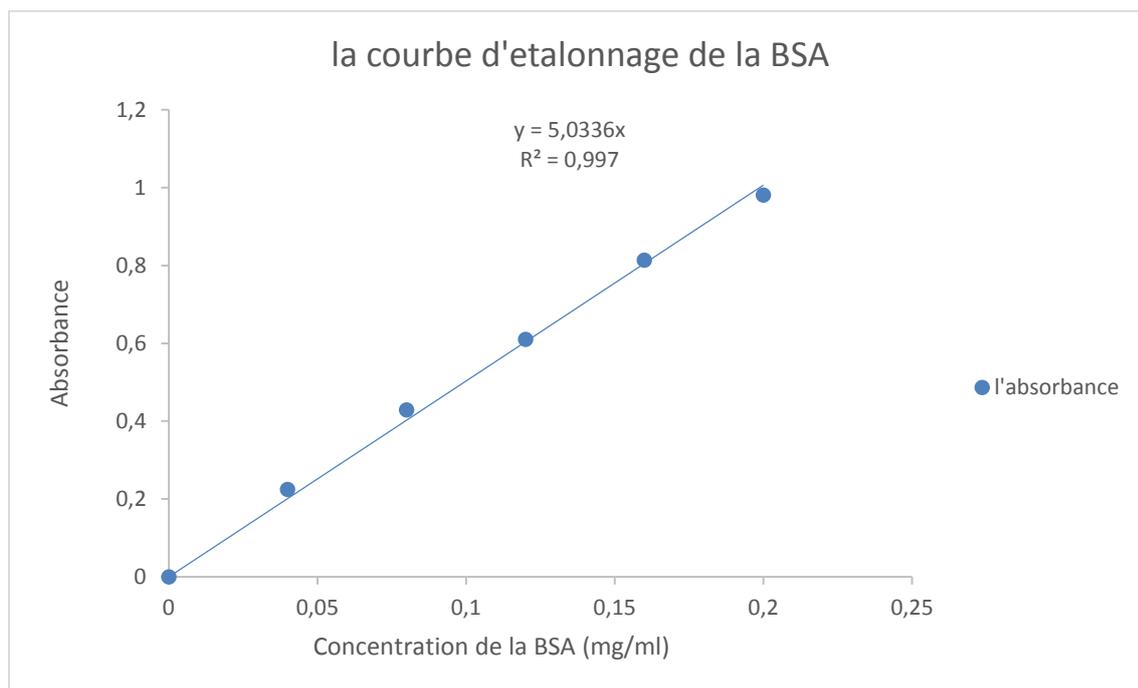
Les séries de dilution sont préparées comme suit : (voir tableau ci-dessous)

Tableau : Préparation des séries des dilutions de la BSA

	blanc	1/5	2/5	3/5	4/5	5/5
BSA (µl)	0	40	80	120	160	200
Eau distillée (µl)	200	160	120	80	40	0

D. Composition du mélange réactionnel et déroulement de la réaction

- 2 ml de la solution M.
- 200 µl de la BSA (200µl d'eau distillée pour le blanc).
- 200 µl du réactif de folin.
- Agitation et incubation pendant 30 min à l'obscurité et à température ambiante.
- Lecture de l'absorbance à 700 nm.

E. Courbe d'étalonnage de la BSA

Résumés

Zinc (Zn), the second most abundant transition metal, after iron, is an essential micronutrient for plants. Generally, Zn is considered one of the least toxic heavy metals, but in excess it is toxic to plants, usually by generation of reactive oxygen species and induction of oxidative stress.

This study aims to analyze the impact of Zn on growth and antioxidant defense mechanism of tissue *Lens culinaris*. The seeds are germinated for 15 days in a culture medium MS / 2 with different concentrations of Zn. The parameters evaluated in both parts of the plant are the content of malondialdehyde (MDA), the content of total protein, the activity of catalase (CAT) and the activity of glutathione S-transferase (GST).

The results show that from 100 μM , growth lens is inversely proportional to the concentration of Zn in the medium. Also the higher the concentration of Zn increases, the proteins rate decreases in the roots and leaves of the lenses.

When the MDA, changes in their rates, in both parts of the plant are not significant. A 100000 μM Zn, the rate becomes very large, which shows that the plant has entered a state of stress.

The specific activities of CAT and GST in both plant parts (roots and aerial), reach their maximum increase to 100000 μM and 3000 μM respectively, while the protein concentration decreases.

These results show that *Lens culinaris* are tolerant plants in the presence of Zn in the culture medium by developing a potent antioxidant system, but beyond a certain concentration their antioxidant system becomes inefficient and plants enter a state of stress.

Keywords: *Lens culinaris*, growth, oxidative stress, MDA, content of total protein, CAT, GST.

Le Zinc (Zn) est le métal de transition le plus abondant après le fer. C'est un micronutriment essentiel pour les plantes à faible concentration. En excès, il devient toxique via la génération des espèces réactives de l'oxygène et l'induction de stress oxydatif.

Cette étude vise à analyser l'impact du Zn sur le mécanisme de croissance et de défense antioxydante des tissus de *Lens culinaris*. Les graines sont mises à germer pendant 6 jours dans un milieu de culture MS/2 avec différentes concentrations en Zn. Les paramètres évalués, dans les deux parties de la plante, sont les teneurs du malondialdéhyde (MDA) et des protéines totales ainsi que les activités de la catalase (CAT) et de la glutathion S-transférase (GST).

Les résultats montrent qu'à partir de 100 μ M, la croissance des lentilles est inversement proportionnelle à la concentration du Zn dans le milieu de culture. Aussi plus la concentration du Zn augmente, plus le taux des protéines diminue dans les racines et feuilles des lentilles.

Quand aux MDA, les variations de leur taux, dans les deux parties de la plante, sont peu significatives. A 100000 μ M en Zn, le taux devient très important, ce qui montre que la plante est entrée dans un état de stress.

Les activités spécifiques de CAT et GST, dans les deux parties de la plante (racinaire et aérienne), atteignent respectivement leur maximum d'augmentation à 10000 μ M et à 3000 μ M alors que la concentration des protéines diminue.

Ces résultats montrent que *Lens culinaris* est une plante tolérante à la présence du Zn dans le milieu de culture en développant un système antioxydant puissant, mais au-delà d'une certaine concentration son système antioxydant devient inefficace et la plante entre dans un état de stress.

Mots clés : *Lens culinaris*, croissance, stress oxydatif, MDA, teneur des protéines totales, CAT, GST.

يعتبر الزنك ثاني المعادن الانتقالية من حيث الوفرة بعد الحديد، فهو من المغذيات الدقيقة الأساسية للنباتات، كما يعد واحد من أقل المعادن الثقيلة السامة، غير أن الزيادة والإفراط عند استعماله يجعله ساما ومضرا بالنباتات نتيجة توليد أنواع تفاعلية للأكسجين وتحريض الأكسدة.

وتهدف هذه الدراسة إلى تحليل تأثير الزنك على النمو وآلية الدفاع المضادة للأكسدة في أنسجة *Lens culinaris*. نبتت البذور لمدة 15 يوما في مستنبت MS / 2 مع تركيزات مختلفة من الزنك. المعلمات التي تم تقييمها في كل أجزاء النبات هي محتوى (MDA) malondialdehyde، ومحتوى البروتين الكلي، ونشاط (CAT) catalase ونشاط (GST) glutathion S-transférase.

وأظهرت النتائج أنه من $100 \mu\text{M}$ ، نمو العدسة تتناسب عكسيا مع تركيز الزنك في المستنبت. أيضا ارتفاع تركيز الزنك، يقلل من نسبة البروتينات في الجذور والأوراق في العدسات.

بالنسبة ل MDA، التغيرات في معدلات، في كل أجزاء النبات ليست كبيرة. وعند $100000 \mu\text{M}$ من الزنك، المعدل يصبح كبير جدا، مما يدل على أن النبات قد دخل حالة من التوتر.

النشاط الانزيمي المحدد لكل من CAT et GST، في كل أجزاء النبات (الجذور والجوية)، تصل إلى أقصى ارتفاع لها عند $100000 \mu\text{M}$ و $3000 \mu\text{M}$ على التوالي، في حين يقلل من تركيز البروتين.

وتشير هذه النتائج إلى أن *Lens culinaris* من النباتات التي تتحمل وجود الزنك في المستنبت من خلال تطوير نظام مضادات للأكسدة، ولكن ما وراء تركيز معين نظامهم المضادة للأكسدة يصبح غير فعال والنباتات تدخل حالة من التوتر.

الكلمات المفتاحية: *Lens culinari*، لأكسدة، نمو، MDA، محتوى البروتين الكلي، CAT، GST.

Année Universitaire:2015/2016

Présenté par : HAFDI Roumeissa
BENNIU Mohamed elhadi

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

Thème : Effet du Zn sur la croissance et le système antioxydant
de *Lens culinaris* cultivée sur milieu gélosé.

Résumé :

Le Zinc (Zn) est le métal de transition le plus abondant après le fer. C'est un micronutriment essentiel pour les plantes à faible concentration. En excès, il devient toxique via la génération des espèces réactives de l'oxygène et l'induction de stress oxydatif.

Cette étude vise à analyser l'impact du Zn sur le mécanisme de croissance et de défense antioxydante des tissus de *Lens culinaris*. Les graines sont mises à germer pendant 6 jours dans un milieu de culture MS/2 avec différentes concentrations en Zn. Les paramètres évalués, dans les deux parties de la plante, sont les teneurs du malondialdéhyde (MDA) et des protéines totales ainsi que les activités de la catalase (CAT) et de la glutathion S-transférase (GST).

Les résultats montrent qu'à partir de 100µM, la croissance des lentilles est inversement proportionnelle à la concentration du Zn dans le milieu de culture. Aussi plus la concentration du Zn augmente, plus le taux des protéines diminue dans les racines et feuilles des lentilles.

Quand aux MDA, les variations de leur taux, dans les deux parties de la plante, sont peu significatives. A 100000µM en Zn, le taux devient très important, ce qui montre que la plante est entrée dans un état de stress.

Les activités spécifiques de CAT et GST, dans les deux parties de la plante (racinaire et aérienne), atteignent respectivement leur maximum d'augmentation à 10000 µM et à 3000 µM alors que la concentration des protéines diminue.

Ces résultats montrent que *Lens culinaris* est une plante tolérante à la présence du Zn dans le milieu de culture en développant un système antioxydant puissant, mais au-delà d'une certaine concentration son système antioxydant devient inefficace et la plante entre dans un état de stress.

Mots clés : *Lens culinaris*, croissance, stress oxydatif, MDA, teneur des protéines totales, CAT, GST.

Laboratoire de recherche: Biologie et Environnement. Université des Frères Mentouri Constantine

Jury d'évaluation :

Présidente du jury :	Mme MECHAKRA A.	Prof. - UFM Constantine.
Rapporteur :	Mme BENHAMDI A.	MCB - UFM Constantine.
Examinatrice :	Mme BENCHIHEUB M.	MCB - UFM Constantine.

