



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي  
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR 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 و البيولوجيا الخلوية و الجزيئية  
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 : Analyse Protéomique et Santé



**Intitulé :**

**Etude de l'effet du zinc sur le système antioxydant de l'haricot blanc (*phaseolus vulgaris L.*)**

Présenté et soutenu par :

**RIGHA Amina et BOUSSEBOUA Sara**

Le : 01/07/2015

Jury d'évaluation :

**Président du jury :** KHELIFI Douadi (Prof.- UFM Constantine).

**Rapporteur :** BENHAMDI Asma (MAB- UFM Constantine).

**Examinatrice :** BELLIL Ines (MCB- UFM Constantine).

***Année universitaire***  
***2014 - 2015***

# *Remerciements*

*Nous adressons nos remerciements les plus sincères à notre encadrante, Docteur **BENHAMDI Asma**, pour ses conseils éclairés et sa vision objective et rationnelle, ainsi que sa bienveillante disponibilité.*

*Nous exprimons notre profonde et respectueuse gratitude à Mr. **KHELIFI D.** Professeur à l'université des Frères Mentouri de Constantine, qui nous a fait l'honneur de présider le jury de ce mémoire.*

*Nous adressons nos vifs et sincères remerciements à Mlle **BELLIL I.** Docteur à l'université des Frères Mentouri de Constantine, pour l'honneur qu'elle nous a fait en acceptant d'examiner ce travail et de participer au jury.*

*Un très grand merci à tous ceux qui nous ont aidés et soutenues lors de l'élaboration de ce mémoire*

***RIGHA Amina***

***BOUSSEBOUA Sara***

# *Dédicace*

*A Dieu Tout Puissant, d'avoir été mon guide pendant toutes ces années.*

*Ce mémoire représente l'aboutissement du soutien et l'encouragement que mes parents m'ont prodigué tout au long de ma scolarité. Cru en moi et m'avoir aidé à arriver là où j'en suis ;*

*Merci pout tout.*

*A mes frères : Ahmed et Yousef.*

*A ma sœur et meilleure amie : Rahma.*

*«A mes fideles amies : Nihad, Imen, Mimi, Anfel, sara, Naserin et Inssaf»  
pour tous les bons moments passés ensemble*

*RIGHA Amina*

# *Dédicace*

*Avant de dédier ce travail, je tiens à remercier الله le Tout Puissant qui nous a permis de mener à bien ce modeste travail*

*A mes très chers parents Houcine et Rafika*

*Pour leur amour et leur soutien qui m'ont tant aidé durant toutes mes années d'études et dans tous les moments qui accompagnent ma vie*

*A mes deux frères Naoufel et Younes*

*A ma sœur Imen*

*A ma cousine Ilhem et ma binome Amina*

*A ma petite cousine Nesrine*

*A toute la famille BOUSSEBOUA*

**BOUSSABOUA Sara**

## TABLE DES MATIERES

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

<b>Introduction</b> .....	1
<b>CHAPITRE 1: SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	
<b>1. Les métaux lourds</b> .....	4
1.1. Définition .....	4
1.2. Origine des métaux lourds.....	4
1.2.1. Origine naturelle.....	4
1.2.2. Origine anthropique.....	5
1.3. Les différents types de métaux lourds.....	5
1.3.1. Les métaux essentiels.....	5
1.3.2. Les métaux non essentiels.....	5
1.4. Toxicité et tolérance des plantes aux métaux lourds.....	5
1.4.1. Toxicité.....	5
1.4.2. Tolérance.....	6
1.5. Le zinc et les plantes.....	6
1.5.1. Généralités et sources.....	6
1.5.2. Rôle du zinc dans les plantes.....	6
1.5.3. Absorption et translocation du zinc au niveau des plantes.....	7
1.5.4. Phytotoxicité du zinc.....	8
<b>2. Le stress oxydatif</b> .....	8
2.1. Définition.....	8
2.2. Les Espèces Réactives de l'Oxygène .....	9
2.3. Sources des ERO dans les plantes.....	10
2.4. Induction de stress oxydatif par les métaux et le zinc en particulier.....	10
2.5. Conséquences du stress oxydatif .....	11
2.5.1. La peroxydation lipidique .....	11
2.5.2. L'oxydation des protéines .....	12
2.5.3. Dommages de l'ADN .....	13
<b>3. Les mécanismes antioxydants</b> .....	14
3.1. Les principaux systèmes enzymatiques.....	14
3.1.1. Superoxyde dismutase (SOD).....	14

3.1.2. La catalase (CAT).....	15
3.1.3. La glutathion peroxydase (GPX).....	15
3.1.4. La glutathion réductase (GR).....	15
3.1.5. La glutathion S-transférase.....	16
<b>3.2. Les systèmes antioxydants non enzymatiques .....</b>	<b>16</b>
3.2.1. L'acide ascorbique (ASC ou vitamine C).....	16
3.2.2. Les tocopheroles / Vitamine E .....	17
3.2.3. Le glutathion .....	17

## CHAPITRE 2 : MATÉRIEL ET MÉTHODES

<b>1. Le Matériel végétal utilisé .....</b>	<b>19</b>
<b>2. Culture des graines de phaseolus vulgaris l1 .....</b>	<b>19</b>
2.1. Milieu utilisé .....	19
2.2. Détermination du volume d'arrosage des plantes .....	19
2.3. <i>Choix des concentrations du Zn et traitement des sols</i> .....	19
2.4. Préparation et germination des graines .....	20
<b>3. Méthodes de dosage biochimiques.....</b>	<b>20</b>
3.1. Préparation de l'extrait brut.....	20
3.2. Dosage du malonedialdéhyde (MDA).....	20
3.3. Dosage des protéines.....	21
3.4. Evaluation de l'activité de la glutathion S-transférase.....	22
3.5. Dosage du glutathion.....	22
<b>4. Analyse statistique.....</b>	<b>23</b>

## TROISIÈME PARTIE : RÉSULTATS ET DISCUSSION

<b>1. Effet du zinc sur la croissance de <i>Phaseolus vulgaris L</i> .....</b>	<b>25</b>
<b>2. Effet du zinc sur la teneur de MDA (malondialdhyde).....</b>	<b>28</b>
<b>3. Effet du zinc sur l'activité de la glutathion s-transférase.....</b>	<b>29</b>
<b>4. Effet du Zn sur la teneur du glutathion.....</b>	<b>31</b>
<b>CONCLUSION.....</b>	<b>34</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>36</b>

**Annexes**  
**Résumés**

## Liste des figures

<b>Figure 1</b> : Coupe d'une racine.....	07
<b>Figure 2</b> : Schématisation de la balance entre les ERO et les antioxydants.....	08
<b>Figure 3</b> : La production de ROS suite à une série de réductions de l'oxygène.....	09
<b>Figure 4</b> : Modifications des chaînes latérales d'acides aminés après attaque radicalaire.....	12
<b>Figure 5</b> : Lésions de l'ADN formées suite à un stress oxydant.....	13
<b>Figure 6</b> : Effet du zinc sur la croissance de <i>Phaseolus vulgaris L.</i> après 6 et 9 jours de culture.....	25
<b>Figure 7</b> : Effet du zinc sur la longueur des parties aériennes et racinaires ainsi que le poids frais de <i>Phaseolus vulgaris L.</i> ....	26
<b>Figure 8</b> : Effet du Zn sur la teneur en MDA de <i>Phaseolus vulgaris L.</i> .....	28
<b>Figure 9</b> : L'activité de la GST dans les racines et les parties aériennes de <i>Phaseolus vulgaris L.</i> ....	29
<b>Figure 10</b> : Effet du Zn sur le taux du GSH dans les racines et les parties aériennes de <i>Phaseolus vulgaris L.</i> .....	31

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1</b> : Fonctions et localisation cellulaire des ROS dans la cellule végétale.....	10
<b>Tableau 2</b> : Les enzymes antioxydantes majeures impliquées dans la détoxification des ROS .....	14
<b>Tableau3</b> : Les trois types de SOD.....	14



## Liste des abréviations

**AGPI** : Acide gras polyinsaturé.

**ASA** : Acide ascorbique.

**DHA** : Acide déhydroascorbique.

**CAT** : Catalase.

**CDNB** : 1-chloro-2,4-dinitrobenzène.

**DTNB** : Acide 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoïque).

**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.

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** : Peroxyde d'hydrogène.

**HO<sub>2</sub><sup>°</sup>** : Radical hydroperoxyde.

**HNE** : 4-hydroxynonéal.

**MDA** : Malondialdéhyde.

**NADPH oxidase** : Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase.

**PC** : Phytochélatine.

**ROS** : Reactive oxygen species.

**SH** : Groupement thiol.

**SOD** : Superoxyde dismutase.

**TBA** : Acide Thio Barbiturique.

**TNB** : Acide thionitrobenzoïque.

# Introduction

La pollution de l'environnement et des sols est devenue actuellement un problème préoccupant. En effet les substances polluantes présentes dans le sol sont extrêmement nombreuses. Parmi les plus répandues figurent : les hydrocarbures, les pesticides, les matières plastiques, l'amiante et les métaux lourds (Adriano, 2001; Alkorta et al., 2004).

Les métaux lourds font partie des principaux polluants inorganiques du sol. Ils sont continuellement rajoutés dans les sols par diverses activités. Par exemple, en agriculture par les boues d'épuration, en industrie par les activités métallurgiques,... Si certains éléments métalliques (oligo-éléments), présents à l'état de traces, tels que le zinc (Zn), le cuivre (Cu), le fer (Fe), le Manganèse (Mn)..., sont essentiels pour l'organisme, l'accroissement de leur concentration les rend toxiques et dangereux pour les êtres vivants. D'autres éléments ne sont pas nécessaires et ne peuvent avoir que des effets toxiques. A cette catégorie appartiennent différents éléments, tels que le plomb (Pb), le mercure (Hg), le cadmium (Cd) (Vamerali et al., 2010)

N'étant pas dégradables dans le sol, les métaux lourds persistent dans l'environnement pendant de longues périodes. Les plantes sont directement exposées à ces éléments dont le potentiel toxique est indéniable et passe à l'homme à travers la chaîne alimentaire (Sharma and Dietz, 2009).

La réponse primaire des plantes à la toxicité des métaux lourds est l'induction d'un stress oxydatif suite à la génération des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et radicalaires. Ces espèces vont réagir avec les molécules essentielles de la plante, tels que l'ADN, les protéines et les lipides. Elles induisent la peroxydation des lipides membranaires et engendrent des dégâts cellulaires ainsi que des dysfonctionnements enzymatiques.

Pour faire face aux dommages causés par les ROS, les plantes ont développé un mécanisme de défense antioxydant qui est à la fois composé de systèmes enzymatiques (catalase, superoxyde dismutase, peroxydase, glutathion réductase, glutathion S-transferase, glutathion peroxydase, etc...), ainsi que de systèmes non-enzymatiques (vitamines C et E, caroténoïdes, glutathion, etc...). Cela permet le maintien d'une capacité antioxydante élevée dans les cellules et l'augmentation de la tolérance au stress (Shahid et al., 2014).

L'objectif de cette étude est d'étudier l'effet du zinc sur la croissance et sur le système antioxydant d'une légumineuse : *Phaseolus vulgaris L.* par l'évaluation :

- du niveau de la lipoperoxydation membranaire (déterminé par le dosage du Malondialdéhyde (MDA)).
- de l'activité d'une enzyme antioxydante : la glutathion S-tansférase.
- et de la concentration d'un antioxydant, à savoir le glutathion.

# Chapitre I

## Synthèse bibliographique

## **1. Les métaux lourds**

### **1.1. Définition**

L'appellation « métal lourd » est un terme utilisé pour désigner tout élément métallique ayant une densité relativement élevée et qui est toxique même à faible concentration (Duruibe et al., 2007).

Les définitions des métaux lourds sont multiples et dépendent du contexte dans lequel on se situe ainsi que de l'objectif de l'étude à réaliser :

- D'un point de vue chimique, les éléments de la classification périodique formant des cations en solution sont considérés comme des métaux.

- D'un point de vue physique, le terme « métaux lourds » désigne les éléments traces métalliques « ETM » naturels, caractérisés par une masse volumique supérieure à  $5 \text{ g/cm}^3$  (Wang et al., 2009).

### **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 (Aoun, 2008) :

#### **1.2.1. Origine naturelle**

Les sources principales de métaux lourds dans l'environnement sont les matériaux de la croûte qui sont, soit altérés et érodés au niveau de la surface de la terre, soit injectés dans l'atmosphère de la terre via l'activité volcanique. Ces deux sources représentent 80% de toutes les sources naturelles tandis que les incendies de forêts et les sources biogéniques représentent 10% chacun (Callender and Lollar, 2003).

#### **1.2.2. Origine anthropique**

L'autre source de contamination par les métaux est d'origine anthropique. Au cours des dernières décennies, l'apport de métaux lourds dans le monde s'est étendu. 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. Ils se trouvent en proportion très faible 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). Par exemple, le zinc (Zn), à la concentration du millimolaire, est un oligo-élément qui intervient dans de nombreuses réactions enzymatiques (déshydrogénase, protéinase, peptidase) et joue un rôle important dans le métabolisme des protéines, des glucides et des lipides. A forte dose il devient toxique, en empêchant de nombreuses fonctions métaboliques des plantes. Cela se traduit par un retard de croissance et même une sénescence (Kabata-Pendias and Pendias, 2001).

#### **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 and Walker, 1990; Behanzin et al., 2015).

### **1.4. Toxicité et tolérance des plantes aux métaux lourds**

#### **1.4.1. Toxicité**

Il a été démontré que les métaux lourds affectent de nombreux processus morphologiques, physiologiques et biochimiques chez les plantes (Sobkowiak and Deckert, 2003).

La réduction de croissance est une des réponses les plus fréquentes et la première observable lorsque des plantes sont soumises à un stress (Appenroth, 2010).

Ce sont les organes qui sont en contact direct avec les substances toxiques qui présentent rapidement des modifications détectables de leurs paramètres de croissance. C'est le cas des racines des plantes se développant sur des sols contaminés (S. Clemens, 2006).

Selon l'importance du stress et la nature des plantes, vis-à-vis des métaux, les feuilles peuvent présenter, par conséquence, une chlorose. Cette dernière est due à la fois à une perte de chlorophylle et une déficience en fer (Romanowska, 2002).

### 1.4.2. Tolérance

La tolérance aux métaux peut être assurée par plusieurs mécanismes différents, à savoir par :

- chélation ou précipitation avec des ligands à haute affinité. Ces derniers sont localisés sur la paroi cellulaire ou à l'intérieur du cytoplasme (formation de complexes avec des peptides, des acides organiques ou des ions inorganiques),
- séquestration du métal dans la vacuole des cellules foliaires ou des trichomes
- exclusion ou excrétion active du métal.

Il en résulte alors que le métal ne puisse interférer avec les réactions métaboliques sensibles de la plante (Kabata-Pendias, 2011).

### 1.5. Le zinc et les plantes

#### 1.5.1. Généralités et sources

Selon le tableau périodique le zinc est un métal bleu-gris de transition appartenant au groupe 12 de la période 4. C'est un élément chimique de symbole Zn, de numéro atomique 30, de densité 7,2 et de masse égale à 65,39 g.mol<sup>-1</sup>.

Globalement, la plus grande source d'émissions naturelles de zinc dans l'atmosphère est le sel de mer, suivie de près par le flux de particules du sol. Les incendies et les volcans sont des sources mineures de zinc dans l'atmosphère et les contributions de la poussière météoritique sont insignifiantes (Richardson et al., 2001). Cependant il a été prouvé que ces sources naturelles ne représentent qu'environ 7% des émissions totales de cet élément dans l'environnement. La production et le traitement de minerai et les activités industrielles représentent respectivement 75% et 18% des émissions du Zn dans le milieu naturel (Nriagu, 1979).

#### 1.5.2. Rôle du zinc dans les plantes

Le zinc est indispensable pour la croissance et la reproduction normale des plantes. Cet élément est requis en faible quantité afin de permettre, d'une part, le fonctionnement normal de plusieurs voies physiologiques des plantes et d'assurer, d'autre part, l'intégrité structurale et fonctionnelle des membranes. Le Zn a un rôle important dans la régulation de la croissance des plantes et celle de l'expression des gènes. Il intervient aussi dans les différentes voies métaboliques telles que l'activité de phytohormones, la synthèse des protéines, la photosynthèse, le métabolisme des glucides, la défense contre les maladies et aussi dans la fertilité et la production de semence (Sadeghzadeh, 2013).

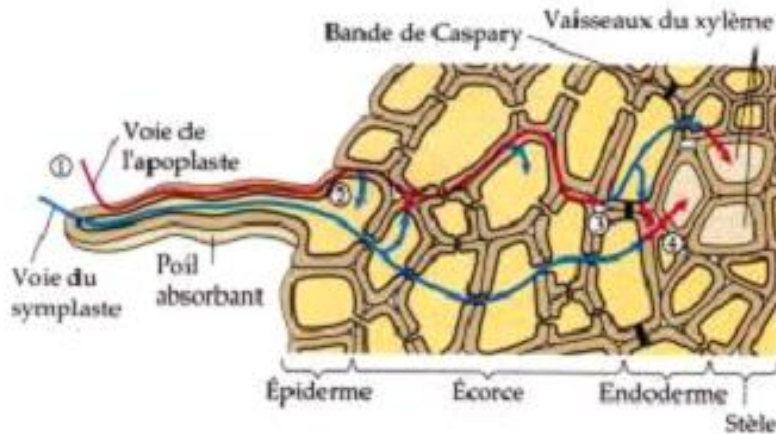


### 1.5.3. Absorption et translocation du zinc au niveau des plantes

L'absorption des minéraux est assurée par toute la surface de la plante qui est en contact avec l'eau et ses substances dissoutes. La vitesse d'absorption du zinc, bien qu'elle soit largement dépendante de l'espèce, reste néanmoins déterminée par la composition et la concentration du milieu de croissance. Le Zn est absorbé sous forme de cation divalent ( $Zn^{2+}$ ) ou sous forme de complexe avec des ligands organiques (Tsonev and Lidon, 2012).

Les travaux de Von Wiren et al. (1996) ont proposé deux voies pour l'assimilation du zinc par les graminées : le transport du cation libre ou l'assimilation sous forme chélatée avec les phytosidérophores. Plus récemment, les gènes codant pour les transporteurs du zinc, appelés de façon générale ZIP (Zinc-regulated transporters, Iron-regulated transporter-like Protein) ont été identifiés et séquencés (Guerinot, 2000; Wintz et al., 2003).

La translocation est le transport des éléments traces métalliques au sein de la plante, des racines vers les autres parties de la plante. Elle peut varier considérablement en fonction du métal, mais également de l'espèce végétale. 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** : coupe d'une racine (Marcato, 2007).

La translocation du zinc à travers les vaisseaux du xylème s'effectue par l'intermédiaire des symplastes et apoplastes. Cependant des concentrations élevées de zinc ont été observées dans le phloème, démontrant que ce métal est transloqué à travers les tissus à la fois du xylème et du phloème (Tsonev and Lidon, 2012).

### 1.5.4. Phytotoxicité du zinc

D'après Rousseau le maximum "normal" des teneurs de Zn dans les plantes est de 150mg/kg MS. Au-delà de cette concentration le Zn devient toxique. Sa toxicité dépend de la nature de la plante et du pH qui commande la concentration du Zn dans la solution (Emamverdian et al., 2015; Rout and Das, 2009).

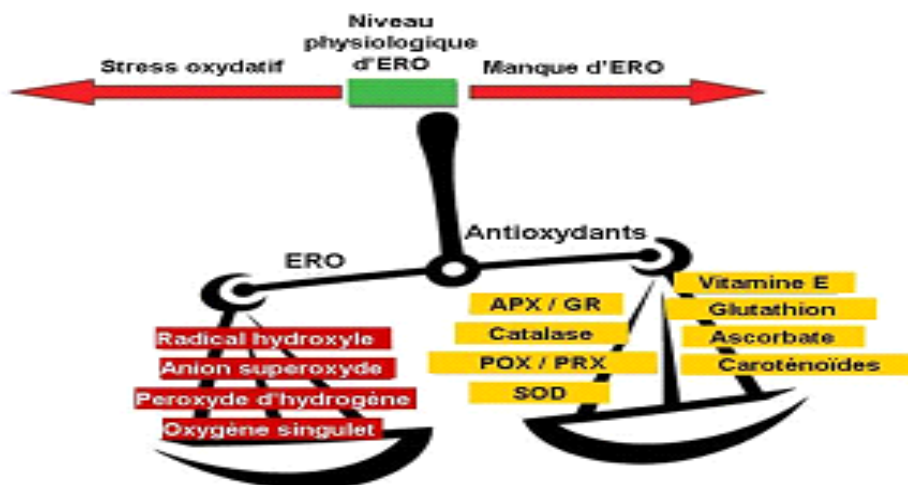
Les effets cytotoxiques du zinc sur les plantes sont multiples. La modification majeure concerne le noyau des cellules de l'extrémité des racines. La chromatine est fortement condensée et certaines des cellules corticales montrent la rupture et la dilatation de leur membrane nucléaire en présence de 7.5 mM de zinc. De plus, le cytoplasme perd sa structure. La désintégration d'organites et le développement de vacuoles sont aussi observés (Garty et al., 1992; Rout and Das, 2009).

## 2. Le stress oxydatif

### 2.1. Définition

Le terme «stress oxydatif» fait référence à un déséquilibre entre la production des espèces réactives d'oxygène (ERO) et les défenses antioxydantes (Halliwell, 2007).

Sies (1997) le définit comme «une perturbation de la balance entre les prooxydants et les antioxydants en faveur des premiers, ce qui conduit à des dommages potentiels (figure2). Ces dommages sont souvent appelés «dommages oxydatifs».



**Figure 2** : schématisation de la balance entre les ERO et les antioxydants (Pourrut, 2008).

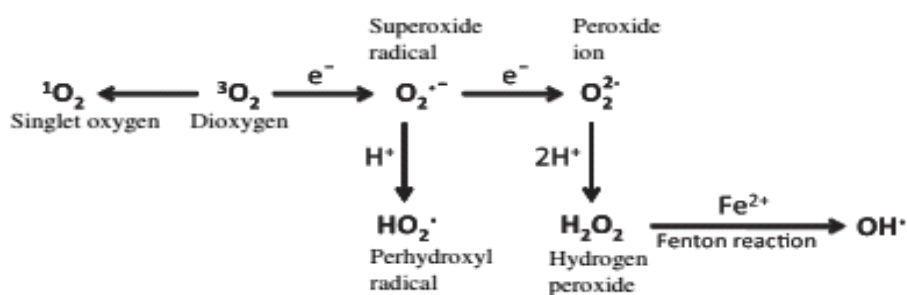
La concentration des ROS dans les tissus est le résultat d'un équilibre dynamique entre le taux de leur production et celui de leur élimination par les systèmes antioxydants. Si le potentiel antioxydant de l'organisme dépasse le taux de production des ROS l'organisme peut

survivre, alors que si les capacités de production sont supérieures aux capacités de défense le stress oxydatif aura lieu (Møller, 2001; Favier, 2003).

## 2.2. 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 dans ces derniers (Valko et al., 2007).

Les ERO désignent, soit les espèces radicalaires de l'oxygène, tels que le radical superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ), le radical hydroxyle ( $OH^{\cdot}$ ), les peroxydes ( $ROO^{\cdot}$ ) ou les alkoxydes ( $RO^{\cdot}$ ), soit des espèces actives non radicalaires de l'oxygène, comme l'oxygène singulet ( $^1O_2$ ), le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) ou l'ozone ( $O_3$ ) : ( $O_2$ ,  $O_2^{\cdot-}$ ) (Krieger-Liszkay, 2005; Halliwell, 2006).figure3



**Figure 3:** la production de ROS suite à une série de réductions de l'oxygène (Gechev et al., 2006).

La réduction incomplète de l'oxygène aboutit à la formation d'un anion superoxyde  $O_2^{\cdot-}$ . En milieu protoné, l'anion superoxyde subit généralement une réaction spontanée (ou accélérée par la SOD) de dismutation, aboutissant à la formation de peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ). En présence de métaux de transition sous forme réduite, le peroxyde d'hydrogène se dégrade en radical hydroxyle ( $OH^{\cdot}$ ), un radical libre très réactif (réaction de Fenton) qui peut être formé par la scission homolytique de la liaison  $-O-O-$  de l' $H_2O_2$  (Hippeli and Elstner, 1999; Kehrer, 2000).

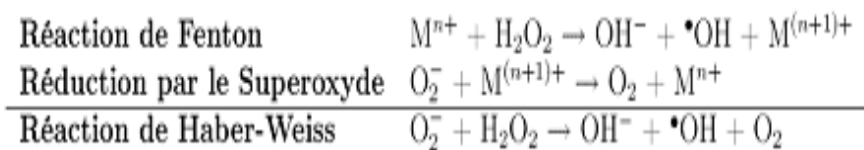
### 2.3. Sources des ERO dans les plantes

Chez les plantes, il existe plusieurs sources cellulaires des ROS localisées dans divers compartiments cellulaires. En présence de la lumière, les chloroplastes et les peroxysomes sont la principale source de production des ROS (Parent et al., 2008), alors que dans l'obscurité, les mitochondries semblent être les principales productrices des ROS. Il existe d'autres sources importantes de production des ROS dans les plantes, telles que les réactions de désintoxication catalysées par le cytochrome P450 dans le cytoplasme et dans le réticulum endoplasmique et les réactions de réduction catalysées par l'oxalate oxydase et l'amine oxydases dans l'apoplaste des cellules végétales ( tableau 1) (Gill and Tuteja, 2010a; Sharma et al., 2012).

### 2.4. Induction de stress oxydatif par les métaux et le zinc en particulier

Les métaux lourds sont réputés pour être des déclencheurs de stress, inhibant ainsi les fonctions physiologiques de base des plantes

Les Métaux de transition, ou métaux à potentiel redox actifs (tels que le Cu et le Fe), participent à la réaction Haber-Weiss et produisent des radicaux hydroxyles (voir réaction)



Les métaux qui n'appartiennent pas aux métaux de transition (tels que les Hg, Pb, As...) causent un déséquilibre métabolique, perturbant le potentiel antioxydant de la cellule et par conséquent augmentant la charge des ROS (D'souza and Devaraj, 2012).

En raison de leur propriété de transition, les ions Zn sont capables d'induire un stress oxydatif en déclenchant la production de radicaux libres et de ROS, comme l'  $H_2O_2$ , le super oxyde et le radical hydroxyle et induisant de façon concomitante la perturbation du système de défense antioxydant ou du système de transport photosynthétique d'électrons (Hippeli and Elstner, 1999; Manoj and Padhy, 2013).

## 2.5. Conséquences du stress oxydatif

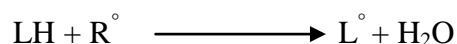
### 2.5.1. La peroxydation lipidique (lipoperoxydation):

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

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

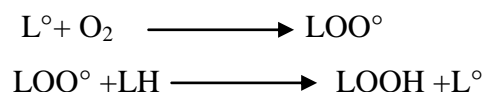
#### ➤ *Initiation*

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 O<sub>2</sub>° et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Le résultat est l'apparition d'un radical lipidique «L°» (**Voir réaction 1**)



#### ➤ *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). A son tour, ce radical réagit avec un autre acide gras afin de donner un hydroperoxyde (LOOH) et un nouveau radical lipidique.

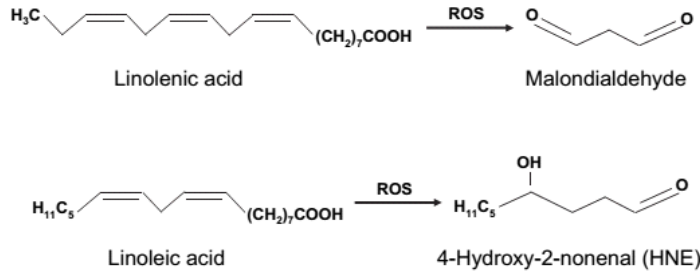


#### ➤ *Terminaison*

Dans cette phase, les radicaux lipidiques réagissent ensemble pour donner des produits non radicalaires. 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, le 4-hydroxynonéanal (HNE) et le malondialdéhyde (MDA) résultant de l'attaque des acides linoléique et linoléique par OH° et O<sub>2</sub> (voir réaction).

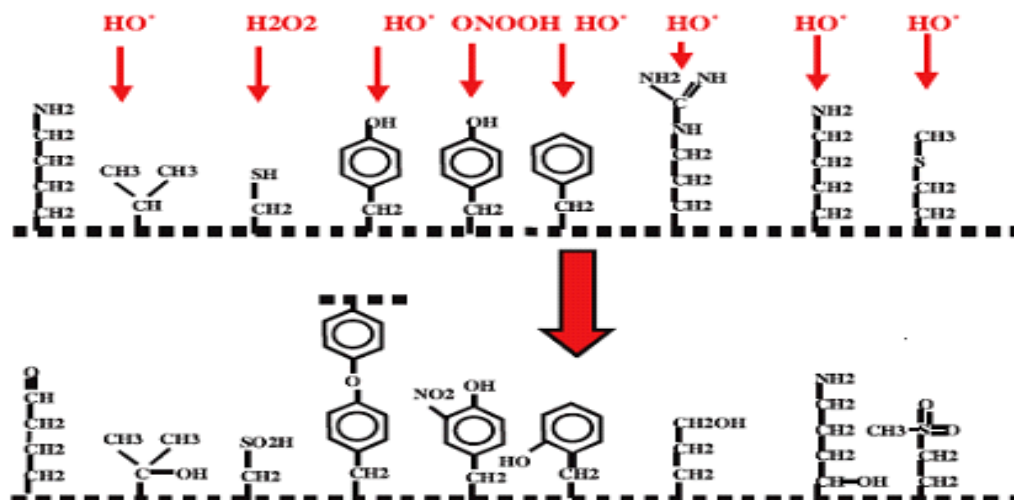


Ces hydroperoxydes sont toxiques pour les cellules car ils provoquent la baisse de la fluidité membranaire et l'altération des protéines membranaires (Gill and Tuteja, 2010a).

### 2.5.2. L'oxydation des protéines

Les protéines sont particulièrement sensibles à l'action des ROS (Stadtman and Levine, 2000; Favier, 2003). Les plus touchées sont celles comportant un groupement sulphydryle (-SH), comme c'est le cas pour de nombreuses enzymes et protéines de transport (Stadtman and Levine, 2000). Le radical hydroxyle et le peroxyde d'hydrogène sont capables d'oxyder ces groupements, conduisant à l'inactivation de certaines enzymes.

Ces radicaux sont à l'origine de la dégradation irréversible des protéines, par la formation de groupements carbonyles sur la chaîne latérale de certains acides aminés (voir figure 5)



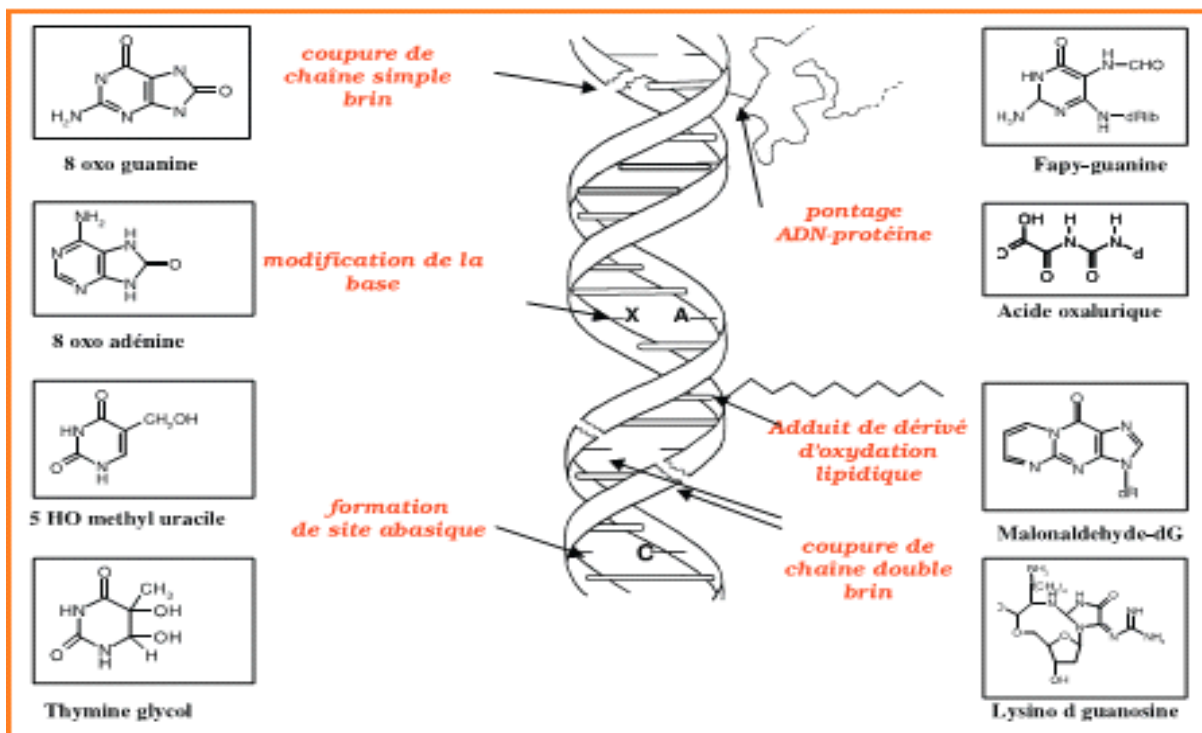
**Figure 4** : modifications des chaînes latérales d'acides aminés après attaque radicalaire (Favier, 2003).

L'histidine, l'arginine, la lysine ou encore la proline sont des cibles privilégiées de ce processus d'altération oxydative (Wong et al., 2008). De nombreux autres acides aminés sont également susceptibles d'être oxydés par les ERO.

### 2.5.3. Dommages de l'ADN

Les acides nucléiques sont très sensibles aux radicaux libres. Les altérations oxydatives causées par les ERO sont considérées comme la source majeure de dommages spontanés sur l'ADN ( figure 6). Le spectre des dégâts causés par les ERO est large avec des lésions différentes (Beckman and Ames, 1997).

Ces 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 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' $\text{OH}^\bullet$  peuvent être générées. Parmi elles, les bases oxydées, les sites abasiques, les adduits intra-caténaux, 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 de type MDA-dG ou éthénodérivés (Niedernhofer et al., 2003).

### 3. Les mécanismes antioxydants

Pour s'adapter et survivre à l'exposition continue des EROs et à leurs éventuels dommages, les organismes vivants ont développé un arsenal de mécanismes de défense dont les antioxydants. Les antioxydants sont en fait des molécules capables d'empêcher ou de diminuer significativement l'oxydation des substrats. Ces antioxydants sont divisés en deux groupes : les antioxydants enzymatiques et les antioxydants non enzymatiques

#### 3.1. Les principaux systèmes enzymatiques

Les enzymes, telles que la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT), la glutathion réductase (GR) et la glutathion peroxydase (GPX) ainsi que la glutathion-s-transférase (GST), sont à l'avant-garde dans la lutte contre les attaques oxydatives (tableau2).

**Tableau2** : les enzymes antioxydantes majeures impliquées dans la détoxification des ROS (Blokhina et al., 2003).

Enzyme	Code enzymatique	Réactions
SOD	EC : 1.15.1.1	$O_2^{\bullet -} + O_2^{\bullet -} + 2H^+ \longrightarrow 2H_2O_2 + O_2$
CAT	EC : 1.11.1.6	$2H_2O_2 \rightleftharpoons O_2 + 2H_2O$
GPX	EC : 1.6.4.2	$2GSH + PUFA-OOH \rightleftharpoons GSSG + PUFA + 2H_2O$
GST	EC : 1.11.1.12	$RX + GSH \rightleftharpoons HX + R-S-GSH$
GR	EC : 2.8.1.18	$GSSG + NADPH \rightleftharpoons NADP^+ + 2GSH$

##### 3.1.1. Superoxyde dismutase (SOD)

Le superoxyde dismutase (SOD) est la première enzyme antioxydante de défense contre le stress oxydatif biotique ou abiotique. Elle appartient à la famille des métalloenzymes et catalyse la dismutation de l' $O_2^{\bullet -}$  en  $H_2O_2$  et  $O_2$  (Herrero et al., 2008). (voir réaction).

En fonction du cofacteur métallique et de la localisation intracellulaire, trois types, ou isoenzymes, de SOD sont identifiés : Cu/Zn-SOD, Mn-SOD et Fe-SOD (voir tableau 3).

Les isoenzymes de la SOD sont activées par différents types de stress abiotiques, tels que le stress hydrique, le refroidissement, la chaleur, l'hypoxie, les métaux lourds, les pesticides... (Apel and Hirt, 2004; Asada, 2006).



### 3.1.2. La catalase (CAT)

La catalase fut la première enzyme découverte et caractérisée parmi les enzymes antioxydantes (Karuppanapandian et al., 2011). C'est une enzyme tétramérique ayant un groupement hémique contenant du fer, avec le potentiel de dismuter directement le  $H_2O_2$  en  $H_2O$  et en  $O_2$  ((Arora et al., 2002; Vellosillo et al., 2010). selon la réaction suivante :

Il est connu qu'une molécule de CAT peut convertir 6 millions de molécules de  $H_2O_2$  en  $H_2O$  par minute (Gill and Tuteja, 2010a).

Elle est importante dans la suppression du  $H_2O_2$  généré dans les peroxysomes lors de la B-oxydation des acides gras, la photorespiration et le catabolisme des purines (Mittler, 2002; Blokhina and Fagerstedt, 2010). En cas de stress, la CAT est reconnue indispensable pour la détoxification des radicaux libres.

### 3.1.3. La glutathion peroxydase (GPX)

La glutathion peroxydase est une grande famille d'isoenzymes qui catalysent la réduction des hydroperoxydes organiques et lipidiques et de  $H_2O_2$  en utilisant le glutathion réduit comme donneur de protons.

Elle agit plus lentement que la catalase mais elle a une meilleure affinité pour le  $H_2O_2$  que la CAT. Les isoenzymes de la GPX sont sélénium-dépendantes ou sélénium-indépendantes et sont soit cytosoliques, soit extracellulaires (Sharma et al., 2012).

### 3.1.4. La glutathion réductase (GR)

La glutathion réductase est une flavoprotéine oxydoréductase. Elle catalyse la réduction du glutathion disulfure (GSSG) en (GSH) réduit et utilise le NADPH en tant que réducteur (Racchi, 2013).

Ce qui permet le maintien le GSH nécessaire pour le fonctionnement des cellules de la plante (Rao and Reddy, 2008).

La GR se retrouve principalement dans le chloroplaste. Cependant, on peut trouver les isoformes de cette enzyme en faible quantité dans les mitochondries, le cytosol et les peroxysomes lors d'un stress biotique ou abiotique (Perl-Treves and Perl, 2002).

### **3.1.5. La glutathion S-transférase**

Les glutathion-S-transférases (GSTs) sont une grande famille multifonctionnelle des enzymes de détoxification. Leur fonction principale est de catalyser la conjugaison des composés électrophiles au 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, en permettant le transport du GSH vers les compartiments cellulaires subissant des dommages oxydatifs, et en assurant 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 and Tuteja, 2010b; Tan et al., 1986).

### **.3.2. Les systèmes antioxydants non enzymatiques**

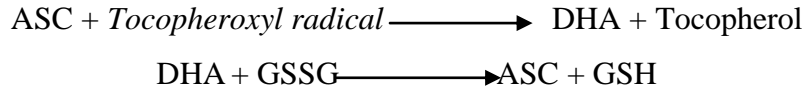
En plus des enzymes, il existe des composants non enzymatiques du système de défense antioxydant qui agissent comme des piègeurs des ROS et des xénobiotiques. Ils comprennent principalement le glutathion (GSH), l'acide ascorbique, les tocophérols mais aussi les caroténoïdes, les composés phénoliques,... Ces antioxydants sont impliqués dans les processus de détoxification mais aussi dans la croissance et le développement des plants dès les premières phases de croissance jusqu'à la sénescence (Ahmad, 2014; Sharma et al., 2012)

#### **3.2.1. L'acide ascorbique (ASC ou vitamine C)**

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; Smirnoff, 2000).

De plus, l'ascorbate est muni d'une propriété importante. Il réagit avec le superoxyde, le peroxyde d'hydrogène, les radicaux de tocophérol, le glutathion,... pour :

- éliminer les ROS et donner de l'acide monodéhydroascorbique (MDHA) ou de l'acide déhydroascorbique (DHA).
- régénérer le glutathion et le  $\alpha$ -tocophérol (Gardès-Albert et al., 2003) (voir réaction)



### 3.2.2. Les tocophérols / Vitamine E

La vitamine E, particulièrement l' $\alpha$ -tocophérol, est un antioxydant liposoluble qui protège les membranes des thylakoïdes des chloroplastes de l'attaque des ROS. Elle est capable d'empêcher ou d'arrêter la propagation de la peroxydation lipidique en réagissant directement avec les ROS dérivés des PUFA ou d'autres molécules radicalaires (Perl-Treves and Perl, 2002).

Il a été démontré que le stress oxydatif active l'expression de gènes responsables de la synthèse des tocophérols dans les plantes supérieures (Munne-Bosch, 2005).

### 3.2.3. Le glutathion

Le glutathion est un tripeptide contenant un groupe thiol (L- $\gamma$ -glutamyl-L-cystéinyglycine) très abondant dans tous les compartiments de la cellule végétale: le cytosol, le réticulum endoplasmique, la vacuole, les chloroplastes, les mitochondries, et l'apoplaste. C'est le principal thiol non-protéique et le substrat de plusieurs enzymes de détoxification.

Il participe à plusieurs processus physiologiques, tels que la régulation du transport de soufre (L'appartient and Touraine, 1996), le stockage et la désintoxication des xénobiotiques, la régulation de l'expression génique (Wingate et al., 1988) et la synthèse des phytochélatines (PC). Ces dernières jouent un rôle prédominant dans la séquestration des métaux chez les végétaux (Stephan Clemens, 2006).

Le GSH est essentiel pour le système de défense antioxydant, en particulier dans les chloroplastes, car il protège l'appareil photosynthétique contre les effets néfastes des ROS. En outre le glutathion empêche la dénaturation des protéines provoquées par l'oxydation des groupes thiols au cours du stress. Ces fonctions résultent de l'oxydation du GSH pour former le glutathion disulfure (GSSH) (Sisein, 2014; Xiang et al., 2001).

Le ratio de GSH/GSSH est maintenu par la glutathion réductase (GR), qui utilise le NADPH pour réduire le GSSH en deux GSH (Noctor et al., 2002; Sisein, 2014).

# Chapitre II

## Matériels & méthodes

L'objectif de ce travail est l'étude de l'effet des différentes concentrations en Zinc, dans le sol, sur 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. Le Matériel végétal utilisé**

Le matériel biologique choisi pour l'étude est l'haricot. Son nom scientifique est *Phaseolus vulgaris L.* C'est une plante qui appartient à la famille des Fabacées.

### **2. Culture des graines de *Phaseolus vulgaris***

#### **2.1. Milieu utilisé**

Le milieu de culture des graines choisi est un sol naturel recueilli de la zone de Chaabat Ersas, Constantine.

2 séries de pots perforés, contenant chacun 155g du sol, sont préparées. Chaque série englobe plusieurs pots avec des concentrations croissantes en Zn :

- la première a été utilisée pour le dosage de l'activité des enzymes antioxydantes dans les deux parties des plantes, à savoir : racines et partie aériennes.

- la deuxième a été préparée pour suivre la croissance des plantes : longueur des parties racinaire et aérienne.

#### **2.2. Détermination du volume d'arrosage des plantes**

Le volume d'arrosage des sols a été déterminé comme suit :

Un pot contenant la même quantité du sol utilisé pour la culture des graines est arrosé avec 200 ml d'eau distillée. L'eau qui s'écoule du pot après 48 heures est récupérée. Le  $\frac{1}{4}$  du volume de l'eau absorbée par le sol (soit 20 ml) représente la quantité à arroser les plantes chaque 2 jours.

#### **2.3. Choix des concentrations du Zn et traitement des sols**

Après plusieurs tests de croissance des graines d'haricot sur sol contenant différentes concentrations en Zn, cinq concentrations (0, 50, 100, 200, 400 mM) sont choisies.

Elles sont préparées à partir d'une solution mère de 800 mM du  $Zn\ SO_4 \cdot 7H_2O$ . Les différentes concentrations sont ajustées à un pH de 4,5 (voir annexe 1).

Le traitement consiste à arroser les sols secs (avant de semer les graines) par des solutions en Zn de 0, 50, 100, 200 et 400 mM et à s'assurer que tout le sol s'est imbibé.

## **2.4. Préparation et germination des graines**

Dans le but d'accélérer le processus de germination des graines d'haricot, une pré-culture au coton sur une période de 3 jours a été effectuée. Les graines sont ensuite transférées dans les pots remplis de terre traitée par le Zn.

Dans chaque pot, contenant le sol traité (des deux séries), 3 graines d'haricot sont placées à environ 0.5 cm au-dessous du surface.

Les graines sont mises à germer dans des conditions environnementales ambiantes. L'arrosage se poursuit à une moyenne de 20 ml par 2 jours avec de l'eau distillée acidifiée.

## **3. Méthodes de dosage biochimiques**

### **3.1. Préparation de l'extrait brut**

Les échantillons sont préparés selon le protocole suivant : 0,5 g des tissus végétaux (racines et parties aériennes) sont broyés en une poudre fine avec un mortier et écrasés sous l'azote liquide. Les protéines sont ensuite extraites à 4 °C avec 3 ml de phosphate de potassium, 50 mM à froid (pH 7,6) contenant 0,1 % de triton X-100 (v/v) et 1% de polyvinylpolypyrrolidone (PVPP) (w/v). L'homogénat est centrifugé à 4 °C pendant 15 min à 12000.g.

Le surnageant récupéré est utilisé 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 GST,
- le dosage du glutathion.

### **3.2. Dosage du malonedialdéhyde (MDA)**

Le niveau du stress oxydatif est évalué à partir du dosage de la quantité du MDA dans les plantes, l'indicateur du niveau de la peroxydation des lipides des membranes. Il est dosé selon la méthode de Kosugi and Kikugawa, (1985) modifiée.

#### **➤ Principe de la méthode**

Le principe du dosage repose sur la réaction qui se produit entre le malondialdéhyde et l'acide thiobarbiturique (TBA) formant le dérivé coloré MDA-TBA<sub>2</sub>, de couleur rose absorbant à 532 nm.

### ➤ **Mode opératoire**

0,5 ml de surnageant est homogénéisé avec 1 ml de l'acide trichloroacétique TCA (20%) et 0,5 ml de l'acide thiobarbiturique « TBA » (1%). 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  $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Elle est exprimée en  $\mu\text{mol/gramme}$  de tissu.

### **3.3. Dosage des protéines**

Les concentrations de protéines sont quantifiées selon la méthode de Lowry et al., (1951) modifiée par Pelmont (1995). La BSA est utilisée comme protéine étalon.

### ➤ **Principe**

Le principe de cette méthode repose sur la combinaison entre la réaction du biuret et la réaction de Folin-Ciocalteu. En milieu alcalin, le complexe formé par les ions  $\text{Cu}^{+2}$  et les groupements tyrosine et tryptophane réagit avec le réactif de Folin-Ciocalteu. Il se développe une coloration bleue absorbant à 750 nm.

### ➤ **Mode opératoire**

Le mélange réactionnel contient 2 ml de la solution mère (voir composition en annexe 2), 200  $\mu\text{l}$  de l'échantillon, 200  $\mu\text{l}$  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 glutathion S-transférase

Le dosage de la glutathion S-transférase est effectué selon la méthode de *Habig and Jakoby* (1981).

#### ➤ Principe de dosage

La GST catalyse la réaction de conjugaison qui s'effectue entre le glutathion (GSH) et le 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB). Elle aboutit à la formation du complexe Glutathione-2,4-Dinitrobenzene (GS-DNB) absorbant à 340 nm.

#### ➤ Mode opératoire

Le mélange réactionnel contient 2,7 ml de tampon phosphate 0,1 M, pH 6,5 (2,8 ml pour le blanc), 0,1 ml de glutathion 50 mM (préparé dans le tampon phosphate pH 6,5) et 0,1 ml de CDNB 40 mM (préparé dans l'éthanol à 95%). 0,1 ml de l'extrait enzymatique est ajouté au mélange placé dans la cuve et le tout est mixé par inversion. L'absorbance est mesurée chaque minute pendant 5 minutes.

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

Après soustraction de l'absorbance du blanc et détermination de l'absorbance de la GST de chaque échantillon, par minute, l'activité enzymatique est calculée en utilisant le coefficient d'extinction molaire du GSH-CDNB :  $9.6 \text{ mM}^{-1}$ .

Une unité correspond à la conjugaison de 1  $\mu\text{mole}$  de 1-chloro-2,4-dinitrobenzene avec le glutathion réduit par minute. L'activité spécifique est exprimée en  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de protéines.

### 3.5. Dosage du glutathion

Le dosage du glutathion (GSH) est effectué selon la méthode d'Ellman, (1959)

#### ➤ Principe

Le principe repose sur les propriétés réductrices des groupements thiols (SH) du glutathion. En présence des groupements SH de l'échantillon, les ponts disulfure (S-S) contenus dans le réactif d'Ellman (ou DTNB « 5-5' dithionitrobenzoic acid ») vont être réduits. Les dérivés thiols aromatiques « TNB : thionitrobenzoïque » formés absorbent à une longueur d'onde de 412 nm.



➤ **Mode opératoire**

250 µl de l'extrait brut est ajouté au mélange réactionnel contenant 2 ml de tampon phosphate 0,1 M, pH 8, 70µl du DTNB 10 mM (dissous dans le tampon phosphate 7,2). Le tout est homogénéisé au vortex puis incubé à température ambiante et à l'obscurité pendant 30 min. Pour le blanc, l'extrait brut est remplacé par l'eau distillée.

➤ **Calcul de la concentration du glutathion dans les échantillons**

Après mesure de l'absorbance, la concentration du glutathion de chaque échantillon est déterminée à partir d'une courbe d'étalonnage préalablement réalisée à base de différentes concentrations en GSH (voir annexe 3).

#### **4. Analyse statistique**

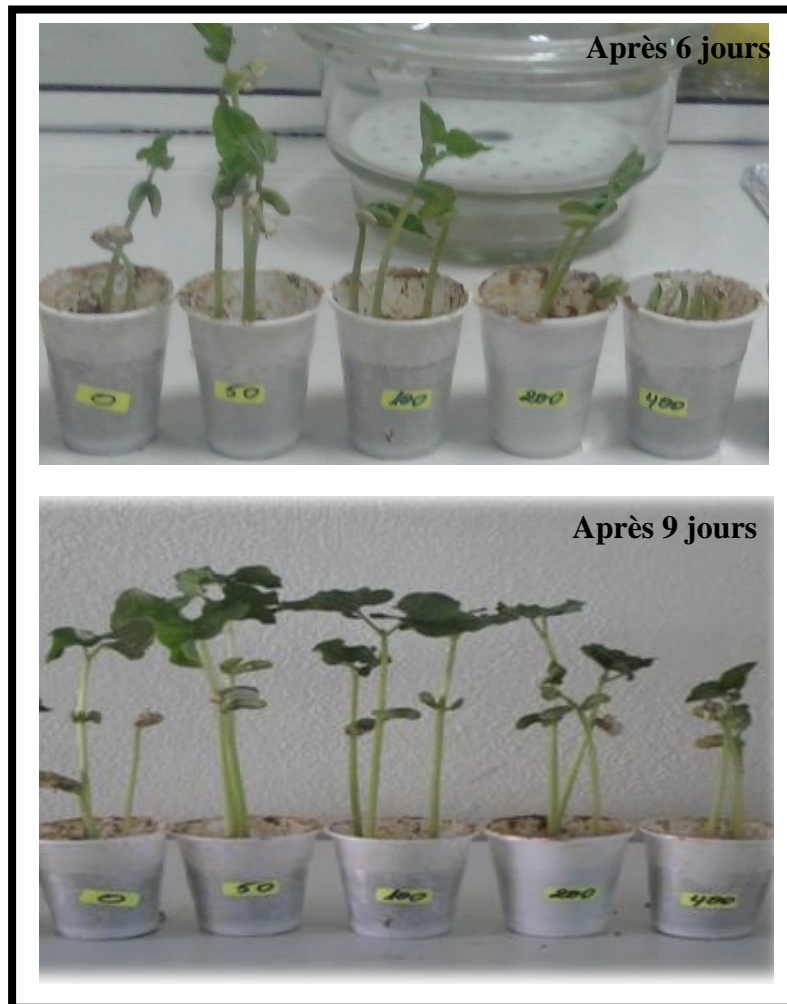
Les tests statistiques réalisés au cours de ce travail sont la moyenne  $\pm$  SEM (N=3) et l'analyse de la variance (ANOVA) suivie du test Tukey. L'analyse de la variance a été effectuée pour comparer les différentes classes de concentrations en Zn de chaque partie (aérienne et racinaire) par rapport à la classe des témoins. Le traitement des résultats est effectué à l'aide des logiciels : Excel 2007 et GraphPad Prism 5 Demo avec un seuil de signification de 0,05.

# Chapitre III

## Résultats & Discussion

### 1. Effet du zinc sur la croissance de *Phaseolus vulgaris L.*

Les résultats de la croissance de la plante *Phaseolus vulgaris L.* après 6 et 9 jours, en fonction des différentes concentrations du Zn (de 50 à 400 mM), sont présentés dans la figure 6 :

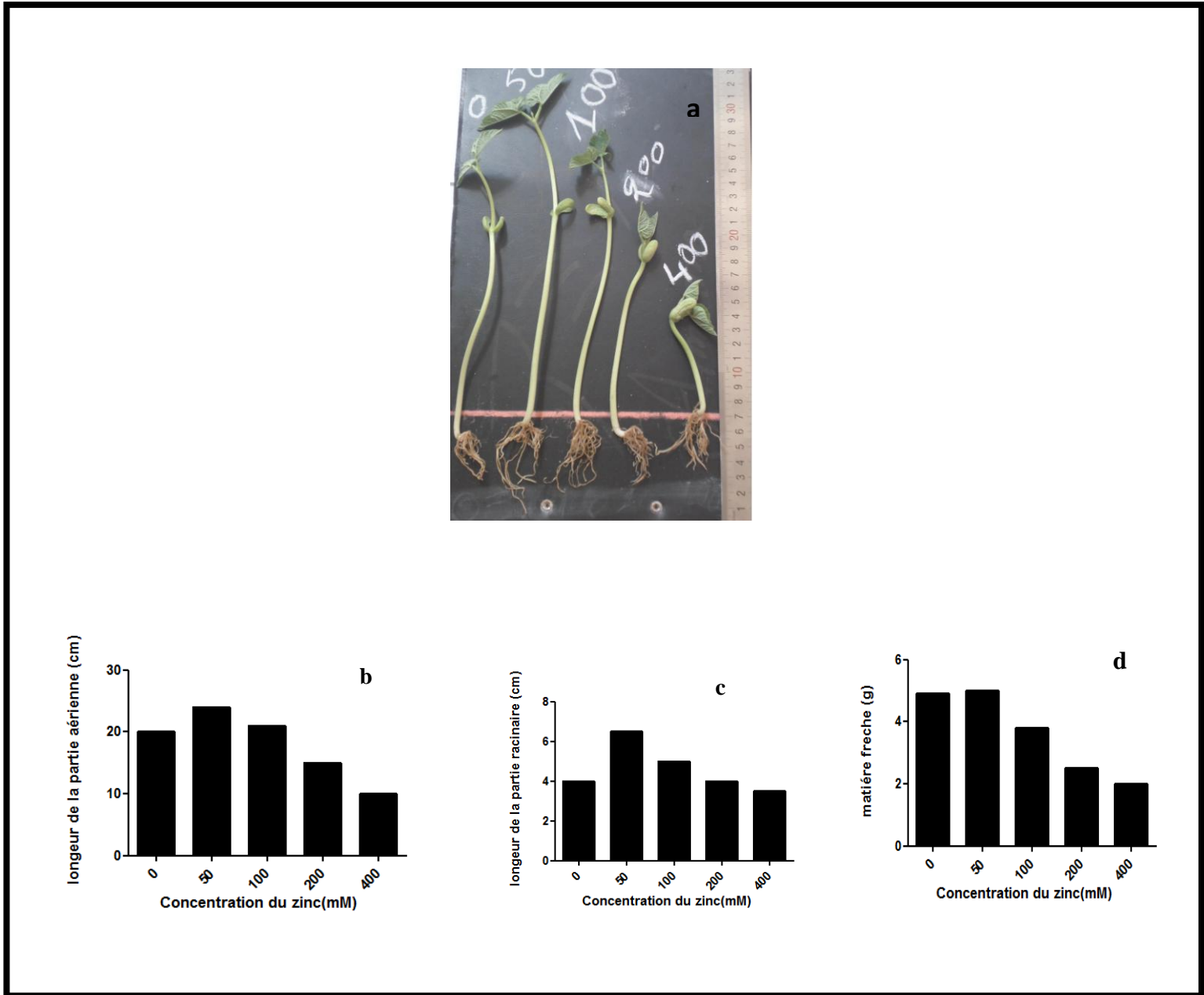


**Figure 6 :** Effet du zinc sur la croissance de *Phaseolus vulgaris L.* après 6 et 9 jours de culture.

D'après la figure 6, l'effet clair du zinc sur le phénotype commence à apparaître à partir du 6ème jour. Les résultats montrent qu'à de fortes concentrations, la croissance des plantes diminue considérablement.

La croissance des plantes atteint son maximum et dépasse même celle des témoins à une concentration en Zn de 50 mM, que ce soit après 6 ou 9 jours. Au-delà de 50 mM elle commence à diminuer.

Les résultats de la mesure de la longueur des parties aériennes et racinaires de *Phaseolus vulgaris L.*, ainsi que le poids des plantes fraîches, sont concordants avec les résultats de la croissance (figure 7).



**Figure 7 :** Effet du zinc sur la longueur des parties aériennes et racinaires ainsi que le poids frais de *Phaseolus vulgaris* L.

Les figures 7a, 7b et 7c montrent que la longueur la plus élevée des deux parties de la plante est atteinte à la concentration de 50 mM en Zn (24 cm pour la partie aérienne et 6,5 cm pour les racines). La plus basse est observée à 400 mM (10 cm pour la partie aérienne et 3,5 cm pour les racines).

De même, une diminution nette du poids des plantes fraîches est observée lorsque la concentration en Zn dépasse 50 mM (elle passe de 4,6g à 50 mM à 2,2 g à 400 mM. Voir figure 7d). Il est à noter que le poids de la matière fraîche des plantes à 50 mM en Zn dépasse celui des témoins.

Le Zn est le deuxième métal de transition le plus abondant après le fer (Fe). 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, ... (Sadeghzadeh, 2013).

L'augmentation de la croissance des parties aériennes et racinaires, ainsi que la masse de la matière fraîche des plantes, observées à la concentration de 50 mM, par rapport aux plantes témoins, peuvent être attribuées au fait que le Zn maintient son rôle d'oligoélément à de faibles concentrations (Broadley et al., 2007).

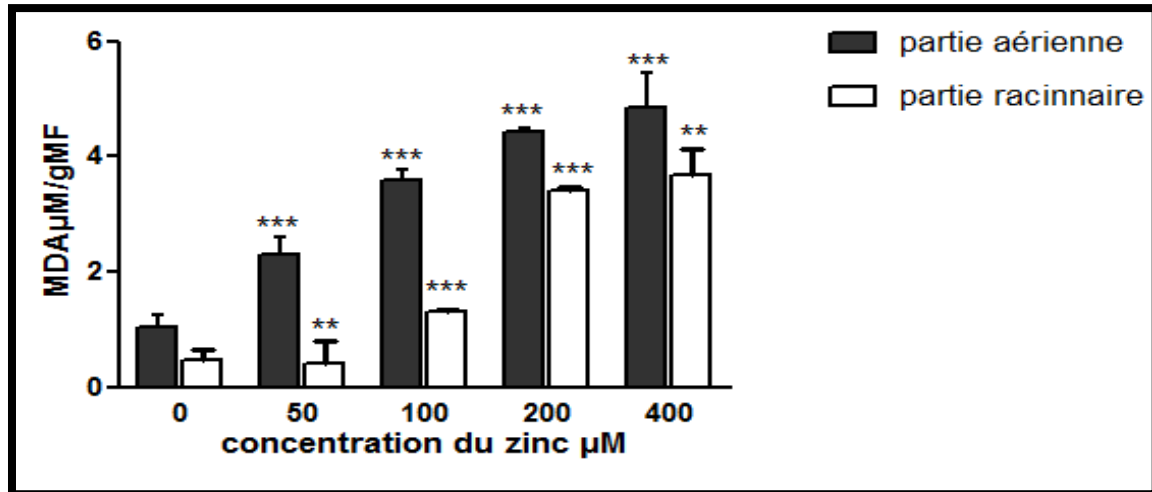
À des concentrations élevées, le zinc peut directement inhiber la croissance des racines en agissant sur la division cellulaire, l'élongation cellulaire ou la combinaison des deux. Il est connu que les métaux sont susceptibles d'inhiber l'activité mitotique, de produire des anomalies cytologiques et de provoquer des mutations au niveau de l'ADN (Vijayarengan and Mahalakshmi, 2013).

La diminution de la longueur des parties aériennes et racinaires des plantes à une concentration élevée de zinc peut être causée par une réduction, soit du nombre de cellules de *Phaseolus vulgaris* (Nieman, 1965; Vijayarengan and Mahalakshmi, 2013), soit de leur taille. *vulgaris* (Nieman, 1965; Hosseini and Poorakbar, 2013).

Il est connu que la réduction de la masse des parties racinaires limite l'absorption et la translocation des nutriments 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 de MDA (malondialdhyde)

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



**Figure 8 :** Effet du Zn sur la teneur en MDA de *Phaseolus vulgaris L.* Les astérisques indiquent une différence significative par rapport aux plantes témoins (\* : significative ( $P < 0.05$ ), \*\* : très significative ( $P < 0.01$ ), \*\*\* : hautement significative ( $P < 0.001$ )).

La figure 8 montre que la teneur en MDA augmente très significativement avec l'augmentation de la concentration du Zn. Elle est plus élevée dans les parties aériennes que dans les parties racinaires.

Certains auteurs ont démontré une augmentation de la peroxydation lipidique suite à une exposition aux métaux lourds (Gill and Tuteja, 2010a; Michel et al., 2008). Ces derniers induisent la production de ROS (tels que  $^1O_2$ ,  $O_2^-$ ,  $OH^{\cdot}$ ...).

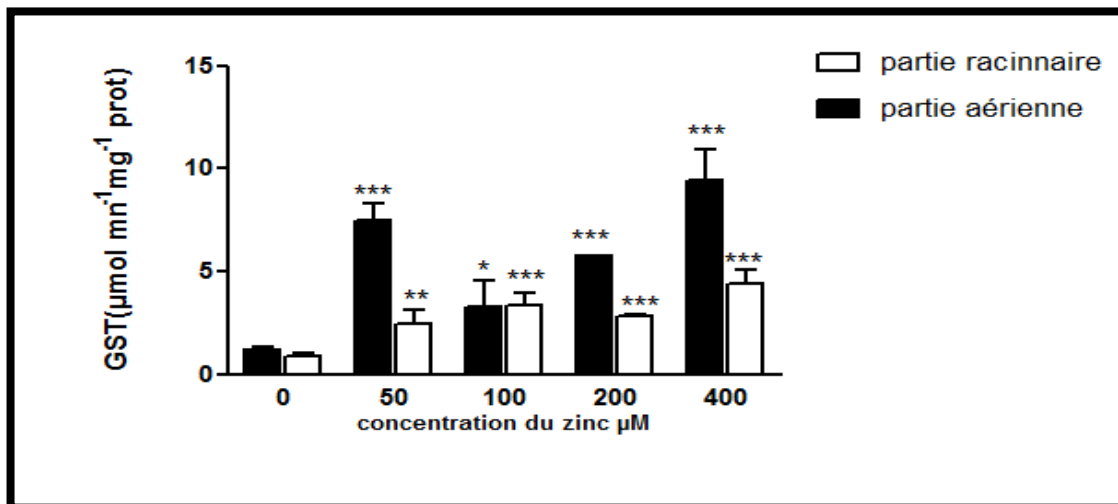
Les ROS formés et accumulés lors du stress induit par les métaux vont réagir avec l'acide gras polyinsaturé pour former les radicaux lipidiques et les aldéhydes réactifs, ce qui provoque la baisse de la fluidité membranaire et l'altération des protéines membranaires (Gill and Tuteja, 2010b). Il a été 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 (ou MDA) (Aravind and Prasad, 2003 ; Dazy et al., 2009 ; Chaoui et al., 1997)

La teneur élevée du MDA dans les parties aériennes est due au fait qu'elles contiennent en plus des mitochondries et des peroxysomes (les lieux de la génération des radicaux libres) les chloroplastes qui sont souvent considérés comme étant la principale source d'ERO chez les organismes photosynthétiques (Asada, 2006; Edreva, 2005; Foyer and Noctor, 2003).

Les métaux lourds génèrent les ROS et causent une dégradation de la chlorophylle (Lichtenthaler and Miehe, 1997; Rau et al., 2007). Cela est dû à la peroxydation de la membrane des chloroplastes et à la réduction des constituants de la membrane des thylakoïdes (Dazy et al., 2009). Ceci explique peut être la forte teneur du MDA dans les parties aériennes de *Phaseolus vulgaris L.* par rapport aux racines.

### 3. Effet du zinc sur l'activité de la glutathion s-transférase

L'activité de la GST mesurée chez *Phaseolus vulgaris L.* en réponse à différentes concentrations de zinc, est présentée dans la figure 9.



**Figure 9 :** L'activité de la GST dans les racines et les parties aériennes de *Phaseolus vulgaris L.*, Les astérisques indiquent une différence significative par rapport aux plantes témoins (ns : non significative, \* : significative (P < 0.05), \*\* : très significative (P<0.01), \*\*\* : hautement significative (P<0.001)).

D'après la figure 9 la variation de l'activité de la GST dépend de l'élévation des concentrations de zinc dans le sol. Elle augmente dans les deux parties de la plante à 50 mM pour ensuite diminuer à la concentration de 100 mM au niveau des feuilles. Elle augmente ensuite à nouveau de manière très significative à 200 et 400 mM en Zn.

La GST joue un rôle primordial dans le mécanisme de détoxification des métaux lourds et des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et aussi dans la régulation de l'équilibre redox (Konings and Penninga, 1985; Siritantikorn et al., 2007). 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).

Nos résultats montrent que les variations de l'activité de la GST sont similaires à celles du MDA. Plus la concentration des métaux dans le sol augmente plus la GST est activée pour lutter contre le stress induit par les métaux. Ce qui explique la forte activité de la GST dans les parties supérieures à l'encontre des parties racinaires.

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). Haluskova et al. ont montré que l'orge (*Hordeum vulgare* cv. Jubilent), soumis à plusieurs métaux lourds (Cd, Pb, Cu, Hg, Co et Zn), présente une augmentation significative de l'activité de son GST (Halušková et al., 2009).

Les Glutathion S-transférases sont responsables de la détoxification des composés xénobiotiques et endobiotiques par une liaison covalente du glutathion (GSH) à un substrat hydrophobe, formant un conjugué de glutathion S-R moins réactif (Mohsenzadeh et al., 2009). Chez les plantes, elles détoxifient les herbicides, les métaux lourds et les toxines naturelles par le même principe. Elles protègent également les cellules d'un large éventail contre l'attaque des radicaux libres générés par les polluants suscités (Lee et al., 2011)

Les GST végétales sont subdivisées en 7 classes : phi, tau, theta, zeta, lambda, DHAR et TCHQD et chacune assure une fonction spécifique. Les classes tau et phi sont les plus abondantes dans la plante. Elles sont principalement impliquées dans le métabolisme des xénobiotiques. Elles catalysent la détoxification des herbicides et des métaux via le GSH (Dixon et al., 2002).

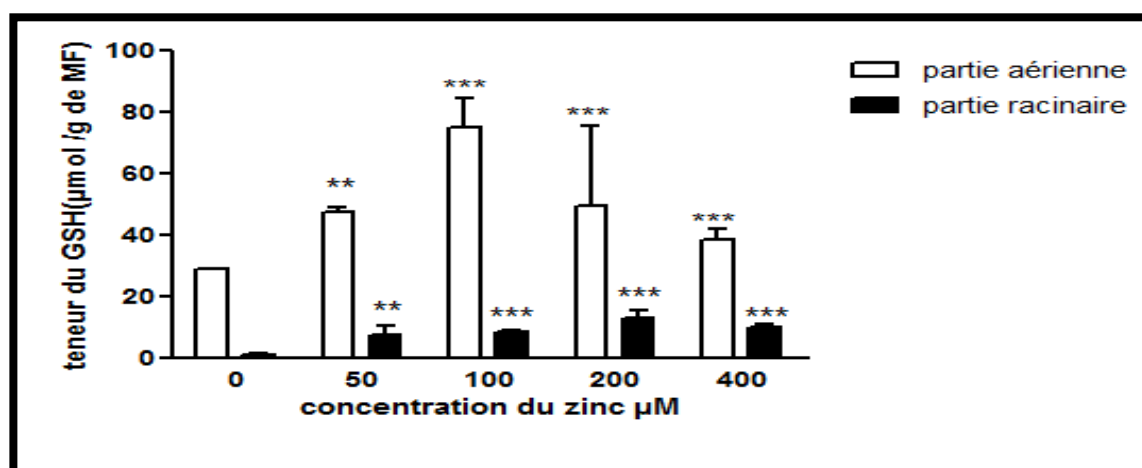
Chez les plantes, la classe tau des isoenzymes de la GST protège les cellules de la toxicité des métaux en catalysant la conjugaison du GSH avec les métaux pour une séquestration vacuolaire ultérieure (Dixon et al., 2002; Moons, 2003). 40 à 61 des isoenzymes de la GST sont de la classe tau. Elles sont plus sensibles à l'exposition de métal que les autres sous-groupes de la GST (Soranzo et al., 2004; ZHANG et al., 2013).



En se basant sur ces informations et sur les travaux effectués par (Benhamdi et al., 2014), on soupçonne qu'à faible concentration en Zn et en l'absence du stress, toutes les isoenzymes de la GST sont actives, ce qui permet d'expliquer l'activité importante de la GST à 50 mM. Au-delà de cette concentration certaines isoenzymes deviennent inactives et ce ne sont que les GST de la classe tau qui vont s'exprimer et leur activité augmente avec l'augmentation du stress. Ce qui permet d'expliquer la diminution de l'activité de la GST à 100 mM pour les feuilles puis son augmentation.

### 4. Effet du Zn sur la teneur du glutathion

L'effet du Zn sur la teneur en GSH dans les parties aériennes et racinaires de *Phaseolus vulgaris L.* est présenté dans la figure 10 :



**Figure 10 :** Effet du Zn sur le taux du GSH dans les racines et les parties aériennes de *Phaseolus vulgaris L.* Les astérisques indiquent une différence significative par rapport aux plantes témoins (ns : non significative, \* : significative (P < 0.05), \*\* : très significative (P < 0.01), \*\*\* : hautement significative (P < 0.001)).

La figure 10 montre que la teneur en glutathion augmente dans les deux parties aériennes et racinaires des plantes en réponse à différentes concentrations en Zn. Elle atteint son maximum à 100 mM dans les feuilles et à 200 mM au niveau des racines.

Le glutathion (GSH) est un antioxydant non enzymatique très abondant dans les plantes. C'est un thiol de faible poids moléculaire. Il est impliqué dans la défense contre les radicaux, dans la biosynthèse de la phytochélatine (PC) et dans la résistance aux métaux en agissant comme chélateur direct (Mendoza-Cozatl and Moreno-Sanchez, 2006). Le GSH peut être synthétisé dans les plantes ou recyclé à partir de sa forme oxydée par l'intermédiaire de la GSH réductase (Apel and Hirt, 2004). Il participe au contrôle des niveaux du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à travers le

cycle ASA-GSH (Foyer and Noctor, 2005). Il peut également fonctionner directement comme un capteur de radicaux libres par réaction avec  $^1\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2^{\cdot-}$  et  $\cdot\text{OH}$  (Larson, 1988).

L'élévation de la concentration du GSH dans les deux parties de la plante (voir figure 10) est due à l'augmentation du Zn et des ROS. Elle peut être aussi due à une baisse de la capacité de défense des autres antioxydants (Gupta et al., 1991; Marrs, 1996) qui sera compensée par le glutathion.

La diminution de la teneur du glutathion à fortes concentrations en Zn peut être expliquée par la liaison directe du glutathion au métal (Barrameda-Medina et al., 2014). En effet les ETM sont caractérisés par leur forte affinité vis-à-vis des groupements thiols en formant des complexes avec ces entités chimiques (Viarengo, 1994; Viarengo and Nott, 1993). La synthèse de GSH en présence du zinc serait donc un mécanisme de protection dans lequel le métal se fixe aux groupements thiols du GSH, prévenant ainsi les dommages cellulaires. La baisse des niveaux de GSH pourrait également être attribuée à une utilisation accrue de ce dernier pour la régénération de l'ASA à partir du DHA ou bien pour la synthèse des phytochélatines (Hossain et al., 2012).

Nos résultats sur les teneurs élevées du GSH dans les parties aériennes concordent avec ceux de Wang et al., (2009). Ils ont constaté que les plantules de colza exposées à différentes concentrations de zinc présentent une forte concentration en glutathion dans les parties aériennes par rapport aux parties racinaires. La teneur importante de la GSH dans les parties supérieures pourrait suggérer que le niveau du stress est plus important au niveau des feuilles. Ceci est confirmé par le taux du MDA. Le taux élevé du GSH est peut être dû aussi à la concentration du Zn qui est plus importante au niveau des feuilles, mais cette dernière hypothèse doit être confirmée par le dosage du Zn dans les deux parties de la plante à différentes concentrations.

Conclusion

La pollution par les métaux lourds est un facteur majeur dans la dégradation de l'environnement. De part leur nature biopersistante, les métaux lourds causent des perturbations de l'écosystème, détériorent les sols, les eaux et s'accumulent dans les plantes via un transfert sol-plante. Ces métaux peuvent être transmis aux êtres humains et aux animaux via 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. Notre étude s'est intéressée à l'effet du Zn, à différentes concentrations dans le sol, sur la croissance et la réponse du système antioxydant de *Phaseolus vulgaris. L.*

Les résultats obtenus montrent qu'à faible teneur en Zn dans le sol, ce métal est considéré comme oligoélément qui améliore la croissance des plantes par rapport aux plantes témoins. Cependant une inhibition de la croissance, de l'élongation racinaire et aérienne, ainsi qu'une baisse de la masse fraîche, ont été observées à fortes concentrations. Mais les plantes continuent à survivre. Cela prouve qu'elles tolèrent des concentrations élevées en Zn dans le sol et dans leurs tissus.

A l'origine de cette tolérance élevée *Phaseolus vulgaris. L* prend en charge les ROS produits en présence du Zn par activation de son système de défense antioxydant. Ce qui permet de diminuer le stress oxydatif au niveau de ses tissus.

L'évaluation du niveau de la peroxydation lipidique (par le dosage du MDA), de l'activité de la Glutathion S-transférase et de la concentration du glutathion (GSH) montre que ces paramètres suivent l'augmentation de la concentration du Zn dans le sol. Ils sont plus forts dans les parties aériennes que dans les parties racinaires.

La concentration du MDA dans les deux parties de la plante présente une relation linéaire avec celle du zinc dans le sol. Cependant l'élévation du MDA dans les parties supérieures était plus significative que dans les parties racinaires. Ceci prouve que les feuilles sont plus stressées que les racines. Cela est probablement dû au fait que les feuilles contiennent, en plus des mitochondries et du peroxysome, les chloroplastes qui sont la principale source de production des ROS. Une autre hypothèse est qu'une grande partie du Zn est transloquée vers les parties aériennes de la plante, ce qui induit une forte production des ROS. Cela reste à confirmer par le dosage du Zn dans les deux parties de la plante. Les

résultats du MDA indiquent que ce dernier est un bon marqueur du stress oxydatif induit par le Zn.

Les résultats de l'activité de la GST montrent une forte similarité avec ceux du MDA. Plus la concentration du Zn dans le sol augmente, plus le stress est induit dans les plantes et plus la GST est activée pour lutter contre ce stress. L'activité de la GST est toujours plus importante au niveau des parties aériennes.

La variation de l'activité de la GST à partir de la concentration de 50 mM serait due à l'inactivation de certaines isoformes de la GST. Ces dernières ne réagissent pas au cours du stress métallique. Ce ne sont que les GST de la classe tau qui vont réagir et leur expression suit le niveau du stress métallique dans les plantes. Mais cette hypothèse doit être confirmée par des études ultérieures.

Le glutathion est le substrat de la GST. Il a une forte affinité avec les ETM. Sa teneur élevée dans les deux parties de *Phaseolus vulgaris. L.*, en réponse au Zn, est due à la synthèse du glutathion suite à une forte production des ROS. Sa diminution à de fortes concentrations est peut être le résultat de la liaison du GSH avec le Zn.

Dans le but d'expliquer le niveau des teneurs élevées des marqueurs étudiés dans les parties aériennes de *Phaseolus vulgaris. L.* et de comprendre son comportement vis-à-vis du Zn, il est préférable de compléter cette étude par la détermination des concentrations du Zn dans les deux parties de la plante et le sol utilisé.

Aussi pour expliquer les variations de la GST, il est indiqué dans ce cas d'extraire les GST de *Phaseolus vulgaris. L.* de chaque concentration par les méthodes chromatographiques, puis faire une électrophorèse monodimensionnelle afin de déterminer les isoenzymes surexprimées dans le cas de stress métallique.

# Références Bibliographiques

- Adriano, D.C., 2001. Introduction. Springer.
- Ahmad, P. (Ed.), 2014. Oxidative damage to plants: antioxidant networks and signaling. Academic Press, San Diego, CA.
- Alkorta, I., Hernández-Allica, J., Becerril, J.M., Amezaga, I., Albizu, I., Garbisu, C., 2004. Recent findings on the phytoremediation of soils contaminated with environmentally toxic heavy metals and metalloids such as zinc, cadmium, lead, and arsenic. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 3, 71–90.
- Aoun, M., 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.
- Apel, K., Hirt, H., 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol* 55, 373–399.
- Appenroth, K.-J., 2010. Definition of “heavy metals” and their role in biological systems, in: *Soil Heavy Metals*. Springer, pp. 19–29.
- Aravind, P., Prasad, M.N.V., 2003. Zinc alleviates cadmium-induced oxidative stress in *Ceratophyllum demersum* L.: a free floating freshwater macrophyte. *Plant Physiol. Biochem.* 41, 391–397.
- Arora, A., Sairam, R.K., Srivastava, G.C., 2002. Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Curr. Sci.-BANGALORE-* 82, 1227–1238.
- Asada, K., 2006a. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiol.* 141, 391–396.
- Asada, K., 2006b. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiol.* 141, 391–396.
- Baker, A.J., Walker, P.L., 1990. Ecophysiology of metal uptake by tolerant plants. *Heavy Met. Toler. Plants Evol. Asp.* 2, 155–165.
- Barrameda-Medina, Y., Montesinos-Pereira, D., Romero, L., Blasco, B., Ruiz, J.M., 2014. Role of GSH homeostasis under Zn toxicity in plants with different Zn tolerance. *Plant Sci.* 227, 110–121.
- Beckman, K.B., Ames, B.N., 1997. Oxidative decay of DNA. *J. Biol. Chem.* 272, 19633–19636.
- Behanzin, G.J., Adjou, E.S., Yessoufou, A.G., Ahoussi, E.D., Sezan, A., 2015. Effet des sels de métaux lourds (chlorure de Cobalt et chlorure de Mercure) sur l’activité des hépatocytes. *J. Appl. Biosci.* 83, 7499–7505.
- Benhamdi, A., Bentellis, A., Rached, O., Du Laing, G., Mechakra, A., 2014. Effects of Antimony and Arsenic on Antioxidant Enzyme Activities of Two Steppic Plant Species in an Old Antimony Mining Area. *Biol. Trace Elem. Res.* 158, 96–104.
- Blokhina, O., Fagerstedt, K.V., 2010. Reactive oxygen species and nitric oxide in plant mitochondria: origin and redundant regulatory systems. *Physiol. Plant.* 138, 447–462.
- Blokhina, O., Virolainen, E., Fagerstedt, K.V., 2003. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Ann. Bot.* 91, 179–194.
- Broadley, M.R., White, P.J., Hammond, J.P., Zelko, I., Lux, A., 2007. Zinc in plants. *New Phytol.* 173, 677–702.
- Callender, E., Lollar, B.S., 2003. *Treatise on Geochemistry*. Chap 9, 67–105.
- Cantú-Medellín, N., Olguín-Monroy, N.O., Méndez-Rodríguez, L.C., Zenteno-Savín, T., 2009. Antioxidant enzymes and heavy metal levels in tissues of the black chocolate clam *Megapitaria squalida* in Bahía de La Paz, Mexico. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 56, 60–66.

- Chaoui, A., Mazhoudi, S., Ghorbal, M.H., El Ferjani, E., 1997. Cadmium and zinc induction of lipid peroxidation and effects on antioxidant enzyme activities in bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Sci.* 127, 139–147.
- Clemens, S., 2006. Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. *Biochimie* 88, 1707–1719.
- Clemens, S., 2006. Evolution and function of phytochelatin synthases. *J. Plant Physiol.* 163, 319–332.
- Cooke, M.S., Evans, M.D., Dizdaroglu, M., Lunec, J., 2003. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J.* 17, 1195–1214.
- Dazy, M., Masfaraud, J.-F., Férard, J.-F., 2009. Induction of oxidative stress biomarkers associated with heavy metal stress in *Fontinalis antipyretica* Hedw. *Chemosphere* 75, 297–302.
- Dixon, D.P., Laphorn, A., Edwards, R., 2002. Plant glutathione transferases. *Genome Biol* 3, 3004–1.
- D'souza, R.M., Devaraj, V.R., 2012. Induction of oxidative stress and antioxidative mechanisms in hyacinth bean under zinc stress. *Afr. Crop Sci. J.* 20.
- Duruibe, J.O., Ogwuegbu, M.O.C., Ekwurugwu, J.N., others, 2007. Heavy metal pollution and human biotoxic effects. *Int J Phys Sci* 2, 112–118.
- Edreva, A., 2005. Generation and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts: a submolecular approach. *Agric. Ecosyst. Environ.* 106, 119–133.
- Ellman, G.L., 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* 82, 70–77.
- Emamverdian, A., Ding, Y., Mokhberdorran, F., Xie, Y., 2015. Heavy Metal Stress and Some Mechanisms of Plant Defense Response. *Sci. World J.* 2015, e756120. doi:10.1155/2015/756120
- Favier, A., 2003. Le stress oxydant. *Actual. Chim.* 108–15.
- Foy, C.D., 1988. Plant adaptation to acid, aluminum-toxic soils. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 19, 959–987.
- Foyer, C.H., Noctor, G., 2005. Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *Plant Cell* 17, 1866–1875.
- Foyer, C.H., Noctor, G., 2003. Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiol. Plant.* 119, 355–364.
- Gardès-Albert, M., Bonnefont-Rousselot, D., Abedinzadeh, Z., Jore, D., 2003. Espèces réactives de l'oxygène. *Mécanismes Biochim. L'Actualité Chim.* Novembre-Déc. 2003 91–96.
- Garty, J., Karary, Y., Harel, J., 1992. Effect of low pH, heavy metals and anions on chlorophyll degradation in the lichen *Ramalina duriaei* (De Not.) Bagl. *Environ. Exp. Bot.* 32, 229–241.
- Gechev, T.S., Van Breusegem, F., Stone, J.M., Denev, I., Laloi, C., 2006. Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death. *Bioessays* 28, 1091–1101.
- Gill, S.S., Tuteja, N., 2010a. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol. Biochem.* 48, 909–930. doi:10.1016/j.plaphy.2010.08.016
- Gill, S.S., Tuteja, N., 2010b. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol. Biochem.* 48, 909–930. doi:10.1016/j.plaphy.2010.08.016
- Guerinot, M.L., 2000. The ZIP family of metal transporters. *Biochim. Biophys. Acta BBA-Biomembr.* 1465, 190–198.



- Gupta, A.S., Alscher, R.G., McCune, D., 1991. Response of photosynthesis and cellular antioxidants to ozone in *Populus* leaves. *Plant Physiol.* 96, 650–655.
- Habig, W.H., Jakoby, W.B., 1981. Assays for differentiation of glutathione S-transferases. *Methods Enzymol.* 77, 398.
- Halliwell, B., 2007. Biochemistry of oxidative stress. *Biochem. Soc. Trans.* 35, 1147–1150.
- Halliwell, B., 2006. Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. *PLANT Physiol.* 141, 312–322. doi:10.1104/pp.106.077073
- Halušková, L., Valentovičová, K., Huttová, J., Mistrík, I., Tamás, L., 2009. Effect of abiotic stresses on glutathione peroxidase and glutathione S-transferase activity in barley root tips. *Plant Physiol. Biochem.* 47, 1069–1074.
- Herrero, E., Ros, J., Bellí, G., Cabiscol, E., 2008. Redox control and oxidative stress in yeast cells. *Biochim. Biophys. Acta BBA-Gen. Subj.* 1780, 1217–1235.
- Hippeli, S., Elstner, E.F., 1999. Transition metal ion-catalyzed oxygen activation during pathogenic processes. *FEBS Lett.* 443, 1–7.
- Horemans, N., Foyer, C.H., Potters, G., Asard, H., 2000. Ascorbate function and associated transport systems in plants. *Plant Physiol. Biochem.* 38, 531–540.
- Hossain, M.A., Piyatida, P., da Silva, J.A.T., Fujita, M., 2012. Molecular mechanism of heavy metal toxicity and tolerance in plants: central role of glutathione in detoxification of reactive oxygen species and methylglyoxal and in heavy metal chelation. *J. Bot.* 2012.
- Hosseini, Z., Poorakbar, L., 2013. Zinc toxicity on antioxidative response in (*Zea mays* L.) at two different pH. *J. Stress Physiol. Biochem.* 9, 66–73.
- Hu, Y., Ge, Y., Zhang, C., Ju, T., Cheng, W., 2009. Cadmium toxicity and translocation in rice seedlings are reduced by hydrogen peroxide pretreatment. *Plant Growth Regul.* 59, 51–61.
- Kabata-Pendias, A., 2011. Trace elements in soils and plants, 4th ed. ed. CRC Press, Boca Raton.
- Kabata-Pendias, A., Pendias, H., 2001. Trace elements in soils and plants.
- Karuppanapandian, T., Moon, J.-C., Kim, C., Manoharan, K., Kim, W., others, 2011. Reactive oxygen species in plants: their generation, signal transduction, and scavenging mechanisms.
- Kehrer, J.P., 2000. The Haber–Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology* 149, 43–50.
- Konings, A.W.T., Penninga, P., 1985. On the importance of the level of glutathione and the activity of the pentose phosphate pathway in heat sensitivity and thermotolerance. *Int. J. Radiat. Biol.* 48, 409–422.
- Kosugi, H., Kikugawa, K., 1985. Thiobarbituric acid reaction of aldehydes and oxidized lipids in glacial acetic acid. *Lipids* 20, 915–921.
- Krieger-Liszkay, A., 2005. Singlet oxygen production in photosynthesis. *J. Exp. Bot.* 56, 337–346. doi:10.1093/jxb/erh237
- Lappartient, A.G., Touraine, B., 1996. Demand-driven control of root ATP sulfurylase activity and SO<sub>2</sub>-uptake in intact canola (the role of phloem-translocated glutathione). *Plant Physiol.* 111, 147–157.
- Larson, R.A., 1988. The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry* 27, 969–978.
- Lee, J.-J., Jo, H.-J., Kong, K.-H., 2011. A plant-specific Tau class glutathione S-transferase from *Oryza sativa* having significant detoxification activity towards chloroacetanilide herbicides. *Bull Korean Chem Soc* 32, 3756–3759.
- Le Pennec, G., Le Pennec, M., 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. *Aquat. Toxicol.* 64, 131–142.

- Lichtenthaler, H.K., Miehe, J.A., 1997. Fluorescence imaging as a diagnostic tool for plant stress. *Trends Plant Sci.* 2, 316–320.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 265–275.
- Manoj, K., Padhy, P.K., 2013. Oxidative stress and heavy metals: an appraisal with reference to environmental biology. *Int Res J Biol Sci* 2, 91–101.
- Marcato, C.-E., 2007. Origine, devenir et impact du cuivre et du zinc des lisiers porcins. Rôle de la digestion anaérobie.
- Marrs, K.A., 1996. The functions and regulation of glutathione S-transferases in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 47, 127–158.
- Mendoza-Cozatl, D.G., Moreno-Sanchez, R., 2006. Control of glutathione and phytochelatin synthesis under cadmium stress. *Pathway modeling for plants. J. Theor. Biol.* 238, 919–936.
- Michel, F., Bonnefont-Rousselot, D., Mas, E., Drai, J., Théron, P., 2008. Biomarqueurs de la peroxydation lipidique: aspects analytiques. Presented at the *Annales de Biologie Clinique*, pp. 605–620.
- Mittler, R., 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 7, 405–410.
- Mohsenzadeh, S., Saffari, B., Mohabatkar, H., 2009. A new member of Tau-class glutathione S-transferase from barley leaves. *EXCLI J.* 8, 190–194.
- Møller, I.M., 2001. Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. *Annu. Rev. Plant Biol.* 52, 561–591.
- Møller, I.M., Jensen, P.E., Hansson, A., 2007. Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annu Rev Plant Biol* 58, 459–481.
- Moons, A., 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 Lett.* 553, 427–432.
- Munne-Bosch, S., 2005. The role of  $\alpha$ -tocopherol in plant stress tolerance. *J. Plant Physiol.* 162, 743–748.
- Niedernhofer, L.J., Daniels, J.S., Rouzer, C.A., Greene, R.E., Marnett, L.J., 2003. Malondialdehyde, a product of lipid peroxidation, is mutagenic in human cells. *J. Biol. Chem.* 278, 31426–31433.
- Nieman, R.H., 1965. Expansion of bean leaves and its suppression by salinity. *Plant Physiol.* 40, 156.
- Noctor, G., Gomez, L., Vanacker, H., Foyer, C.H., 2002. Interactions between biosynthesis, compartmentation and transport in the control of glutathione homeostasis and signalling. *J. Exp. Bot.* 53, 1283–1304.
- Nriagu, J.O., 1979. Global inventory of natural and anthropogenic emissions of trace metals to the atmosphere.
- Perl-Treves, R., Perl, A., 2002. 1 Oxidative Stress: An Introduction. *Oxidative Stress Plants* 1.
- Pourrut, B., 2008. Implication du stress oxydatif dans la toxicité du plomb sur une plante modèle, *Vicia faba*.
- Racchi, M., 2013. Antioxidant Defenses in Plants with Attention to *Prunus* and *Citrus* spp. *Antioxidants* 2, 340–369. doi:10.3390/antiox2040340
- Rao, A.C., Reddy, A.R., 2008. Glutathione reductase: a putative redox regulatory system in plant cells, in: *Sulfur Assimilation and Abiotic Stress in Plants*. Springer, pp. 111–147.
- Rau, S., Miersch, J., Neumann, D., Weber, E., Krauss, G.-J., 2007. Biochemical responses of the aquatic moss *Fontinalis antipyretica* to Cd, Cu, Pb and Zn determined by chlorophyll fluorescence and protein levels. *Environ. Exp. Bot.* 59, 299–306.

- Richardson, G.M., Garrett, R., Mitchell, I., Mah-Poulson, M., Hackbarth, T., 2001. Critical review on natural global and regional emissions of six trace metals to the atmosphere. *Prep. Int. Lead Zinc Res. Organ. Int. Copp. Assoc. Nickel Prod. Environ. Res. Assoc.*
- Romanowska, E., 2002. Gas exchange functions in heavy metal stressed plants, in: *Physiology and Biochemistry of Metal Toxicity and Tolerance in Plants*. Springer, pp. 257–285.
- Rout, G.R., Das, P., 2009. Effect of metal toxicity on plant growth and metabolism: I. Zinc, in: *Sustainable Agriculture*. Springer, pp. 873–884.
- Sadeghzadeh, B., 2013. A review of zinc nutrition and plant breeding. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* 0–0. doi:10.4067/S0718-95162013005000072
- Shahid, M., Pourrut, B., Dumat, C., Nadeem, M., Aslam, M., Pinelli, E., 2014. Heavy-metal-induced reactive oxygen species: phytotoxicity and physicochemical changes in plants, in: *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Volume 232*. Springer, pp. 1–44.
- Sharma, P., Jha, A.B., Dubey, R.S., Pessarakli, M., 2012. Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. *J. Bot.* 2012, 1–26. doi:10.1155/2012/217037
- Sharma, S.S., Dietz, K.-J., 2009. The relationship between metal toxicity and cellular redox imbalance. *Trends Plant Sci.* 14, 43–50.
- Sheehan, D., MEADE, G., Foley, V., Dowd, C., 2001. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem J* 360, 1–16.
- Siritantikorn, A., Johansson, K., Åhlen, K., Rinaldi, R., Suthiphongchai, T., Wilairat, P., Morgenstern, R., 2007. Protection of cells from oxidative stress by microsomal glutathione transferase 1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 355, 592–596.
- Sisein, E.A., 2014. Biochemistry of free fadicals and antioxidants. *Sch Acad J Biosci* 2, 110–118.
- Smirnoff, N., 2000. Ascorbic acid: metabolism and functions of a multi-facetted molecule. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3, 229–235. doi:10.1016/S1369-5266(00)80070-9
- Sobkowiak, R., Deckert, J., 2003. Cadmium-induced changes in growth and cell cycle gene expression in suspension-culture cells of soybean. *Plant Physiol. Biochem.* 41, 767–772.
- Soranzo, N., Gorla, M.S., Mizzi, L., De Toma, G., Frova, C., 2004. Organisation and structural evolution of the rice glutathione S-transferase gene family. *Mol. Genet. Genomics* 271, 511–521.
- Stadtman, E.R., Levine, R.L., 2000. Protein oxidation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 899, 191–208.
- Tan, K.H., Meyer, D.J., Coles, B., Ketterer, B., 1986. Thymine hydroperoxide, a substrate for rat Se-dependent glutathione peroxidase and glutathione transferase isoenzymes. *FEBS Lett.* 207, 231–233.
- Tsonev, T., Lidon, F.J.C., 2012. Zinc in plants-An overview. *Emir. J. Food Agric.* 24.
- Vaillant, N., Monnet, F., Hitmi, A., Sallanon, H., Coudret, A., 2005. Comparative study of responses in four *Datura* species to a zinc stress. *Chemosphere* 59, 1005–1013.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T., Mazur, M., Telser, J., 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39, 44–84.
- Vamerli, T., Bandiera, M., Mosca, G., 2010. Field crops for phytoremediation of metal-contaminated land. A review. *Environ. Chem. Lett.* 8, 1–17.
- Vellosillo, T., Vicente, J., Kulasekaran, S., Hamberg, M., Castresana, C., 2010. Emerging complexity in reactive oxygen species production and signaling during the response of plants to pathogens. *Plant Physiol.* 154, 444–448.

- Viarengo, A., 1994. Heavy metal cytotoxicity in marine organisms: effects on Ca<sup>2+</sup> homeostasis and possible alteration of signal transduction pathways, in: *Advances in Comparative and Environmental Physiology*. Springer, pp. 85–110.
- Viarengo, A., Nott, J.A., 1993. Mechanisms of heavy metal cation homeostasis in marine invertebrates. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Comp. Pharmacol.* 104, 355–372.
- Vijayarangan, P., Mahalakshmi, G., 2013. Zinc toxicity in tomato plants. *World Appl. Sci. J.* 24, 649–653.
- Wang, C., Zhang, S.H., Wang, P.F., Hou, J., Zhang, W.J., Li, W., Lin, Z.P., 2009. The effect of excess Zn on mineral nutrition and antioxidative response in rapeseed seedlings. *Chemosphere* 75, 1468–1476.
- Wang, L.K., Chen, J.P., Hung, Y.-T., Shammash, N.K., 2009. *Heavy Metals in the Environment*. CRC Press.
- Wingate, V.P., Lawton, M.A., Lamb, C.J., 1988. Glutathione causes a massive and selective induction of plant defense genes. *Plant Physiol.* 87, 206–210.
- Wintz, H., Fox, T., Wu, Y.-Y., Feng, V., Chen, W., Chang, H.-S., Zhu, T., Vulpe, C., 2003. Expression profiles of *Arabidopsis thaliana* in mineral deficiencies reveal novel transporters involved in metal homeostasis. *J. Biol. Chem.* 278, 47644–47653.
- Wong, C.M., Cheema, A.K., Zhang, L., Suzuki, Y.J., 2008. Protein carbonylation as a novel mechanism in redox signaling. *Circ. Res.* 102, 310–318.
- Xiang, C., Werner, B.L., E'Lise, M.C., Oliver, D.J., 2001. The biological functions of glutathione revisited in *Arabidopsis* transgenic plants with altered glutathione levels. *Plant Physiol.* 126, 564–574.
- ZHANG, C., WU, Z., Ting, J.U., Ying, G.E., 2013. Purification and identification of glutathione S-transferase in rice root under cadmium stress. *Rice Sci.* 20, 173–178.

# Annexes

### Annexe 1 : Préparation des différentes concentrations du Zn

- Préparer une solution mère de (800mM) en faisant dissoudre 4g de  $Zn\ So_4\ 7H_2O$  dans 100 ml d'eau distillée.

- Préparer les différentes concentrations du Zn : 50,100, 200 et 400 mM à partir de la solution mère du Zn (voir tableau ci-dessous).

**Tableau : préparation des solutions du zinc**

Dilution	800 mM	400 mM	200 mM	100 mM	50 mM	0 mM
Solution mère (ml)	100	50	25	12.5	6.25	0
Eau distillé (ml)	0	50	75	87.5	93.75	100

Le pH de toutes ces solutions est ajusté à 4.5 en utilisant le Hcl à 1 mM.

## Annexe 2 : La courbe d'étalonnage de la BSA

### A. Composition de la solution mère (M)

- La solution(A) : Carbonate de sodium (2%) dissous dans le Na OH (0.1N).
- La solution (B) : Sulfate de cuivre (0.5%) dans l'eau distillée.
- La 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.

**Préparer :**

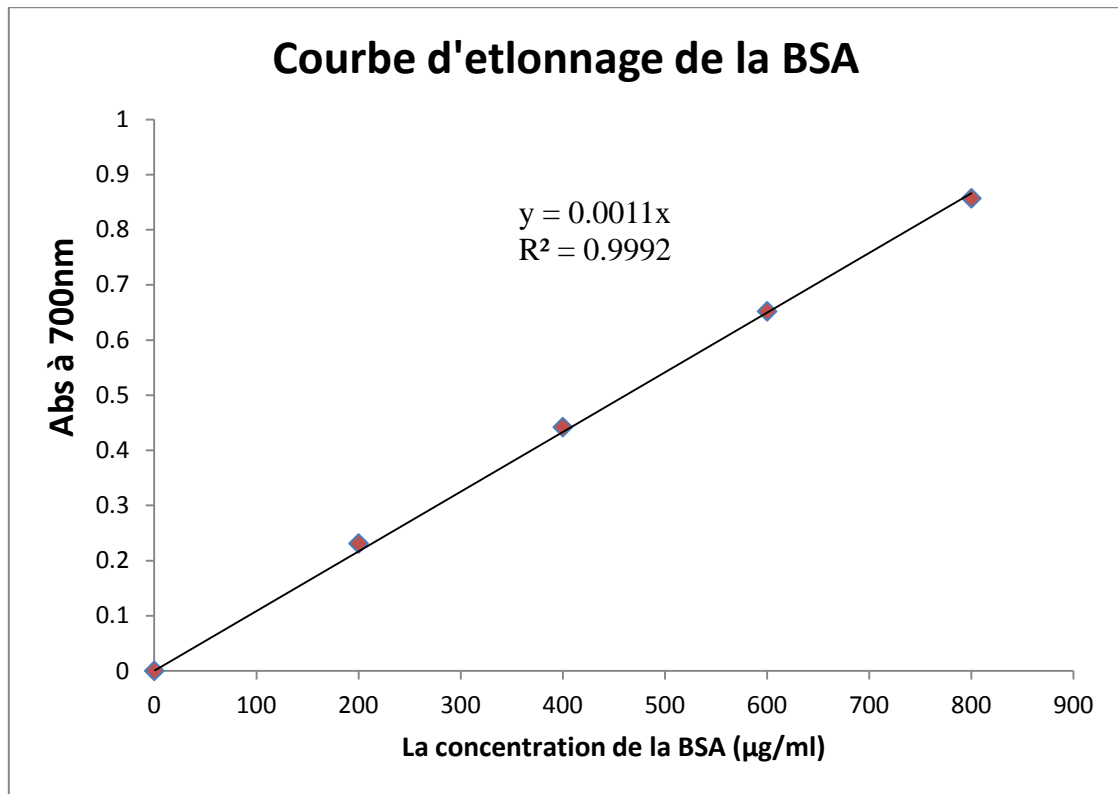
- **une solution mère de la BSA avec une concentration de 1000 µg/ml dans l'eau distillée.**
- **Puis une série de dilution de la BSA de 0 à 1000 µg/ml (voir tableau ci-dessous).**

**Tableau 04 : Préparation des séries de dilution de la BSA**

	Blanc	1 /5	2 /5	3/5	4 /5	5/5
BSA (µL)	0	200	400	600	800	1000
Eau distillée (µl)	1000	800	600	400	200	0

### D. Composition du mélange réactionnel et déroulement de la réaction.

- 2ml de la solution M.
- 200µl de BSA (200µl d'eau distillée pour le blanc).
- 200µl 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. Traçage de la courbe d'étalonnage**



### Annexe 3 : La courbe d'étalonnage du glutathion

#### 1. Préparation des solutions

- Tampon phosphate à pH 8.
- Tampon phosphate à pH 7.2.
- Acide 5- Sulfosalicylic (SSA) à 2% (préparé dans l'eau distillée).

#### 2. Préparation du réactif d'ELLMAN (DTNB)

- DTNB (10 mM) dissous dans le tampon phosphate 7,2.

#### 3. Préparation de la solution mère du Glutathion et des séries de dilution

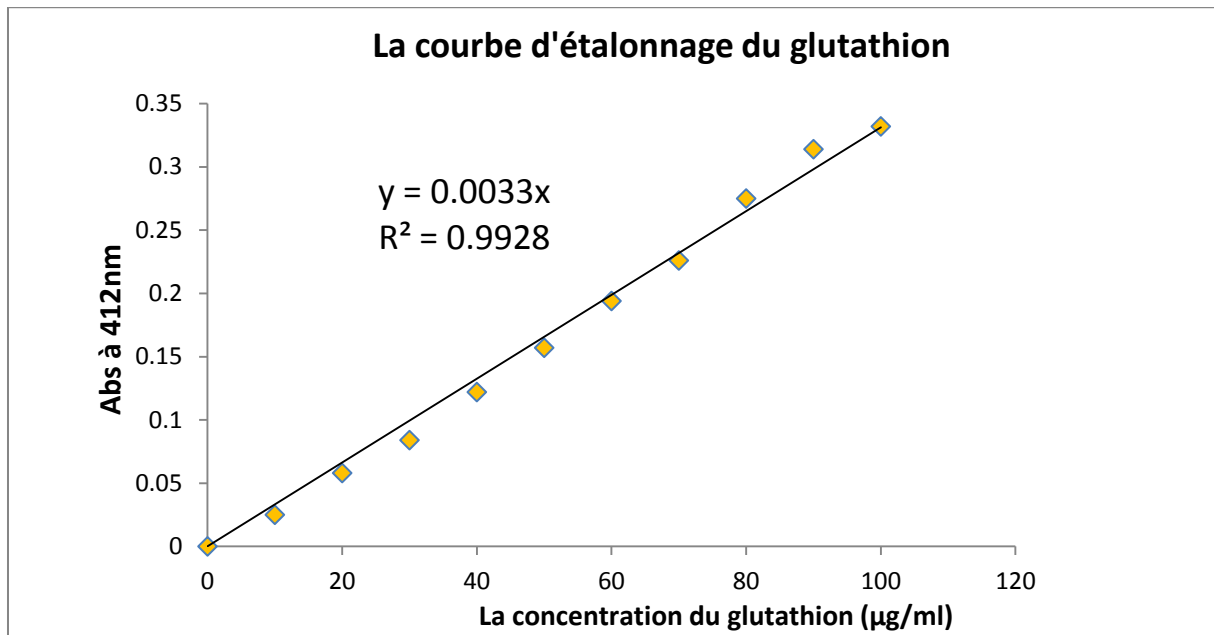
- Glutathion dissous dans SSA 2% (100µg/ml) à partir de 1 mg/10 ml.

**Tableau : Préparation des séries de dilution du glutathion**

	Blanc	1/10	2/10	3/10	4/10	5/10	6/10	7/10	8/10	9/10	10/10
SSA (µl)	1000	900	800	700	600	500	400	300	200	100	0
G/SSA (µl)	0	100	200	300	400	500	600	700	800	900	1000

#### D. Composition du mélange réactionnel et déroulement de la réaction.

- 250µl de la solution G/SSA.
- 2.5ml de la solution tampon phosphate pH 8.
- 70µl du réactif d'Ellman.
- Agitation et incubation de 30min.
- Lecture de l'absorbance à 412 nm.

**E. Traçage de la courbe d'étalonnage**

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

Cette étude vise à analyser l'impact du Zn, à différentes concentrations dans le sol, sur la croissance et le système de défense antioxydant des tissus de *Phaseolus vulgaris L.* Les paramètres évalués, dans les deux parties de la plante, sont la teneur du malondialdéhyde (MDA), l'activité de la glutathion S-transférase (GST) et la concentration en glutathion (GSH). La culture a été faite dans des pots. Le Zn a été ajouté sous forme de sulfate de zinc ( $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ) dans le sol avec différentes concentrations (50 mM, 100 mM, 200 mM et 400 mM) et à pH de 4,5.

Les résultats obtenus ont montré une inhibition de la croissance des plantes d'haricots, de l'élongation foliaire et racinaire et de la masse fraîche par rapport aux plantes témoins. Le niveau du MDA augmente avec l'élévation de la concentration de zinc dans les feuilles et les racines, mais il est plus important au niveau des feuilles, ce qui indique une peroxydation lipidique accrue.

L'activité de la GST diffère sensiblement selon les concentrations de métaux dans le sol, mais elle augmente généralement en réponse à des concentrations élevées du Zn dans le sol. Elle est globalement plus active dans les parties supérieures que dans les racines où le niveau du MDA est plus élevé.

La teneur en GSH augmente dans les plantes exposées à 50-100 mM dans les parties aériennes et racinaires, ce qui suggère que la synthèse du GSH a été activée. Tandis qu'elle a diminué à 200 et à 400 mM. Ceci est le résultat de la liaison du glutathion avec le Zn pour séquestrer le complexe formé au niveau des vacuoles.

Ces résultats soulignent le rôle important du système de défense antioxydant de *Phaseolus vulgaris.L* contre le stress oxydatif induit par le Zn. Ce système lui a permis de tolérer de fortes concentrations en Zn et de poursuivre sa croissance. Le MDA, la GST et le GSH sont des bons marqueurs du stress oxydatif chez *Phaseolus vulgaris.L*.

**Mots clés :** *Phaseolus vulgaris.L*, Zinc, stress oxydatif, MDA, GSH, GST

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 at different concentrations in soil, on the growth and the antioxidant defense system of *Phaseolus vulgaris* L. tissue. The parameters evaluated in the two parts of the plant, are the content of malondialdehyde, the activity of glutathione S-transferase (GST) and glutathione concentration (GSH). The culture was made in pots. The Zn was added in the form of zinc sulphate ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) into the ground with different concentrations (50 mM, 100 mM, 200 mM and 400 mM) and pH of 4.5.

The results showed inhibition of the growth of plants beans, leaf and root elongation and fresh mass compared to control plants. The level of MDA increased with the rise of the concentration of zinc in the leaves and roots, but it is more important in leaves, indicating increased lipid peroxidation.

The activity of antioxidant enzyme (GST) differs significantly according to the soil metal concentrations, but it usually increases in response to high concentrations of Zn in soil. GST is overall more active in the upper parts than in the roots where the level of MDA is higher.

GSH content increased in plants exposed to 50–100 mM in both roots and leaves suggesting that the GSH synthesis was activated. while it decreased at 200-400mM. This is the result of binding glutathione with Zn to sequester the complex formed at vacuoles.

These results underline the important role of *Phaseolus vulgaris*.L antioxidant defense system against oxidative stress induced by Zn. This system has enabled it to tolerate high concentrations of Zn and keep growing. MDA, GST and GSH are good markers of oxidative stress in *Phaseolus vulgaris*.L.

**Keywords:** *Phaseolus vulgaris*.L, Zinc, oxidative stress, MDA, GSH, GST.

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

لقد هدفت هذه الدراسة إلى تحليل آثار الزنك بدرجات تركيز متنوعة في الأرض على كل من نمو ونظام الدفاع المضاد للأكسدة لأنسجة *Phaseolus vulgaris*. ولهذا الغرض فقد شملت معايير التقييم في الجزء العلوي والسفلي للنبات على كل من: المحتوى من *malondialdehyde*، نشاط *S-glutathion* (*GST transférase*) وتركيز *glutathion*، وقد تم الغرس في أوعية صغيرة أين تم إضافة كبريتات الزنك ( $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ) بدرجات تركيز متغيرة (50 mM, 100 mM, 200 mM, 400 mM) ومعدل حموضة  $pH (4,5)$ .

لقد أظهرت نتائج الدراسة فشل في نمو بذور الفاصوليا، قصر الأوراق والجذور وانخفاض في الوزن الحي للنبات مقارنة بالنباتة الشاهد. وفي نفس الوقت فقد تم ملاحظة أن مستوى MDA يرتفع بارتفاع مستوى تركيز الزنك في الأوراق والجذور لكن بنسبة أكبر في الأوراق الأمر الذي يدل على زيادة في فوق أكسدة الليبيدات مقارنة بالشاهد.

من جهة أخرى فقد أظهرت النتائج أيضا أن نشاط إنزيم GST يختلف نسبيا حسب درجات تركيز المعادن في التربة وبشكل عام يزيد هذا النشاط كلما كان تركيز الزنك أعلى في الأرض، كما نجد أن إنزيم GST يكون أكثر فعالية في الأجزاء العلوية منه في الجذور.

زيادة كميات GSH المحتواة في النباتات المعرضة لـ 50-100 Mm في كل من الأجزاء العلوية والسفلية مما يشير إلى انطلاق عملية تركيب GSH، في حين نجد أن كميات GSH قد انخفضت في النباتات المعرضة لـ 200-400m ، وهذا راجع إلى الارتباط الحاصل بين الزنك و *glutathion* من أجل عزل المركب الذي تشكل على مستوى الفجوات.

في الأخير فإن هذه النتائج تؤكد على الدور الهام الذي يلعبه نظام الدفاع المضاد للأكسدة عند *Phaseolus vulgaris.L* ضد الأكسدة التي تسببها تركيزات عالية من الزنك في التربة ، فقد سمح هذا النظام الدفاعي للنباتة من تحمل مستويات تركيز عالية من الزنك ومتابعة نموها.

الكلمات المفتاحية : *Phaseolus vulgaris.L*، الزنك، الأكسدة، MDA, GSH, GST

