



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

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

جامعة الإخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة والحياة

Département de Biochimie et Biologie

قسم الكيمياء الحيوية والبيولوجيا

Cellulaire et Moléculaire

الخلوية والجزيئية

Mémoire présenté en vue de l'obtention de Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : *Biochimie Moléculaire et Santé*

Intitulé :

Lens culinaris est-elle une plante modèle pour la phytoremédiation?
Détermination du niveau d'accumulation du Zn et du statut oxydatif de la
plante.

Préparé et soutenu par :

Le : 04 /07/2016

BOUMISSA Zineb.

CHELOUCHE Somia.

Jury d'évaluation :

Présidente du jury :

Mme CHENTLI A.

MCB- UFM Constantine

Encadreur :

Mme BENHAMDI A.

MCB- UFM Constantine

Examinatrice :

Mme BENCHIHEUB M.

MCB- UFM Constantine

Examinatrice :

Mme CHERFIA.R

MAB- UFM Constantine

Année universitaire : 2015 – 2016

Remerciements

*Nous remercions en premier lieu **ALLAH** le tout puissant de nous avoir donné la santé, la patience, la puissance et la volonté pour réaliser ce mémoire.*

*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 tenons à remercier sincèrement **Mme A. Mechakra** qui nous a donné la possibilité de réaliser ce travail au sein du laboratoire de Biologie et Environnement.*

*Nous exprimons notre profonde et respectueuse gratitude à **Mme CHENTLI A.**, Docteur 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 **Mme BENCHICHEUB M.**, MCB et **Mme CHERFIA R.**, MAB à l'université des Frères Mentouri de Constantine, pour l'honneur qu'elles nous ont fait en acceptant d'examiner ce travail et de participer au jury.*

Nous adressons nos remerciements les plus sincères aux personnes qui nous ont apporté leur aide et qui ont contribué à l'élaboration de ce mémoire surtout les membres du laboratoire de biochimie et de Biologie et Environnement.



Dédicaces

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

*Je dédie ce modeste travail à ceux qui partagent et embellissent ma vie depuis ma naissance dont le travail n'aurait pu aboutir sans leur inépuisable soutien et encouragements. Merci de m'avoir poussée et encouragée à aller au-delà de mes capacités. Merci pour le réconfort, les bons moments et l'amour qu'ils m'offrent chaque jour, une très grande gratitude donc à mon père **Ali** et ma mère **Ghania**, qu'ils trouvent dans la réalisation de ce travail, l'aboutissement de leurs efforts ainsi que l'expression de ma plus affectueuse gratitude.*

Je tiens également à remercier mes frères : Nasreldin, Brahim, Abdel Aziz et surtout Aymen.

A mes adorables sœurs : Amira et Zahra.

A tous ma famille : CHELOUCHE et OUNIS

A mon binôme : BOUMISSA Zineb.

A mes chers collègues de la promotion 2016BMS et surtout Samira, Amira, Sara, Meriem et Ishak,

A toute personne qui me connaît

CHELOUCHE Somia

Dédicaces



Merci Allah (mon dieu) de m'avoir donné la capacité d'écrire et de réfléchir.

Celle qui m'a donné la vie, le symbole de tendresse, qui s'est sacrifiée pour mon bonheur et ma réussite, mes très chers parents : AHMED et GUERMIA qui ont été la pour moi, et qui m'ont donné un magnifique modèle de labeur et de persévérance.

J'espère qu'ils trouveront dans ce travail toute ma reconnaissance et tout mon amour.

Mes adorables sœurs : CHAFIA, LAMIA, NADJET, AMINA et MERYEM

Mon chère frères : AMMAR

Mes nièces et mes neveux

Pour toutes mes cousins

Ma famille

Mon binôme : Somia

Mes amis intimes : Amira, Samira, Meryem et Sara

Tous mes amis de la promotion BMS

Ceux qui me sont chères

Tous ceux qui m'aiment

Tous ceux que j'aime

A tous qui nous ont aidés à réaliser notre mémoire.

BOUMISSA ZINEB



Table des matières

Liste des abréviations.....	i
Liste des figures.....	ii
Liste des tableaux.....	iii

Introduction.....	1
-------------------	---

CHAPITRE 1 : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

1. La pollution par les métaux lourds.....	3
1.1. Les métaux lourds.....	3
1.2. La pollution par les métaux lourds.....	3
1.3. Effets des métaux lourds sur les plantes et toxicité.....	3
1.4. Réponse des plantes à la toxicité par les métaux.....	4
1.5. Phytoremédiation.....	4
2. Le Zinc.....	5
2.1. Définition.....	5
2.2. Rôle du zinc dans les processus biologiques chez les plantes.....	5
2.3. Mécanisme de l'absorption du zinc par les plantes.....	5
a) Absorption du zinc.....	5
b) Translocation du zinc.....	7
c) Migration et accumulation du zinc dans la plante.....	7
2.4. Phytotoxicité du zinc.....	7
3. Les radicaux libres et le stress oxydatif.....	7
3.1. Définition des radicaux libres.....	8
3.2. Les espèces réactives de l'oxygène.....	8
3.2.1. Origine endogène.....	8
3.2.2. Origine exogène.....	8
3.3. Cibles des ERO et leurs effets sur les plantes.....	9
3.4. Le stress oxydatif.....	9
3.4.1. Les conséquences du stress oxydant.....	9
3.4.1.1. La peroxydation lipidique.....	10
3.4.1.2. L'oxydation de l'ADN.....	11
3.4.1.3. Altérations de la structure des protéines.....	11
4. Les antioxydants.....	12
4.1. Définition.....	12
4.2. Les différentes sources des antioxydants.....	13
4.3. Le système antioxydant enzymatique.....	13
4.3.1. Les superoxydes dismutases (SOD).....	13
4.3.2. La catalase (CAT).....	14
4.3.3. La glutathion peroxydase (GPx).....	14
4.4. Les antioxydants non enzymatiques.....	14
4.4.1. La vitamine C.....	14
4.4.2. La vitamine E.....	15
4.4.3. β -carotène.....	15
4.4.4. Le glutathion.....	15
4.4.5. Les oligoéléments.....	15
4.4.6. Polyphénols.....	15

CHAPITRE 2 : MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Culture <i>in vitro</i> des graines des lentilles.....	16
1.1. Matériel végétal	16
1.2. Préparation du milieu.....	16
1.3. Préparation de la plante.....	16
1.4. Choix des concentrations du Zn.....	16
1.5. Germination des graines.....	16
2. Dosage du Zn.....	17
2.1. Extraction du Zn.....	17
2.2. Dosage du Zn.....	17
3. Méthodes de dosage biochimique.....	18
3.1. Préparation de l'extrait brut.....	18
3.2. Dosage des protéines.....	18
3.3. Dosage du malondialdéhyde (MDA).....	18
3.4. Dosage de la peroxydase (POD).....	19
3.5. Dosage de la glutathion peroxydase (GPx).....	20
4. Analyse statistique.....	21

CHAPITRE 3 : RÉSULTATS ET DISCUSSION

1. Effet du Zinc sur la croissance de <i>Lens culinaris</i>.....	22
2. Teneur du Zinc dans les deux parties de <i>Lens culinaris</i>	24
3. Effet du Zinc sur la teneur des protéines.....	25
4. Effet du Zinc sur la teneur du MDA (malondialdéhyde).....	26
5. Effet du Zinc sur l'activité de la peroxydase.....	27
6. Effet du Zinc sur l'activité de la glutathion peroxydase (GPx).....	29
CONCLUSION.....	30
Références bibliographiques.....	32
Annexes	
Résumés	

Liste des abréviations

- 4-HNE** : 4-hydroxynonéal.
- AGPI** : Acide gras polyinsaturé.
- AIA** : Acide Acétique Indole.
- DTNB** : Acide 5,5'-dithiobis 2-nitrobenzoïque.
- EC** : Enzyme de Commission.
- EDTA** : Acide éthylène-diamine-tétra acétique.
- ERO** : Espèces réactives de l'oxygène.
- GSH** : Glutathion réduit.
- GPx** : Glutathion peroxydase.
- GSSG** : Glutathion disulfure.
- HCl₄** : Acide perchlorique.
- HM** : Heavy Metals.
- HMA3** : Heavy Metals transporting ATPase 3.
- HMA4** : Heavy Metals transporting ATPase 4.
- HNO₃** : Acide nitrique.
- MDA** : Malondialdéhyde.
- MS** : Matière sèche.
- Mt**: Metallothioneine.
- MT2b**: Metallothioneine 2b.
- MTP**: Metal tolerance protein.
- PC**: Phytochélatine.
- POD**: Peroxydase.
- PVP**: Polyvinylpyrrolidone.
- ROS**: Reactive oxygen species.
- SH**: Groupement thiol.
- SOD**: Superoxyde dismutase.
- TBA** : Acide thiobarbiturique.
- TCA** : Acide trichloroacétique.
- TNB**: Acide thionitrobenzoïque.
- Zn**: Zinc.

Liste des figures

Figure 1 : Translocation des métaux lourds des racines vers les feuilles chez les plantes hyper accumulatrices.....	6
Figure 2 : Les différentes cibles des espèces réactives de l'oxygène.....	9
Figure 3 : Lésions de l'ADN suite à un stress oxydant.....	11
Figure 4 : Modifications des chaînes latérales des acides aminés composant les protéines après attaque radicalaire.....	12
Figure 5 : Les molécules intervenant dans la protection cellulaire.....	13
Figure 6 : Structure du glutathion.....	15
Figure 7 : Effet du Zn sur la croissance des plantules de <i>Lens culinaris</i> après 6 jours.....	22
Figure 8 : Accumulation du zinc dans les deux parties de la plante.....	24
Figure 9 : Effet du Zn sur la teneur des protéines totales de <i>Lens culinaris</i>	25
Figure 10 : Evaluation du niveau du MDA dans les deux parties de <i>Lens culinaris</i>	26
Figure 11 : Activité de la POD au niveau des racines et des parties aériennes de <i>Lens culinaris</i> ..	27
Figure 12 : Activité de la GPx des racines et des parties aériennes de <i>Lens culinaris</i>	29

Liste des tableaux

Tableau 1 : Réaction de la peroxydation lipidique	10
--	----

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 il y a 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 essentiels 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) (Alloway, 1995).

Lorsque les plantes sont exposées à des niveaux élevés en métaux lourds, il y a induction des espèces réactives oxygénées (ROS), c'est-à-dire, des molécules contenant de l'oxygène produit dans les réactions d'oxydoréduction (Dowling et Simmons, 2009). La formation de ROS résulte du stress oxydatif qui crée un état de déséquilibre entre la défense antioxydante et la production des radicaux (Halliwell, 2007). Ces ROS peuvent causer des dommages oxydatifs aux membranes lipidiques, à l'ADN et aux protéines et leur oxydation peut conduire à un dysfonctionnement cellulaire (Hoffman *et al.*, 1998; Valavanidis *et al.*, 2006).

Pour empêcher ou contrôler la production des ROS, certaines plantes développent un système de défense antioxydant qui est à la fois composé de systèmes enzymatiques (catalase, superoxyde dismutase, peroxydase, glutathion réductase, glutathion S-transférase, glutathion peroxydase, etc...) et de systèmes non-enzymatiques (vitamines C et E, caroténoïdes, glutathion, etc...).

Afin de maintenir une bonne qualité des sols et des eaux et les maintenir éloignés d'une éventuelle contamination par les métaux lourds, des efforts continus ont été déployés pour développer des technologies faciles et économiques. Les approches physico-chimiques ont été largement utilisées pour la remédiation des sols et des eaux pollués. Cependant, les coûts élevés et les effets secondaires de ces techniques rendent ces approches inefficaces.

L'utilisation des espèces de plantes pour le nettoyage des eaux et des sols pollués, appelées phytoremédiation, a suscité un intérêt croissant depuis la décennie passée comme étant une technologie émergente rentable. Beaucoup d'études ont été entreprises dans ce domaine durant les deux dernières décennies. De nombreuses espèces de plantes ont été identifiées et examinées pour leurs caractéristiques dans l'absorption et l'accumulation de différents métaux lourds (McIntyre, 2003)

Le but de notre travail est de voir si les lentilles peuvent participer à la phytoremédiation des sols pollués par le Zn.

Pour cela nous avons évalué l'effet du zinc sur la croissance, l'accumulation et les réponses anti oxydantes de *Lens culinaris*. Cette évaluation est basée sur :

- la détermination des concentrations du zinc dans les deux parties de la plante.
- la quantification du niveau de la lipoperoxydation membranaire (déterminé par le dosage du malondialdéhyde « MDA »),
- le dosage des activités des enzymes antioxydantes (la peroxydase POD et la glutathion peroxydase GPx) dans les parties aérienne et racinaire.

Chapitre 1 :
Synthèse
bibliographique

1. La pollution par les métaux lourds

1.1. Les métaux lourds

Ce sont des éléments métalliques naturels d'une masse volumique dépassant 5 g/cm³. Ils sont présents le plus souvent sous forme de traces dans l'environnement (Arris, 2008). En fonction de leurs effets physiologiques et toxiques, on en distingue deux types : métaux essentiels et non essentiels.

➤ Les métaux essentiels sont des éléments indispensables à l'état de trace pour de nombreux processus cellulaires. Ils 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),... (Kabata-Pendias et Pendias, 2001).

➤ Les métaux non essentiels sont toxiques même à faible concentration. C'est le cas du plomb (Pb), du mercure (Hg), du cadmium (Cd),... (Blum, 1990).

1.2. La pollution par les métaux lourds

De nos jours, plusieurs activités humaines ont conduit à une augmentation de la pollution par les métaux lourds. Les domaines les plus polluants sont :

- L'agriculture et l'utilisation massive des engrais, des pesticides, de l'épandage des boues d'épuration, des lisiers... (Franklin et *al.*, 2005),

- L'industrie et ses rejets de poussières contenues dans les fumées émises ou ses rejets d'effluents gazeux ou liquides, ...

- L'urbanisation et ses décharges de déchets urbains, l'augmentation de la circulation automobile et de la combustion des sources d'énergie fossile, ... (Sezgin et *al.*, 2004).

1.3. Effets des métaux lourds sur les plantes et toxicité

Les métaux lourds sont dangereux pour l'environnement car ils ne sont pas dégradables. Ils s'accumulent au cours des processus minéraux et biologiques. Ils peuvent être absorbés directement par le biais de la chaîne alimentaire entraînant alors des effets toxiques.

Les symptômes de toxicité associés aux métaux lourds dépendent de leur mobilité à l'interface sol-plante et à l'intérieur de la plante, mobilité qui détermine la concentration endogène du métal (Aoun, 2008).

Les effets des métaux lourds les plus habituels consistent en une :

- Réduction de la croissance des différentes parties de la plante,
- Présence de chlorose due à une perte de chlorophylle, à une relative augmentation des caroténoïdes et à une déficience en fer,
- Apparition des tâches nécrotiques,

- Abaissement de la photosynthèse,
- Compétition avec d'autres cations pour des sites de liaison de la paroi pecto-cellulosique des cellules racinaires,
- Inhibition ou stimulation de l'absorption des cations, causant des changements significatifs au niveau du métabolisme cellulaire (Aoun, 2008).

1.4. Réponse des plantes à la toxicité par les métaux

Afin de prévenir ou de contrer les effets toxiques des métaux, les plantes mettent en place des stratégies de défense. Les stratégies menant à la détoxification ou à la tolérance des métaux chez les plantes comprennent :

- le restriction du mouvement des métaux par les mycorhizes ;
- l'attachement des métaux à la membrane cellulaire ou aux exsudats racinaires ;
- la réduction de l'influx au niveau de la membrane plasmique (l'efflux actif provenant de l'apoplaste) ;
- la présence d'agents chélateurs dans le cytosol ;
- la réparation active de la membrane plasmique en conditions de stress ;
- le transport des complexes métalliques (ex : phytochélatines) vers les vacuoles ;
- le transport et l'accumulation des métaux dans les vacuoles (Bélangier, 2009).

1.5. Phytoremédiation

La phytoremédiation est une technologie naissante qui utilise les plantes et les microorganismes associés de la rhizosphère (Susarla, Medina, et McCutcheon, 2002). Pour abaisser la concentration ou changer la biodisponibilité des produits chimiques toxiques situés dans les sols (Cornejo et *al.*, 1999), les eaux de surface de souterraines et même dans l'atmosphère.

Actuellement, elle est employée pour traiter de nombreuses catégories de contamination, y compris les hydrocarbures pétroliers, les solvants chlorés, les pesticides et les métaux lourds (Susarla, Medina, et McCutcheon, 2002). Cette technique est considérée comme une remédiation naturelle assistée qui joue un rôle important dans la restauration des propriétés physiques, chimiques et biologiques des sols contaminés (Clemens, Palmgren, et Krämer, 2002).

2. Le zinc

2.1. Définition

Le zinc est un élément chimique, de symbole Zn, de numéro atomique 30. C'est le 24^{ème} élément le plus abondant dans la croûte terrestre car il constitue à peu près 0,004 % (Browning et *al.*, 1961). La forme minérale la plus commune du zinc est la sphalérite (ZnS) (Pories et *al.*, 1976). Le zinc se rencontre aussi sous forme de calamine (ZnCO₃). Les autres formes du zinc sont des produits d'oxydation de la sphalérite (Hem, 1985).

2.2. Rôle du zinc dans les processus biologiques chez les plantes

Il est connu que le zinc entre dans la synthèse du tryptophane, lui-même nécessaire à la formation de l'acide acétique indole (AIA) chez les plantes. L'acide acétique indole est l'une des auxines responsable de l'allongement et de la division cellulaires.

La baisse des teneurs en AIA dans une plante carencée en zinc explique les symptômes d'arrêt de croissance et de faible élongation des feuilles (Vaughan, DeKock, et Ord, 1982; Sanders et *al.*, 1983).

C'est un composé essentiel de plusieurs métallo-enzymes chez les plantes (de la classe des déshydrogénases). Il est donc indispensable à plusieurs fonctions différentes du métabolisme des plantes. L'enzyme anhydrase hypergypsique est activée spécifiquement par le zinc.

Le zinc joue un rôle important dans la synthèse de l'ARN ainsi que dans la synthèse des protéines.

2.3. Mécanisme de l'absorption du zinc par les plantes

La fixation du zinc par les plantes se fait en plusieurs étapes :

a) Absorption du zinc : L'absorption du zinc à partir du sol se fait, à travers la membrane plasmique des racines, grâce à des transporteurs spécifiques qui sont les protéines de transport de la famille ZIP. Ils sont responsables du transport des Zn, Cd et Mn. L'absorption est en grande partie sous contrôle métabolique. Le phosphore, le fer et le cuivre peuvent entrer en compétition avec le zinc dans les processus d'absorption et du transfert (Yang et *al.*, 2005).

b) Translocation du zinc : 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, par circulation de la sève brute (Marcato, 2007).

Certaines plantes non hyper accumulatrices séquestrent les métaux dans les vacuoles des racines grâce aux transporteurs MTP (Metal Tolerance protein). Ces métaux sont liés aux acides organiques et aux phytochélatines (Zhao et McGrath, 2009).

D'autres plantes hyper accumulatrices transloquent les métaux vers les tiges via le xylème (voir figure 1). Cette translocation se fait par différents transporteurs membranaires : HMA4 et MT2b pour le Zn et le Cd, FDR3 pour le Zn, YSL pour le complexe HM-NA et NIP pour l'AS(III), etc (Grispen et al., 2011).

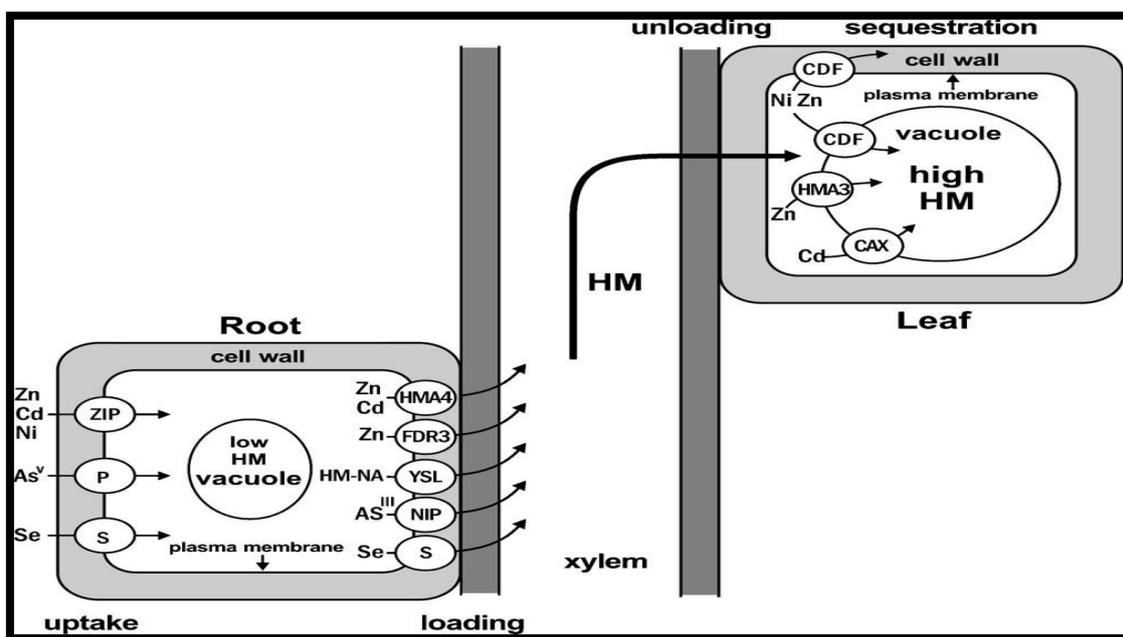


Figure 1 : Translocation des métaux lourds des racines vers les feuilles chez les plantes hyper accumulatrices (Rascio et Navari-Izzo, 2011). La translocation se fait grâce à différents transporteurs : CAX = cation exchangers ; CDF = Cation Diffusion Facilitators ; FDR3= a member of the Multidrug and Toxin Efflux family ; HM = Heavy Metals ; HMA= Heavy Metal transporting ATPases ; NA= Nicotinamine ; NIP= Nodulin 26-like IntrinsicProteins ; P= Phosphate transporters ; S= Sulphatetransporters ; YSL= YellowStrip 1-like Proteins ; ZIP = Zinc-regulated transporter Iron-regulated transporter Proteins.

Au moment de leur transport vers les vaisseaux de xylème, les métaux sont liés aux acides organiques (tels que le malate et le citrate), aux acides aminés (tels que l'histidine) et aux protéines de faibles poids moléculaire (tels que la nicotiamine et la métalothionine) (Rascio et Navari-Izzo, 2011).

c) Migration et accumulation du zinc

Les teneurs en zinc de la sève du xylème sont généralement supérieures à celles du liquide prélevé par les racines. Le zinc semble être transporté dans cette sève sous forme ionique (Tiffin, 1967) ou lié à des acides organiques (White et *al.*, 1981). Par contre, dans la sève du phloème, il est véhiculé sous forme de complexe anionique (Goor et Wiersma, 1976).

Une fois transloqués vers les tiges, les métaux sont distribués au niveau des différents compartiments cellulaires (Sheoran, Sheoran, et Poonia, 2009; Yang et *al.*, 2005).

L'étape finale de l'accumulation des métaux est la séquestration qui se déroule généralement dans les vacuoles. Les métaux sont complexés par la Mt, la PC et le GSH pour les inactiver et les transporter vers les vacuoles à travers les transporteurs membranaires (Sheoran, Sheoran, et Poonia, 2009). C'est le cas du CAX pour le Cd, du HMA3 pour le Zn, du CDF pour Zn, Ni, ...

2.4. Phytotoxicité du zinc

D'après Rousseau le maximum "normal" des teneurs de Zn dans les plantes est de 150mg/kg. 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 et 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. De plus, le cytoplasme perd sa structure. La désintégration d'organites et le développement de vacuoles sont aussi observés (Garty et *al.*, 1992; Rout et Das, 2009).

3. Les radicaux libres et le stress oxydatif

3.1. Définition des radicaux libres

Les radicaux libres sont des espèces chimiques (atomes ou molécules) qui possèdent un ou plusieurs électrons célibataires (électron non apparié) sur leur couche externe (Halliwell, 1989). Ils sont très instables et réagissent rapidement avec d'autres composants. C'est une réaction en chaîne qui débute lorsqu'un radical libre attaque la molécule stable la plus proche en lui arrachant son électron ; la molécule attaquée devient elle-même un radical libre (Martinez-Cayuela, 1995).

L'oxygène est un élément essentiel pour les organismes multicellulaires parce qu'il permet de produire de l'énergie en oxydant la matière organique. Mais nos cellules

convertissent une partie de cet oxygène en espèces réactives de l'oxygène et en métabolites toxiques tels que les radicaux libres organiques (Meziti, 2009).

3.2. Les espèces réactives de l'oxygène

Parmi les espèces radicalaires les plus intéressantes : les espèces réactives de l'oxygène (ERO). Ce sont des radicaux libres dérivant de la molécule d'oxygène, par addition d'un électron. Les principales espèces réactives de l'oxygène sont : le radical superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), le radical hydroxyle ($\bullet OH$), le monoxyde d'azote (NO^{\bullet}) et aussi certains dérivés oxygénés réactifs non radicalaires tels que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le peroxydinitrite ($ONOO$) (Gutteridge et Halliwell, 1993).

3.2.1. Origine endogène

La plus part des ERO se forment au cours du métabolisme de l'oxygène (réduction de l'oxygène moléculaire en eau) dans les mitochondries. Le passage d'une molécule d'oxygène à deux molécules d'eau nécessite l'action de quatre électrons selon l'équation :



Cependant, et jusqu'à 5 % des cas, on peut assister à une réduction incomplète de l'oxygène en eau. Cette réduction incomplète aboutit à la production de l'oxygène singulet (1O_2) mais surtout de l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$). La dismutation de $O_2^{\bullet-}$ va donner naissance au peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) puis indirectement au radical hydroxyl ($\bullet OH$) (Pincemail et *al.*, 2002; Valko et *al.*, 2006).

Les radicaux libres peuvent également être produits lors de la défense antibactérienne et au cours de la régulation des fonctions cellulaires létales (Singh et *al.*, 2010; Valko et *al.*, 2006).

3.2.2. Origine exogène

Plusieurs agents extérieurs capables de donner naissance à des espèces oxygénées réactives (Favier, 2003) :

Les rayonnements UV (par l'intermédiaire d'agents photosensibilisants) et les radiations ionisantes induisent la synthèse de radicaux libres dérivés de l'oxygène tels que $O_2^{\bullet-}$, $\bullet OH$, 1O_2 et de molécules génératrices de radicaux libres.

L'oxyde d'azote (NO) et le dioxyde d'azote (NO_2) sont des toxiques présents dans notre environnement (suie, goudron, tabac, polluants industriels) et sont responsables de la synthèse de radicaux libres. Ils sont à l'origine d'une auto-oxydation des acides gras polyinsaturés (AGPI) de l'oxydation des protéines et de l'ADN.

3.3. Cibles des ERO et leurs effets sur les plantes

Au niveau cellulaire, Les ERO causent plusieurs dommages (voir figure 2), ils provoquent :

- l'altération des gènes,
- la perturbation de l'intégrité membranaire par altération fonctionnelle des récepteurs,
- l'altération des protéines et des systèmes enzymatiques activés/inactivés.

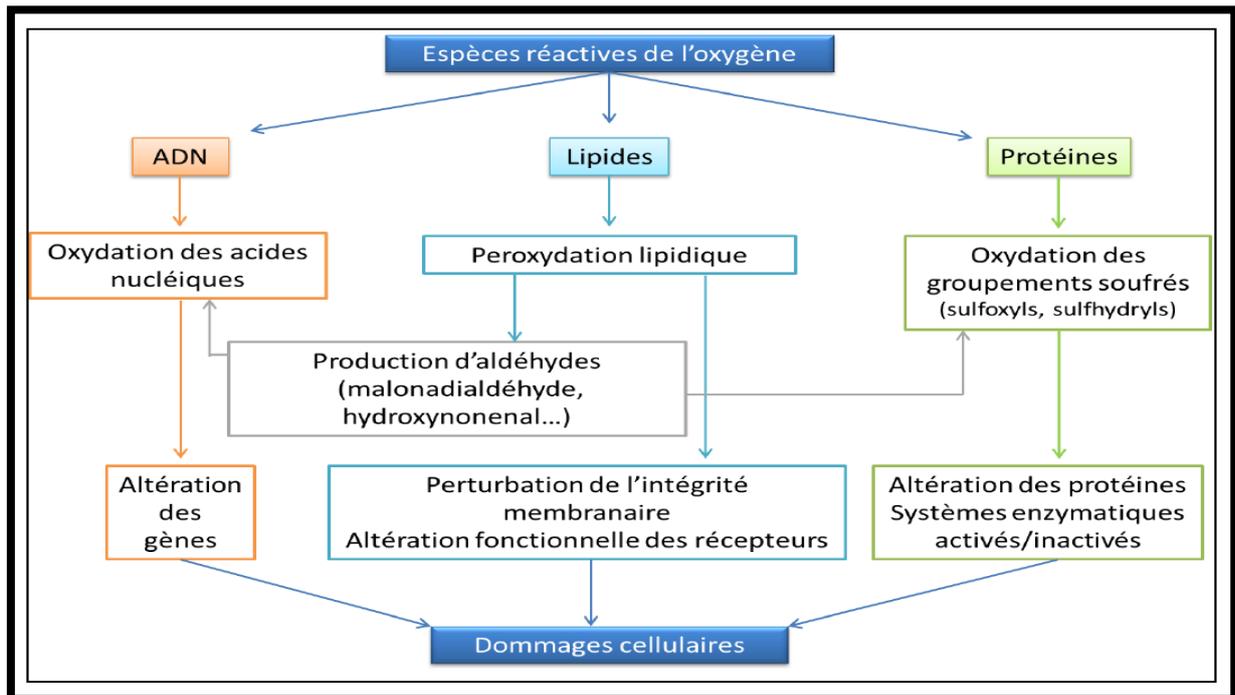


Figure 2 : Les différentes cibles des espèces Réactives de l'Oxygène (d'après Monteil, 2004). Les espèces réactives de l'oxygène peuvent engendrer des dommages importants sur la structure et le mécanisme cellulaire en dégradant de nombreuses cibles : protéines, lipides et acides nucléiques ADN.

3.4. Le stress oxydatif

Au sein de l'organisme, il existe un équilibre entre les ERO qui sont présentes à faible concentration et le système antioxydant qui contient des enzymes, des vitamines, des oligoéléments, le glutathion... Ce système est un moyen de défense en cas de production excessive d'ERO.

Le stress oxydatif se définit donc comme un déséquilibre entre la production d'ERO et les systèmes de défense (Delattre et *al.*, 2005).

3.4.1. Les conséquences du stress oxydatif

La production excessive des radicaux libres provoque des lésions directes des molécules biologiques : oxydation de l'ADN, des protéines, des lipides et des glucides. Elle provoque aussi des lésions secondaires dues au caractère cytotoxique et mutagène des métabolites

libérés lors de l'oxydation des lipides (Favier, 2003), Les conséquences du stress oxydatif sont :

3.4.1.1. La peroxydation lipidique

La peroxydation lipidique correspond à l'attaque des cibles lipidiques par les ERO. Elle se fait en plusieurs étapes (voir tableau 1). Les produits finaux sont : le malondialdéhyde (MDA) et le 4-hydroxynonéal (4-HNE). Ces derniers ont un potentiel mutagène et cancérigène (Valko et *al.*, 2006).

Tableau1 : Réaction de la peroxydation lipidique

Phase d'oxydation lipidique	Réaction(s) chimique(s)
Initiation	$RH + OH\cdot \longrightarrow R\cdot + H_2O$
Propagation	$R\cdot + O_2 \longrightarrow ROO\cdot$ $ROO\cdot + RH \longrightarrow ROOH + R\cdot$
Terminaison	$R\cdot + R\cdot \longrightarrow RR$ $ROO\cdot + R\cdot \longrightarrow ROR$ $ROO\cdot + ROO\cdot \longrightarrow ROOR + O_2$

a) L'initiation

Dans cette étape un acide gras polyinsaturé est attaqué par un radical hydroxyle au niveau d'un carbone situé entre deux doubles liaisons. La conséquence est l'arrachement d'un atome d'hydrogène qui laisse un électron non apparié. Le résultat est l'apparition d'un radical lipidique « R• » (Haleng et *al.*, 2007).

b) La propagation

En réagissant avec l'oxygène moléculaire, la nouvelle molécule apparue dans la phase d'initiation « R• » forme un radical peroxyde (ROO•) instable (voir tableau 1). A son tour, ce radical réagit avec un autre acide gras afin de donner un hydroperoxyde (ROOH) et un nouveau radical lipidique (Michel et *al.*, 2008).

c) La terminaison

Les hydroperoxydes subissent plusieurs transformations, ils sont soit réduits par la glutathion peroxydase, soit ils poursuivent l'oxydation et dans ce cas ils se fragmentent en aldéhydes toxiques. Cette réaction en chaîne se termine par l'intervention d'un composé

antioxydant ou par l'interaction entre deux radicaux pour former une molécule stable (Haleng *et al.*, 2007; Hennebelle *et al.*, 2004).

3.4.1.2. L'oxydation de l'ADN

Au niveau de l'ADN, les radicaux libres peuvent induire des effets oxydatifs et mutagènes ou un arrêt des réplifications. Ils agissent en provoquant des altérations des bases, des pontages ADN-protéines ou des ruptures des brins d'ADN (Shimizu *et al.*, 2004).

L'attaque radicalaire peut être directe en oxydant les bases, ce qui les modifie (voir figure 3)

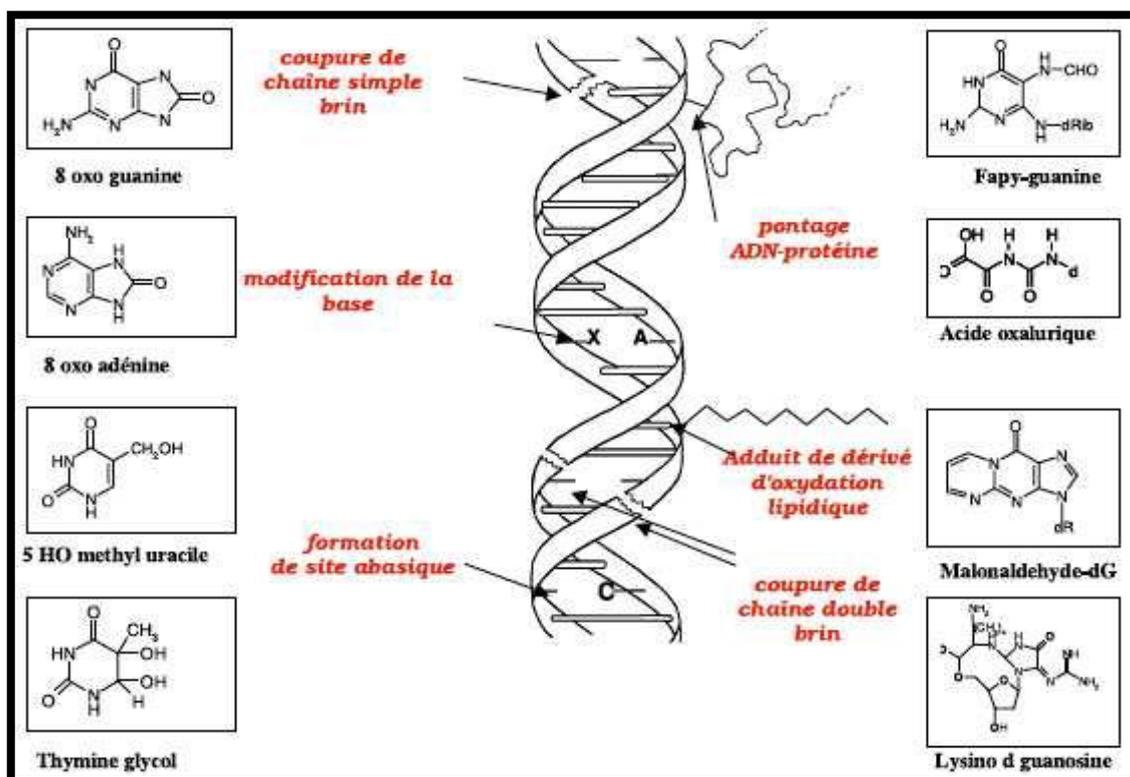


Figure 3 : Lésions de l'ADN formées suite à un stress oxydant (d'après Favier, 2003). Cinq classes principales de dommages oxydatifs provoqués par l' $\text{OH}\cdot$ peuvent être générées. Parmi elles, les bases oxydées, les sites abasiques, les adduits intra-caténaux, les cassures de brins et les pontages 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).

3.4.1.3. Altérations de la structure des protéines

Les protéines sont particulièrement sensibles à l'action des ERO (Stadtman et 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 et Levine, 2000).

La présence de radicaux hydroxyles est à l'origine de dégradations irréversibles des protéines, par la formation de groupements carbonyles sur la chaîne latérale de certains acides aminés.

Ainsi, l'histidine, l'arginine, la lysine ou encore la proline sont des cibles privilégiées de ce processus d'altération oxydative (Stadtman et Levine, 2000; Wong *et al.*, 2008). De nombreux autres acides aminés sont également susceptibles d'être oxydés par les ERO (voir figure 04).

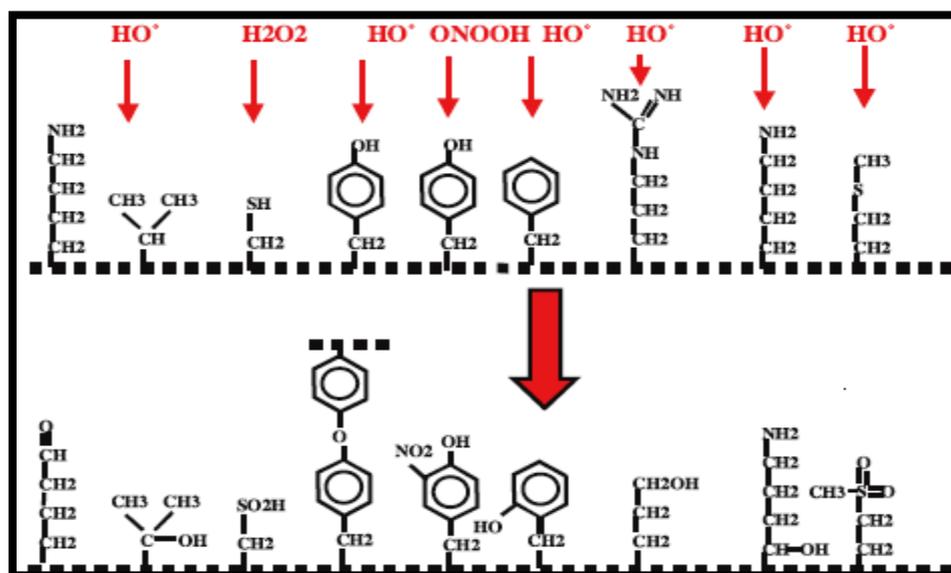


Figure 4 : Modifications des chaînes latérales des acides aminés composant les protéines après attaque radicalaire (d'après Favier, 2003). Les protéines oxydées perdent leurs propriétés biologiques et sont beaucoup plus sensibles à l'action des protéases (Stadtman et Levine, 2000).

4. Les antioxydants

4.1 Définition

L'organisme est doté d'un ensemble de systèmes de défenses très efficaces contre la surproduction d'ERO. Un antioxydant désigne toute substance capable de retarder ou inhiber significativement l'oxydation des substrats et composants cellulaires (Halliwell et Gutteridge, 1990). Il a pour rôle d'empêcher la formation de radicaux libres, de permettre leur élimination ou bien de réparer les dégâts causés par les radicaux libres.

4.2. Les différentes sources des antioxydants

On distingue deux sources d'antioxydants :

- l'une est apportée par l'alimentation sous forme de fruits et légumes riches en vitamines C et E, caroténoïdes, ubiquinone, flavonoïdes, glutathion ou acide lipoïque (voir figure 6)

- l'autre est endogène et se compose des :

- enzymes (superoxydodismutase, glutathion peroxydase, catalase),

- protéines (ferritine, transferrine, céruléoplasmine, albumine),

- systèmes de réparation des dommages oxydatifs comme les endonucléases. A

cela s'ajoutent quelques oligoéléments comme le sélénium, le cuivre et le zinc qui sont des cofacteurs d'enzymes antioxydantes (Favier, 2003).

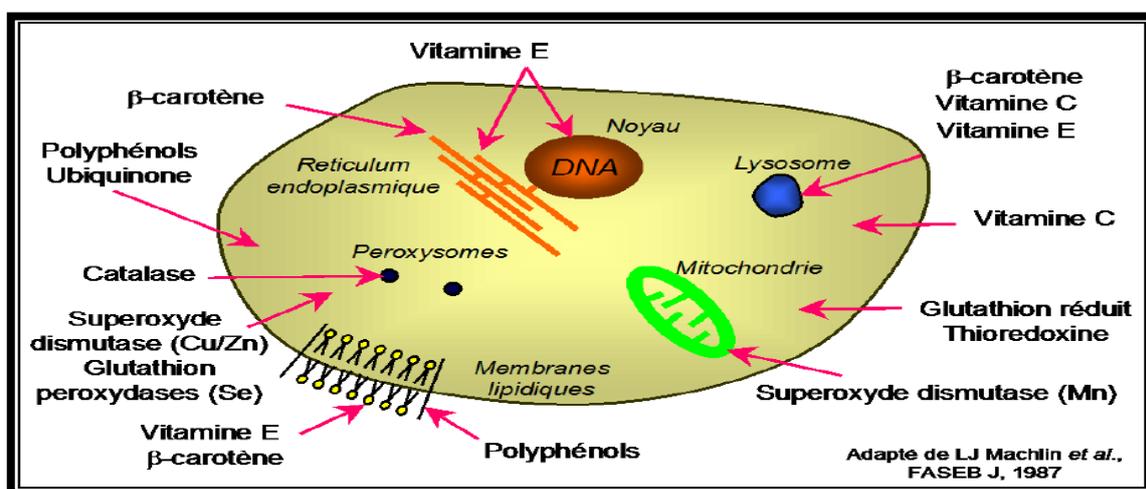
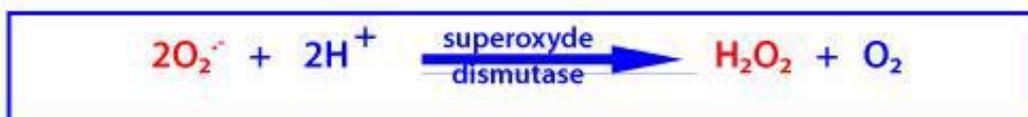


Figure 5: Les molécules intervenant dans la protection cellulaire (Machlin et Bendich, 1987) : Il existe différentes sortes d'antioxydants : des enzymes, des facteurs de transcription, des composés de bas poids moléculaire piégeant les radicaux libres, des vitamines (A, C, E), des polyphénols,...

4.3. Le système antioxydant enzymatique

4.3.1 Les superoxydes dismutases (SOD)

Les superoxydes dismutases (SOD) (EC : 1.15.1.1) sont des métalloenzymes qui catalysent la dismutation des ions peroxydes en oxygènes moléculaires et en peroxydes d'hydrogènes moins toxiques (Comhair et Erzurum, 2002) selon la réaction suivante :



L'activité des SOD est dépendante des apports nutritionnels en cuivre et à un moindre degré en zinc (Goudable et Favier, 1997).

4.3.2. La catalase

La catalase (EC : 1.11.1.6) est une enzyme héminique capable de transformer le peroxyde d'hydrogène (généralement produit par les SOD) en eau et en oxygène moléculaire.

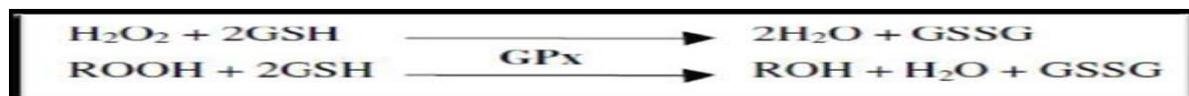


La catalase est une enzyme tétramérique. Chaque sous unité comporte un groupement ferriprotophyrine dans son site actif (avec un atome de fer à l'état Fe^3 et une molécule de NADPH). La fixation du NADPH par la catalase lui confère une protection contre l'attaque de l' H_2O_2 (Delattre et *al.*, 2005). Elle est essentiellement présente dans les peroxysomes mais aussi dans les mitochondries et le cytoplasme (Lindau-Shepard et Shaffer, 1993).

4.3.3. La glutathion peroxydase (GPx) :

Les glutathions peroxydases (EC.1.11.1.9) sont des enzymes dépendantes du sélénium (Akbas, Yegin, et Ozben, 2005). Elles sont localisées dans le cytosol et dans les mitochondries.

Les GPx utilisent le glutathion comme un donneur de proton (H^+), et le GSH sera oxydé en glutathion oxydé (GSSG)(Serdar et *al.*, 2006).



Le rôle de la glutathion peroxydase (GPx) est de réduire d'une part le peroxyde d'hydrogène en molécule d'eau et d'autre part les hydroperoxydes organiques (ROOH) en alcools.

4.4. Les antioxydants non enzymatiques :

Contrairement aux enzymes antioxydantes, la plupart des antioxydants non enzymatiques ne sont pas synthétisés par l'organisme et doivent être apportés par l'alimentation. Dans cette catégorie nous retrouvons les oligoéléments, le glutathion réduit (GSH), les vitamines E et C et les polyphénols (Kanoun, 2011).

4.4.1. La vitamine C :

L'acide L'ascorbique ou vitamine C est considéré comme le plus important antioxydant dans les fluides extracellulaires. C'est un piègeur très efficace des ions superoxydes O_2^- , du peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , des radicaux hydroxyles $\text{HO}\cdot$ et de l'oxygène singlet 1O_2 (Delattre et *al.*, 2005).

4.4.2. La vitamine E :

La vitamine E désigne une famille constituée des tocophérols et tocotriénols. La forme la plus active étant l' α -tocophérol. Cette vitamine est décrite comme étant le principal antioxydant liposoluble dans le plasma et les érythrocytes chez l'homme. Située dans les lipoprotéines et dans les membranes, l' α -tocophérol est capable de piéger chimiquement l'oxygène singlet ($1O_2$) en s'oxydant en quinone et aussi de réagir avec le radical hydroxyle ($\bullet OH$) (Delattre et *al.*, 2005).

4.4.3. Le β -carotène :

Le β -carotène est apporté par l'alimentation. Il est doué de plusieurs capacités, C'est un précurseur de la vitamine A et capte l'oxygène singlet sous faible pression d'oxygène. Avec les autres caroténoïdes, il a le pouvoir de terminer les réactions en chaîne de lipoperoxydation et protège les structures cellulaires contre l'agression oxydante (Goudable et Favier, 1997).

4.4.4. Le Glutathion :

Le glutathion est un agent anti radicalaire composé de 3 acides aminés : cystéine, acide glutamique et glycine (voir figure 6). Il joue un rôle majeur dans la protection des lipides, des protéines et des acides nucléiques contre l'oxydation (Stamler et Slivka, 1996; Delattre et *al.*, 2005).

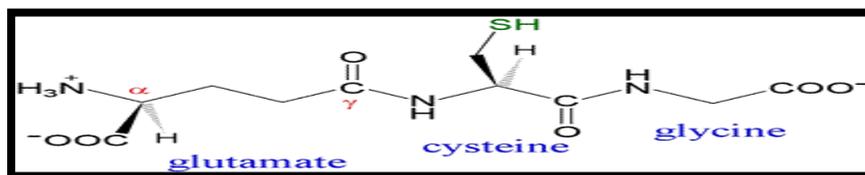


Figure 6 : Structure du glutathion.

4.4.5. Les oligoéléments

Le cuivre, le zinc, le manganèse, le sélénium et le fer sont des métaux essentiels dans la défense contre le stress oxydant. Ces oligoéléments jouent le rôle de cofacteur pour maintenir l'activité catalytique des enzymes antioxydantes (Garait, 2006).

4.4.6. Les polyphénols

Les polyphénols végétaux regroupent une grande variété de composés comprenant les flavonoïdes, les anthocyanes et les tanins. Ce sont des composés ubiquistes retrouvés dans les plantes. Ils sont capables de piéger les radicaux libres, d'inhiber la peroxydation lipidique en réduisant les radicaux hydroxyles, superoxydes et peroxydes. Ils sont aussi capables de piéger les ions métalliques car ils ont des propriétés chélatrices (Rice-evans et *al.*, 1995).

Chapitre 2 :

Matériel et méthodes

L'objectif de ce travail est d'étudier l'effet des différentes concentrations en zinc, dans un milieu gélosé, sur la tolérance ou l'accumulation du métal et sur le statut oxydatif des lentilles.

La partie pratique a été réalisée au niveau du laboratoire de biochimie et laboratoire de Biologie et Environnement, Campus Chaabat Ersas, Université des Frères Mentouri, Constantine.

1. Culture, *in vitro*, des graines des lentilles

1.1. Matériel végétal

L'ensemble des expériences a été réalisé sur les lentilles « *Lens culinaris* » appartenant à la famille des Fabacées (les légumineuses). Ces dernières ont été cultivées dans un milieu gélosé enrichi par les éléments nutritifs assurant leur croissance.

1.2. Préparation du milieu

Le milieu de culture (MS) des graines choisi est la gélose préparée *in vitro*. La préparation du milieu est faite à partir de deux solutions : la première contient les macroéléments et la deuxième les microéléments (selon le protocole détaillé dans l'**annexe1**). Les milieux de culture sont stérilisés dans un autoclave pendant 20 minutes.

1.3. Préparation de la plante

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

1.4. Choix des concentrations du Zn

Après plusieurs tests de croissance des graines des lentilles sur milieu gélosé et après test de plusieurs concentrations en Zn dans le milieu, cinq concentrations (0, 100, 750, 3000, 5000, 100000 μM) ont été choisies. Elles sont préparées à partir d'une solution mère de 0,1M du sulfate de Zinc heptahydraté ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$).

1.5. Germination des graines

Après refroidissement du milieu gélosé, une pré-culture dans des boîtes de pétri de 03 jours a été réalisée (les premières 24h dans l'obscurité). Les graines sont ensuite transférées dans des flacons stériles à bouchons contenant le milieu gélosé (30 ml) traité par le zinc. Les graines sont mises à germer dans des conditions environnementales ambiantes.

2. Dosage du Zn

2.1. Extraction du Zn

➤ Principe :

L'extraction du zinc a été faite selon la méthode de Elmer et Conn (1982).

➤ Mode opératoire

L'extraction a été effectuée en deux étapes : la première consiste à l'addition de 8 ml de l'acide nitrique (HNO_3) à 1 g de chaque échantillon des plantes préalablement séchées (72 heures à 105°C) et broyées en poudre. Les échantillons ont été laissés pendant une nuit.

La deuxième étape consiste au chauffage des échantillons (à l'aide d'une plaque chauffante) jusqu'à ébullition et production d'une fumée rouge. Après refroidissement, 1 ml d'acide perchlorique (HCl_4) est ajouté aux échantillons qui sont chauffés à nouveau jusqu'à évaporation partielle.

Après filtration par le papier wattman, les filtrats sont récupérés et le volume est ajusté à 2,5 ml avec l'eau distillée.

2.2. Dosage du Zn

➤ Principe

Le dosage du Zn a été effectué selon la méthode de Rodier et *al* (1975). Le principe de la réaction repose sur la formation d'un complexe de ferrocyanure de zinc absorbant à 650 nm.

➤ Mode opératoire

Le mélange réactionnel contient 400 μl d'acide chlorique, 800 μl de chlorure d'ammonium, une goutte de sulfite de sodium, 1 ml de l'échantillon et 240 μl Ferrocyanure de potassium. Le tout est homogénéisé au vortex puis laissé agir pendant 5 min.

➤ Calcul de la concentration du Zn dans les échantillons

Après mesure de l'absorbance, la concentration du zinc de chaque échantillon est déterminée à partir d'une courbe d'étalonnage préalablement réalisée avec la solution mère du Zn dans les mêmes conditions (**voir annexe 2**).

3. Méthodes de dosage biochimique

3.1. Préparation de l'extrait brut

Après germination des graines, les racines et les parties aériennes sont pesées séparément puis broyées, à froid, avec un mortier en utilisant une solution tampon phosphate (0,1 M, pH=7,6) contenant 0,1% de triton X-100, 1% de polyvinylpyrrolidone (PVP) et l'EDTA (1mM). L'homogénat est centrifugé à 4 °C pendant 15 min à 12000g.

Le surnageant récupéré est utilisé pour :

- la détermination de la concentration des protéines,
- l'évaluation du niveau de stress oxydatif (par le dosage du malondialdéhyde),
- le dosage des enzymes antioxydantes (peroxydase et glutathion peroxydase).

3.2. Dosage des protéines

Les concentrations de protéines sont quantifiées selon la méthode de Lowry et *al* (1951). La BSA est utilisée comme protéine étalon.

➤ Principe

Le principe de la méthode repose sur la réduction des acides aminés aromatiques, par les ions cuivriques, conduisant à la formation d'un complexe coloré bleu foncé. La mesure de l'absorbance a été réalisée à 700 nm.

➤ Mode opératoire

Le mélange réactionnel contient 2 ml de la solution mère (**voir composition en annexe 3**), 200 µl de l'échantillon, 200 µl du réactif de Folin-Ciocalteu. Le tout est homogénéisé au vortex puis laissé dans 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 3**).

3.3. Dosage du malondialdéhyde (MDA)

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

➤ Principe de la méthode

Le principe du dosage repose sur la réaction produite entre le malondialdéhyde et l'acide thiobarbiturique (TBA) formant le dérivé coloré MDA-TBA2. Ce dérivé est de couleur rose absorbant à 532 nm.

➤ Mode opératoire

0,15 ml de surnageant est homogénéisé avec 1 ml de l'acide trichloroacétique (TCA à 20%) et 0,5 ml de l'acide thiobarbiturique (TBA à 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 mM⁻¹cm⁻¹. Elle est exprimée en µmol/gr de tissu.

3.4. Dosage de la peroxydase (POD)

Les peroxydases sont des oxydoréductases qui catalysent l'oxydation d'un substrat (donneurs de protons) en présence du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂).



➤ Principe

La mesure de l'activité de la peroxydase est effectuée selon la méthode de Chance et Maehly (1955). Le purpurogalline formé entre l'H₂O₂ et le pyrogallol, par l'action de la peroxydase, est déterminé par la mesure de l'absorbance à 420 nm contre un blanc.

➤ Mode opératoire

0,1 ml de l'extrait enzymatique est ajouté au mélange réactionnel contenant 1ml de tampon phosphate (0,1M à pH 6,8), 0,5 ml de pyrogallol (0,01M) et 0,5 ml H₂O₂ (0,05M). Le mélange est incubé à 25°C pendant 5 mn. La réaction est arrêtée par l'addition de 0,5 ml de l'acide sulfurique (H₂SO₄, 2,5 N).

Le blanc est préparé par l'addition de l'extrait enzymatique après le H₂SO₄ et l'activité enzymatique est exprimée en unité = 0,1 absorbance mn⁻¹ mg⁻¹ de protéine.

➤ Calcul de l'activité spécifique de la POD

Abs = Abs Echantillon – Abs Blanc.

1 Unité = Abs/0,1.

Activité spécifique = Unité /mn/ mg protéine.

3.5. Dosage de la glutathion peroxydase (GPx)

Les glutathion peroxydases sont des enzymes catalysant la réduction des hydroperoxydes par le glutathion (GSH).

➤ Principe

Cette méthode de Flohé et Günzler (1984) est basée sur la réduction de peroxyde d'hydrogène H₂O₂ en présence de glutathion réduit (GSH). Ce dernier est transformé en glutathion disulfure (GSSG) sous l'influence de la GPx. La réaction est la suivante :



La réaction est arrêtée par addition d'un acide fort et la teneur en GSH restant est mesurée par spectrophotométrie à 412 nm.

➤ Mode opératoire

* Préparation des échantillons :

Le tube des échantillons contient 200 µl du tampon phosphate de potassium (0,1 M, pH : 7), 100 µl surnageant, 150 µl de GSH (0,1mM). Le mélange est incubé pendant 10 min à 37°. La réaction est initiée par l'ajout de 500 µl du H₂O₂ (10 mM) et est arrêtée par l'ajout de 2 ml du HCl après une minute. Ensuite, 2,5 ml du tampon phosphate de potassium (0,1 M, pH=7) et 100 µl de réactif d'Elman (DTNB) sont ajoutés à 250 µl d'échantillon.

* Préparation du blanc

Par rapport à l'échantillon, dans le tube du blanc le tampon est utilisé au lieu de l'extrait enzymatique et le HCl est ajouté au mélange avant l'incubation et avant l'ajout du H₂O₂. Le contenu en GSH au temps zéro est évalué par cette épreuve.

➤ Calcul de l'activité spécifique de la GPx

$$\text{GPx } (\mu \text{ mol GSH/mg protéine}) = \frac{\text{DO}_{\text{étalon}} - \text{DO}_{\text{échantillon}} * 5,8 * 0,04}{\text{DO}_{\text{étalon}} * \text{prot (mg)}}$$

DO_{échantillon} = densité optique de l'échantillon.

DO_{étalon} = densité optique de l'étalon.

5,8 = volume totale (ml).

0,04 = concentration de substrat (GSH).

4. Analyse statistique

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

Chapitre 3 :

Résultats et discussion

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

Les résultats de la croissance de la *Lens culinaris*, après 6 jours et en fonction des différentes concentrations en Zn (de 0 à 100000 μM), sont représentés dans la figure 7 :

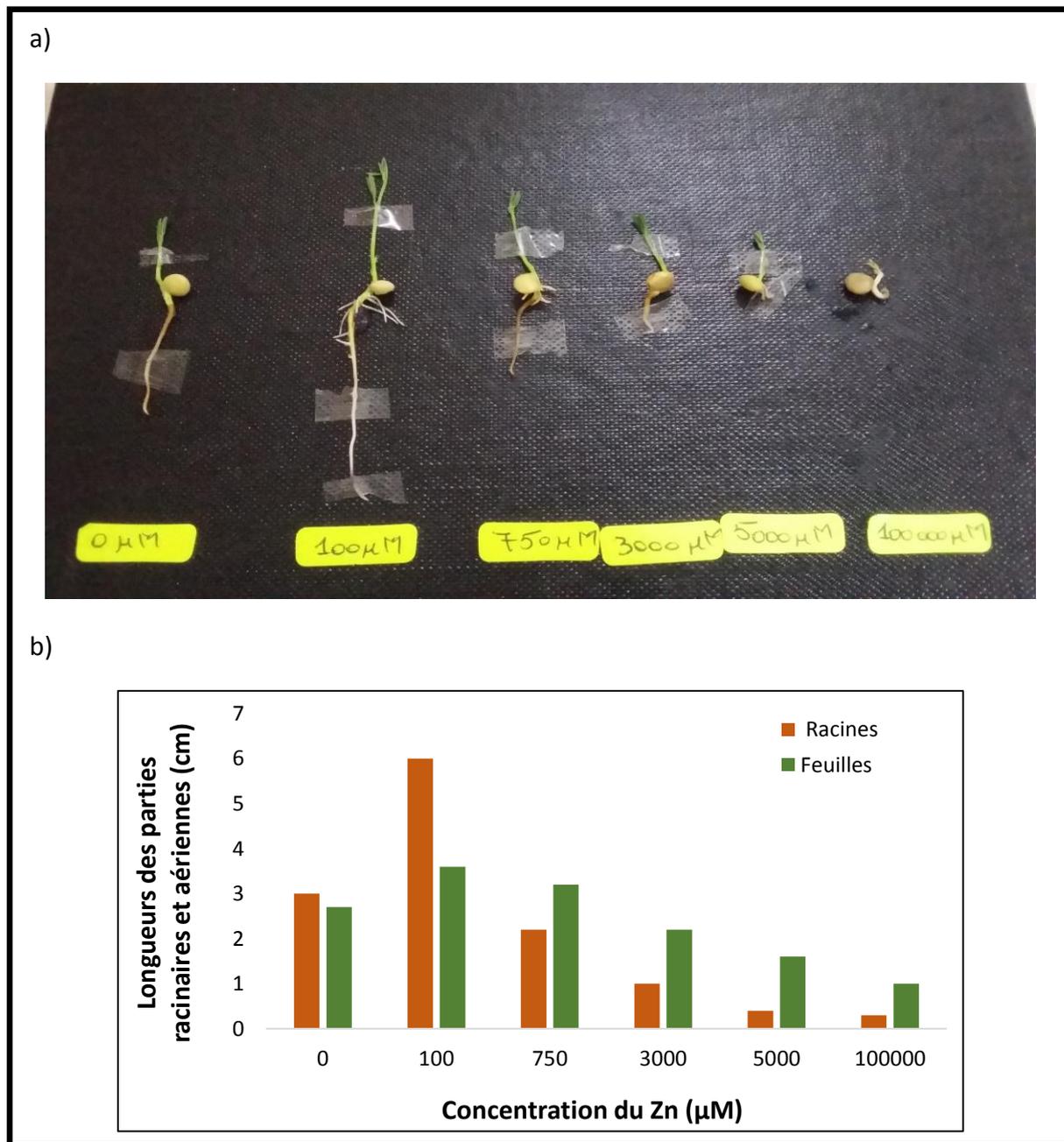


Figure 7 : Effet du Zn sur la croissance des plantules de *Lens culinaris* après 6 jours.

a) Phénotype morphologique après 6 jours ; b) Longueurs des parties racinaires et aériennes.

Les résultats de la figure 7a montrent une différence au niveau du phénotype des plantules. La croissance des plantes atteint son maximum et dépasse même celle des témoins à une concentration en Zn de 100 μM ; Au-delà de 100 μM elle commence à diminuer.

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

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

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

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

Les résultats obtenus et ceux des travaux précédents (Lee et al., 1991; Ebbs et Kochian, 1997; Vijayarengan et Mahalakshmi, 2013) permettent de faire trois suppositions concernant la réduction de la croissance :

1. La plante développe un système qui réduit la masse des parties racinaires et aériennes et agit sur la perméabilité de la membrane en limitant l'absorption du Zn. Dans ce cas, plus la concentration du Zn augmente plus la membrane devient imperméable et plus la translocation des nutriments et de l'eau est difficile.

2. le Zn est absorbé par la plante et interfère avec les activités métaboliques cellulaires en inhibant la division et l'élongation cellulaires.

3. La plante tolère le transport du Zn dans ses parties en développant un système limitant la translocation excessive du métal et dans le même temps un système de défense antioxydant pour lutter contre le stress induit par l'absorption du métal. Dans ce cas la plante est considérée comme une plante tolérante mais elle n'est pas un bon modèle pour la phytoremédiation.

2. Teneur du Zinc dans les deux parties des lentilles

Les teneurs du Zn dans les deux parties de la plante, à différentes concentrations, sont résumées dans la figure 8 :

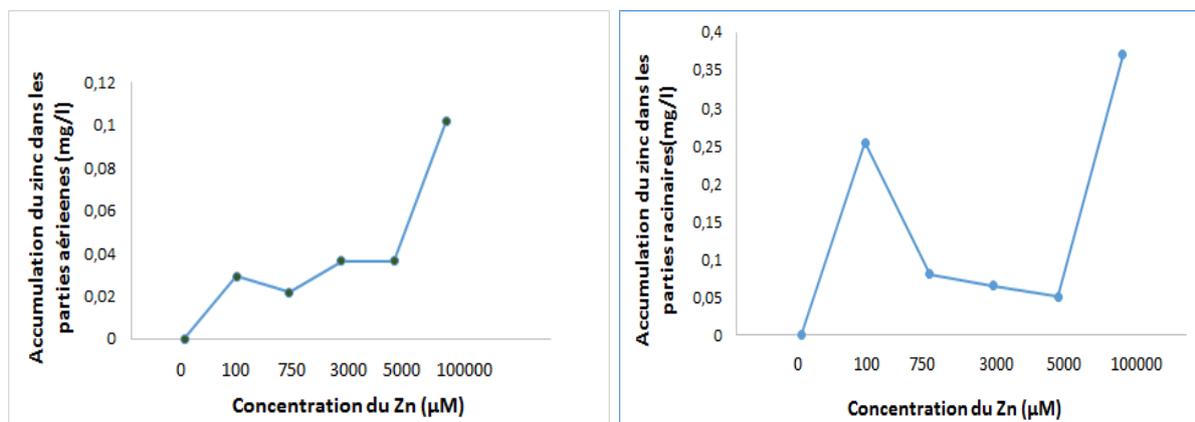


Figure 8 : Accumulation du zinc dans les deux parties de *Lens culinaris*.

La figure montre que les lentilles accumulent le Zn beaucoup plus au niveau des racines et que la variation du niveau d'accumulation dépend de la concentration du Zn dans le milieu et de la partie de la plante (aérienne ou racinaire).

Au niveau des racines et jusqu'à 5000 µM en Zn, l'accumulation est inversement proportionnelle à la concentration du Zn dans le milieu. Le maximum est observé à 100 et le minimum à 5000. Au de la de 5000, l'absorption du Zn devient très importante.

Au niveau des feuilles, l'accumulation du Zn est proportionnelle à sa concentration dans le milieu (mais le taux est négligeable par rapport aux racines). Le maximum d'absorption est atteint à 100 000.

L'accumulation importante observée au niveau des racines à 100 µM est peut être dû au fait que la plante l'a absorbé vu son rôle d'oligoélément. Au-delà de 100 µM, les racines limitent l'absorption de ce métal par ses barrières membranaires. Cela pour ne pas perturber ses fonctions vitales (Pérez-Sirvent et al., 2012; Shtangeeva, Bali, et Harris, 2011). En plus de des barrières membranaires, les lentilles développent un système antioxydant puissant pour lutter contre le stress oxydatif induit par le Zn (Bhaduri et Fulekar, 2012).

A une concentration de 100000 µM en Zn, les plantes absorbent des quantités importantes et le niveau du stress oxydatif atteint son maximum. Cela est peut être due à l'épuisement du système antioxydant et de la barrière limitant l'absorption du Zn.

3. Effet du Zinc sur la teneur des protéines

Les teneurs des protéines totales mesurées chez *Lens culinaris*, en réponse à différentes concentrations de zinc, est représentée dans la figure 9.

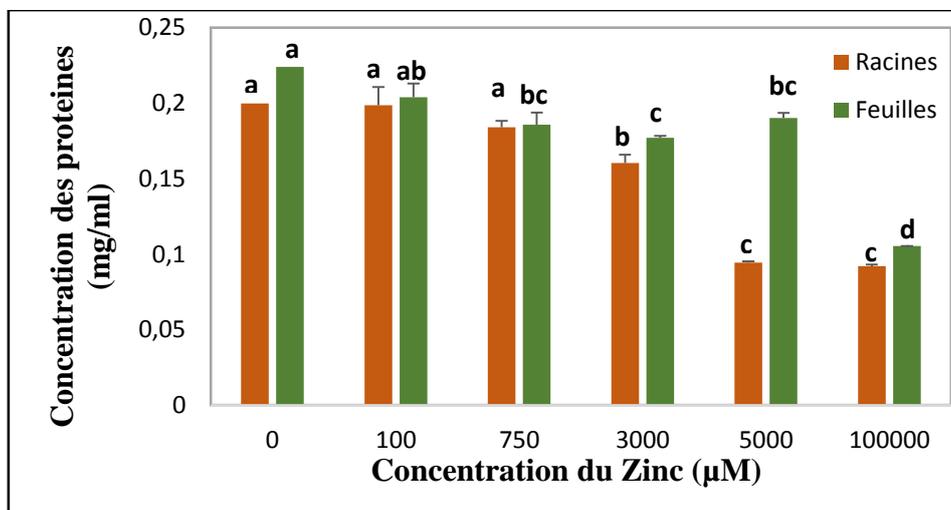


Figure 9 : Effet du Zn sur la teneur des protéines totales de *Lens culinaris*. Les lettres représentent les différences statistiques entre les six concentrations pour chaque partie de la plante (en utilisant ANOVA suivie par le test HSD de Tukey, $p < 0.05$).

La figure 9 montre que la teneur en protéines diminue dans les deux parties des plantes en réponse à différentes concentrations du Zn dans le milieu. Dans les parties racinaires, la diminution du taux des protéines, par rapport aux témoins, est très significative à 5000 et 100000 µM en Zn. Dans les parties aériennes elle l'est à 100000 µM.

Les protéines sont des biomolécules jouant un rôle actif et vital dans le fonctionnement des cellules, tel que : transporteurs, hormones, enzymes...Elles sont particulièrement sensibles à l'action des ROS, surtout : le tryptophane, la tyrosine, l'histidine, la cystéine et la méthionine. Les ROS sont aussi capables de couper les liaisons peptidiques et de former ainsi des fragments protéiques (Koechlin-Ramonatxo, 2006). En plus l'oxydation des protéines par les ROS provoquent une perte de leurs propriétés biologiques et les rend plus sensibles à l'action des protéases (Stadtman et Levine, 2000).

Di Toppi et Gabrielli (1999) ont rapporté la possibilité de la liaison des métaux lourds aux groupements thiols des enzymes et aux hydrates de carbone des parois cellulaires (pectines) en les dénaturants.

La diminution de la teneur des protéines en réponse au stress métallique est peut être due à la fixation des métaux par les protéines soufrées. Lorsqu'une protéine ou enzyme

soufrée fixe un atome de métal, la zone de fixation devient inactivée et l'enzyme ou la protéine perd son activité (Boudene, 1993).

4. 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 *Lens culinaris* (figure 10) :

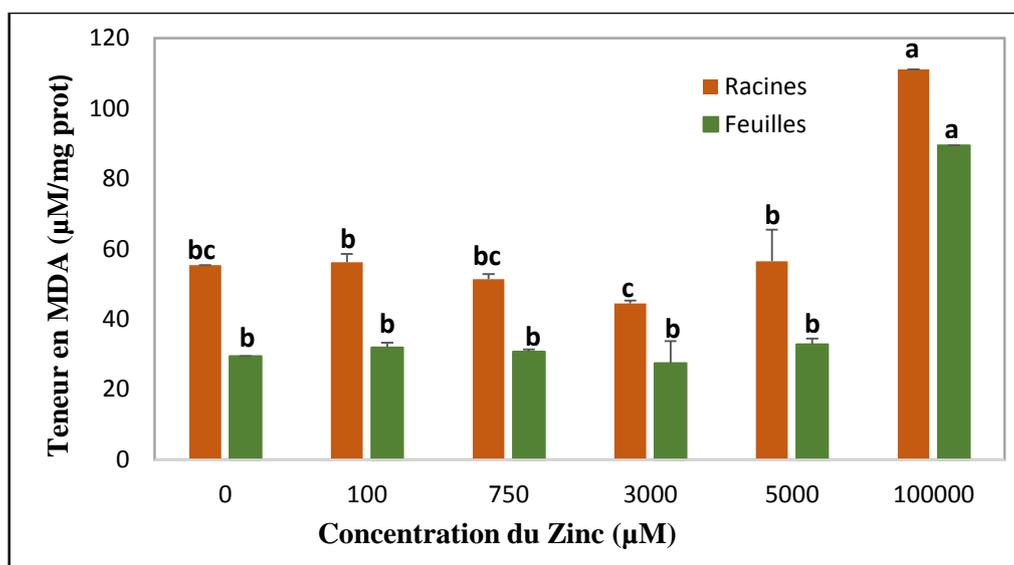


Figure 10 : Evaluation du niveau du MDA dans les deux parties de *Lens culinaris*.

La figure 10 montre que le niveau du MDA est plus élevé, dans son ensemble, dans les deux parties de la plante, par rapport au témoin. Il est plus élevé dans les parties racinaires quelle que soit la concentration du Zn dans le milieu de culture.

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

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

Certains auteurs ont démontré une augmentation de la peroxydation lipidique suite à une exposition aux métaux lourds (Gill et Tuteja, 2010; Michel et *al.*, 2008; Benhamdi et *al.*, 2014). Ces derniers induisent la production de ROS tels que : 1O_2 , $O_2^{\bullet-}$, $\bullet OH$...

Les ROS formés et accumulés lors du stress induit par les métaux vont réagir avec les acides gras polyinsaturés pour former les radicaux lipidiques et les aldéhydes réactifs (Gill et Tuteja, 2010). 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 et Prasad, 2003; Dazy, Masfarau, et Féraud, 2009; Chaoui et *al.*, 1997).

Nos résultats montrent que la teneur du MDA est plus élevée dans les racines. Cela a été observé chez d'autres plantes, telles que celles du riz et du pois exposés au Pb (Malecka, Jarmuszkiewicz, et Tomaszewska, 2001). Les résultats montrent aussi que l'état de stress chez les lentilles est presque stable jusqu'à la concentration de 5000 μ M. Cela est peut être dû au fait que la plante a développé un système antioxydant puissant pour lutter contre les ROS et qu'il y a un équilibre entre la production des ROS et leur élimination. L'augmentation rapide du niveau du MDA à 100000 μ M est peut être la conséquence d'un incapacité du système antioxydant et un déséquilibre de la balance oxydants-antioxydants en faveur des ROS (Atamer et *al.*, 2008).

5. Effet du zinc sur l'activité de la peroxydase

L'effet du Zn sur les activités de la peroxydase (POD) est représenté dans la figure 11.

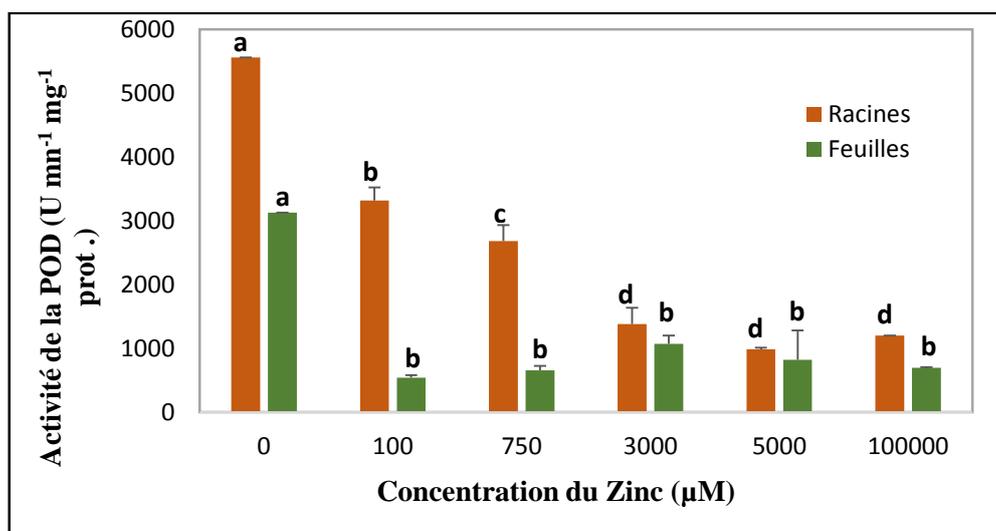


Figure 11 : Activité de la POD au niveau des racines et des parties aériennes de *Lens culinaris*. Les lettres représentent les différences statistiques entre les six concentrations pour chaque partie de la plante (en utilisant l'ANOVA suivie par le test HSD de Tukey, $p < 0.05$).

Les résultats des activités de la peroxydase représentés dans la figure 11 montrent que l'activité est plus importante dans les racines. Dans les deux parties de la plante, elle diminue d'une manière significative, par rapport aux témoins, jusqu'à la concentration de 100000 μ M en Zn.

Le taux important de la POD dans les racines des lentilles a été observé pour d'autres plantes, telles que le riz exposé à des concentrations élevées en As (Shri et *al.*, 2009) et la pomme de terre douces exposées aux Cd, Cu et Zn.

La peroxydase est une enzyme antioxydante importante dans les plantes. Elle participe à plusieurs processus biologiques tels que le développement cellulaire, la lignification, la biosynthèse d'éthylène, la défense contre le stress, etc. (Bhaduri et Fulekar, 2012).

La diminution de l'activité de la POD suite à l'augmentation de la concentration du Zn dans le milieu peut être expliquée par l'effet inhibiteur de ce dernier. Cette diminution est constatée pour les feuilles du blé et du chou traitées par différentes concentrations en Ni (Pandey et Sharma, 2002) et chez d'autres plantes traitées par le Zn (Mize et Langdon, 1962; Splittgerber et Tappel, 1979).

Il est connu que les métaux lourds induisent la production des ROS. Le Zn a été identifié comme inducteur de la formation du H₂O₂ (May et Contoreggi, 1982). L'inhibition de l'activité de la POD suite aux fortes concentrations en Zn est due à la production excessive du H₂O₂ qui devient un inhibiteur de la POD (Pan, 2011). Il se peut aussi que le Zn réagi avec les groupements thiol du site actif de la POD en le désactivant (Djebali, Chaïbi, et Ghorbel, 2002).

6. Effet du Zinc sur l'activité de la glutathion peroxydase (GPx)

L'activité de la GPx mesurée chez *Lens culinaris*, en réponse à différentes concentrations en zinc, est représentée dans la figure 12 :

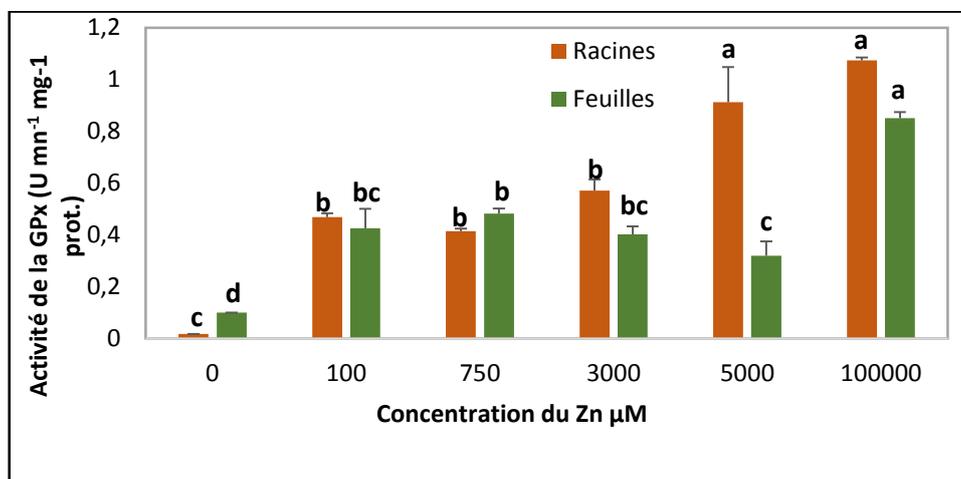


Figure 12 : Activité de la GPx dans les deux parties de *Lens culinaris*. Les lettres représentent les différences statistiques entre les six concentrations pour chaque partie de la plante (en utilisant l'ANOVA suivie par le test HSD de Tukey, $p < 0.05$).

La figure 12 montre que la variation de l'activité de la GPx liée à l'élévation des concentrations du zinc. Elle est plus importante dans les racines. Elle augmente significativement dans les deux parties de la plante et les activités maximales sont observées à 100000 μM.

La glutathion peroxydase (GPx) est une enzyme qui joue un rôle important dans la défense antioxydante. Elle inhibe la production de radicaux libres très oxydants tels que le radical hydroxyle OH dérivé du H₂O₂ (Sies, 1999).

L'augmentation de l'activité de la GPx, suite à un stress métallique, a été observée chez plusieurs plantes telles que : *Lens culinaris* (Hartikainen et al., 2000) et chez *Vicia sativa L.* (Paciolla et al., 2011). L'activité élevée de la GPx dans les parties racinaires est due au fait que le niveau du stress est plus important au niveau de cette partie. Ceci est confirmé par le taux du MDA et la quantité du Zn qui sont plus importants au niveau des racines.

Conclusion

Les métaux lourds représentent un facteur majeur dans la dégradation de l'environnement. De par leur nature biopersistante, ils causent des perturbations à l'écosystème, détériorent les milieux de culture et les eaux. Ils s'accumulent dans les plantes via un transfert sol-plante et 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. L'importance du zinc est principalement liée à son rôle de cofacteur pour les métallo enzymes.

Notre étude s'est intéressée à l'effet du Zn, à différentes concentrations dans un milieu de culture, sur le niveau d'accumulation, de la croissance et de la réponse antioxydante de *Lens culinaris*.

Les résultats montrent que *Lens culinaris* accumule le Zn beaucoup plus au niveau des parties racinaires. La croissance des plantes atteint son maximum et dépasse même celle des témoins à une concentration en Zn de 100 μM . Au-delà de cette concentration, il devient toxique et la croissance commence à diminuer dans les deux parties de la plante. Les variations des taux du MDA, dans les deux parties de la plante, sont peu significatives. A 100000 μM en Zn, le taux devient très important. Cela démontre que le MDA est un réel indicateur de stress.

Quand aux protéines, plus la concentration du Zn augmente, plus leur taux diminue. L'évaluation des activités enzymatiques indique que le déclin de la POD est concomitant à l'augmentation du GPx. L'activité de la GPx est maximale à 100000 μM de Zn dans les deux parties de la plante alors que celle de la POD diminue par rapport aux plantes témoins.

L'évaluation de la concentration du Zn, du niveau de la peroxydation lipidique, du taux des protéines et des activités des peroxydases et des glutathions peroxydases, chez *Lens culinaris*, en réponse à différentes concentrations en Zn, permet de déduire le mécanisme de tolérance du Zn chez *Lens culinaris*.

Lorsque le Zn est présent dans le milieu de culture, à une concentration inférieure à 100 μM , les lentilles l'absorbent car il joue le rôle d'oligoélément. Le Zn absorbé est accumulé au niveau des racines et une très petite quantité est transloquée vers les parties aériennes. A une certaine concentration ($> 100 \mu\text{M}$) cet élément devient toxique et les lentilles développent des systèmes pour limiter son absorption d'une part (par contrôle de ses barrières membranaires en limitant le transport des métaux) et pour lutter contre le stress induit par le

Zn absorbé d'autre part. Cela se traduit par la diminution du niveau du Zn accumulé par les lentilles à 750, 3000 et 5000 μM .

Une fois à l'intérieur des cellules, les molécules de Zn se lient avec les groupements thiols de certaines protéines et enzymes en les inactivant et les inhibant. Cela se traduit par une diminution du taux des protéines au niveau des lentilles.

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

De 100 μM jusqu'à 5000 μM de Zn, la stabilité du niveau du MDA montre que le système antioxydant des lentilles a pu minimiser les effets des ROS en les transformant en molécules non radicalaires. L'augmentation de l'activité de la GPx (qui assure la dismutation du H_2O_2) confirme que le système antioxydant des lentilles est actif. La POD aussi fait partie du système antioxydant mais son activité est inhibée par le Zn et son taux diminue.

A 100000 μM , l'augmentation très rapide et très significative du taux du Zn et du niveau du MDA, dans les deux parties des lentilles, montre que le Zn est devenu très toxique et que les plantes sont entrées dans un état de stress. Cet état est dû à la perte du contrôle des barrières membranaires (qui laissent passer des quantités importantes en Zn) et à l'épuisement du système antioxydant malgré l'augmentation de l'activité de la GPx. Il est connu que le stress a lieu quand la balance entre la production des radicaux libres et leur destruction physiologique est positive.

En conclusion on constate que les lentilles sont des plantes tolérantes à la présence du Zn dans le milieu de culture et au niveau de leurs cellules en développant un système antioxydant puissant. Elles ne sont pas un bon modèle pour la phytoremédiation des milieux pollués par le Zn car à une certaine concentration en Zn leur système antioxydant devient inefficace et les plantes entrent dans un état de stress.

Pour compléter ce travail, il est préférable d'étudier par la détermination de l'activité des autres enzymes antioxydantes et la quantité du zinc dans le milieu de culture après la croissance des lentilles.

Références bibliographiques

- Adriano, Domy C. 2001. « Trace elements in the terrestrial environments: Biogeochemistry, bioavailability, and risks of heavy metals ». *Springer-Verlag, New York, NY*.
- Akbas, S. Halide, Aysenur Yegin, et Tomris Ozben. 2005. « Effect of pentylenetetrazol-induced epileptic seizure on the antioxidant enzyme activities, glutathione and lipid peroxidation levels in rat erythrocytes and liver tissues ». *Clinical biochemistry* 38 (11): 1009–1014.
- Alkorta, I., J. Hernández-Allica, J. M. Becerril, I. Amezaga, I. Albizu, et C. Garbisu. 2004. « Recent findings on the phytoremediation of soils contaminated with environmentally toxic heavy metals and metalloids such as zinc, cadmium, lead, and arsenic ». *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* 3 (1): 71–90.
- Alloway, B. J. 1995. *Heavy metals in soils*. Springer Science & Business Media.
- Aoun, Michel. 2008. « Action du cadmium sur les plants de moutarde indienne [Brassica juncea (L.) Czern] néoformés à partir de couches cellulaires minces et issus de semis. Analyses physiologiques et rôle des polyamines. » Université de Bretagne occidentale-Brest.
- Aravind, Parameswaran, et Majeti Narasimha Vara Prasad. 2003. « Zinc alleviates cadmium-induced oxidative stress in *Ceratophyllum demersum* L.: a free floating freshwater macrophyte ». *Plant Physiology and Biochemistry* 41 (4): 391–397.
- Arris, S. 2008. « Etude Expérimentale de l'Élimination de Polluants Organiques et Inorganiques par Adsorption sur des Sous Produits de Céréales ». Thèse de doctorat.
- Atamer, A., A. Bilici, N. Yenice, S. Selek, N. Ilhan, et Y. Atamer. 2008. « The importance of paraoxonase 1 activity, nitric oxide and lipid peroxidation in hepatosteatosis ». *Journal of International Medical Research* 36 (4): 771–776.
- Bélangier, Pier-Anne. 2009. *Étude de l'effet de la contamination en métaux lourds sur Frankia SPP. et sa symbiose avec l'aulne noir (Alnus glutinosa (L.) Gaertn)*. Université de Sherbrooke. <http://savoirs.usherbrooke.ca/handle/11143/4870>.
- Benhamdi, Asma, Alima Bentellis, Oualida Rached, Gijs Du Laing, et Aicha Mechakra. 2014. « Effects of Antimony and Arsenic on Antioxidant Enzyme Activities of Two Steppic Plant Species in an Old Antimony Mining Area ». *Biological Trace Element Research*
- Bhaduri, Anwesa M., et M. H. Fulekar. 2012. « Antioxidant enzyme responses of plants to heavy metal stress ». *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* 11 (1): 55–69.
- Blum, Winfried EH. 1990. *Soil pollution by heavy metals: Causes, processes, impacts and need for future action*. Council of Europe.
- Boudene, Claude. 1993. « Ces métaux lourds en question ». *Nous* 1: 85.
- Broadley, Martin R., Philip J. White, John P. Hammond, Ivan Zelko, et Alexander Lux. 2007. « Zinc in plants ». *New Phytologist* 173 (4): 677–702.
- Browning, Ethel, et others. 1961. « Toxicity of Industrial Metals. » *Toxicity of Industrial Metals*. <http://www.cabdirect.org/abstracts/19612703385.html>.
- Chance, Britton, et A. C. Maehly. 1955. « [136] Assay of catalases and peroxidases ». *Methods in enzymology* 2: 764–775.
- Chaoui, Abdelilah, Salma Mazhoudi, Mohamed Habib Ghorbal, et Ezzedine El Ferjani. 1997. « Cadmium and zinc induction of lipid peroxidation and effects on antioxidant enzyme activities in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) ». *Plant Science* 127 (2): 139–147.
- Clemens, Stephan, Michael G. Palmgren, et Ute Krämer. 2002. « A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation ». *Trends in plant science* 7 (7): 309–315.
- Comhair, Suzy AA, et Serpil C. Erzurum. 2002. « Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases ». *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 283 (2): L246–L255.

- Cornejo, J. J., F. G. Munoz, C. Y. Ma, et A. J. Stewart. 1999. « Studies on the decontamination of air by plants ». *Ecotoxicology* 8 (4): 311–320.
- Dazy, Marc, Jean-François Masfarau, et Jean-François Féraud. 2009. « Induction of oxidative stress biomarkers associated with heavy metal stress in *Fontinalis antipyretica* Hedw. ». *Chemosphere* 75 (3): 297–302.
- Delattre, Jacques, Jean-Louis Beaudeau, et Dominique Bonnefont-Rousselot. 2005. « Radicaux libres et stress oxydant (aspects biologiques et pathologiques) ».
- Di Toppi, L. Sanità, et R. Gabbrielli. 1999. « Response to cadmium in higher plants ». *Environmental and Experimental Botany* 41 (2): 105–130.
- Djebali, Wahbi, Wided Chaïbi, et Mohamed Habib Ghorbel. 2002. « Croissance, activité peroxydasique et modifications ultrastructurales induites par le cadmium dans la racine de tomate ». *Canadian journal of botany* 80 (9): 942–953.
- Dowling, Damian K., et Leigh W. Simmons. 2009. « Reactive oxygen species as universal constraints in life-history evolution ». *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, rspb–2008.
- Ebbs, Stephen D., et Leon V. Kochian. 1997. « Toxicity of zinc and copper to Brassica species: implications for phytoremediation ». *Journal of Environmental Quality* 26 (3): 776–781.
- Elmer, Perkin, et N. Conn. 1982. « Analytical methods for atomic absorption spectrophotometry ». *Perkin Elmer, Norwalk, CT*.
- Emamverdian, Abolghassem, Yulong Ding, Farzad Mokhberdoran, et Yinfeng Xie. 2015. « Heavy metal stress and some mechanisms of plant defense response ». *The Scientific World Journal* 2015. <http://www.hindawi.com/journals/tswj/2015/756120/abs/>.
- Ercal, Nuran, Hande Gurer-Orhan, et Nukhet Aykin-Burns. 2001. « Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal-induced oxidative damage ». *Current topics in medicinal chemistry* 1 (6): 529–539.
- Favier, Alain. 2003. « Le stress oxydant ». *L'actualité chimique* 108. <http://www.lbmroanne.com/docs/stress%20oxydant/Favier.pdf>.
- Flohé, Leopold, et Wolfgang A. Günzler. 1984. « [12] Assays of glutathione peroxidase ». *Methods in enzymology* 105: 114–120.
- Franklin, R. E., Lori Duis, Richard Brown, et Thomas Kemp. 2005. « Trace Element Content of Selected Fertilizers and Micronutrient Source Materials* ». *Communications in soil science and plant analysis* 36 (11-12): 1591–1609.
- Garait, Blandine. 2006. « Le stress oxydant induit par voie métabolique (régimes alimentaires) ou par voie gazeuse (hyperoxie) et effet de la GliSODin® ». Université Joseph-Fourier-Grenoble I.
- Garty, J., Y. Karary, et J. Harel. 1992. « Effect of low pH, heavy metals and anions on chlorophyll degradation in the lichen *Ramalina duriaei* (De Not.) Bagl. ». *Environmental and experimental botany* 32 (3): 229–241.
- Gill, Sarvajeet Singh, et Narendra Tuteja. 2010. « Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants ». *Plant physiology and biochemistry* 48 (12): 909–930.
- Goor, BJ van, et D. Wiersma. 1976. « Chemical forms of manganese and zinc in phloem exudates ». *Physiologia Plantarum* 36 (2): 213–216.
- Goudable, Joëlle, et Alain Favier. 1997. « Radicaux libres oxygénés et antioxydants ». *Nutrition clinique et métabolisme* 11 (2): 115–120.
- Grispen, Veerle MJ, Henk WJ Hakvoort, Tijs Blik, Jos AC Verkleij, et Henk Schat. 2011. « Combined expression of the Arabidopsis metallothionein MT2b and the heavy metal transporting ATPase HMA4 enhances cadmium tolerance and the root to shoot

- translocation of cadmium and zinc in tobacco ». *Environmental and Experimental Botany* 72 (1): 71–76.
- Gutteridge, John MC, et B. Halliwell. 1993. « Invited review free radicals in disease processes: a compilation of cause and consequence ». *Free radical research communications* 19 (3): 141–158.
- Haleng, Jeanine, Joël Pincemail, Jean-Olivier Defraigne, Corinne Charlier, et Jean-Paul Chapelle. 2007. « Le stress oxydant ». *Revue médicale de Liège* 62 (10): 628–38.
- Halliwell, B. Gutteridge. s. d. *JMC (2007) Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press.
- Halliwell, Barry. 1989. « Free radicals, reactive oxygen species and human disease: a critical evaluation with special reference to atherosclerosis. » *British journal of experimental pathology* 70 (6): 737.
- Halliwell, Barry, et John MC Gutteridge. 1990. « [1] Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview ». *Methods in enzymology* 186: 1–85.
- Hartikainen, Helinä, Tailin Xue, et Vieno Piironen. 2000. « Selenium as an anti-oxidant and pro-oxidant in ryegrass ». *Plant and Soil* 225 (1-2): 193–200.
- Hem, John David. 1985. *Study and interpretation of the chemical characteristics of natural water*. Vol. 2254. Department of the Interior, US Geological Survey.
- Hennebelle, T., S. Sahpaz, et F. Bailleul. 2004. « Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif ». *Phytothérapie* 2 (1): 3–6.
- Hoffman, David J., Harry M. Ohlendorf, Carolyn M. Marn, et Grey WP Pendleton. 1998. « Association of mercury and selenium with altered glutathione metabolism and oxidative stress in diving ducks from the San Francisco Bay region, USA ». *Environmental Toxicology and Chemistry* 17 (2): 167–172.
- Kabata-Pendias, A., et H. Pendias. 2001. « Trace elements in plants ». *Trace Element in Soils and Plants*, 73–98.
- KANOUN, Khadidja. 2011. « Contribution à l'étude phytochimique et activité antioxydante des extraits de *Myrtus communis* L.(Rayhane) de la région de Tlemcen (Honaine) ». <http://dspace.univ-tlemcen.dz/handle/112/268>.
- Koehler-Ramonatxo, Christelle. 2006. « Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydants ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires ». *Nutrition clinique et métabolisme* 20 (4): 165–177.
- Kosugi, Hiroko, et Kiyomi Kikugawa. 1985. « Thiobarbituric acid reaction of aldehydes and oxidized lipids in glacial acetic acid ». *Lipids* 20 (12): 915–921.
- Lee, Chi Won, Chun Ho Pak, Jong Myung Choi, et James R. Self. 1991. « MICRONUTRIENT TOXICITY IN FRENCH MARIGOLD TAGETES PATULA L. » *HortScience* 26 (6): 715–715.
- Lindau-Shepard, Barbara A., et Jacquelin B. Shaffer. 1993. « Expression of human catalase in acatalasemic murine SV-B2 cells confers protection from oxidative damage ». *Free Radical Biology and Medicine* 15 (6): 581–588.
- Loué, A. 1993. « Le fer: oligo-élément en agriculture ». *Nathan, Paris*, 45–87.
- Lowry, Oliver H., Nira J. Rosebrough, A. Lewis Farr, Rose J. Randall, et others. 1951. « Protein measurement with the Folin phenol reagent ». *J Biol Chem* 193 (1): 265–275.
- Machlin, Lawrence J., et Adrienne Bendich. 1987. « Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. » *The FASEB Journal* 1 (6): 441–445.
- Marcato, Claire-Emmanuelle. 2007. « Origine, devenir et impact du cuivre et du zinc des lisiers porcins. Rôle de la digestion anaérobie ».
- Martinez-Cayueta, M. 1995. « Oxygen free radicals and human disease ». *Biochimie* 77 (3): 147–161.

- Masella, Roberta, Roberta Di Benedetto, Rosaria Vari, Carmela Filesi, et Claudio Giovannini. 2005. « Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes ». *The Journal of nutritional biochemistry* 16 (10): 577–586.
- May, James M., et C. S. Contoreggi. 1982. « The mechanism of the insulin-like effects of ionic zinc. » *Journal of Biological Chemistry* 257 (8): 4362–4368.
- McCall, Mark R., et Balz Frei. 1999. « Can antioxidant vitamins materially reduce oxidative damage in humans? » *Free Radical Biology and Medicine* 26 (7): 1034–1053.
- McIntyre, Terry. 2003. « Phytoremediation of heavy metals from soils ». In *Phytoremediation*, 97–123. Springer. http://link.springer.com/10.1007/3-540-45991-X_4.
- Meziti, A. 2009. « Activité antioxydante des extraits des graines de *Nigella sativa* L.: étude in vitro et in vivo ». *Mémoire de magistère*, 41–49.
- Michel, F., D. Bonnefont-Rousselot, E. Mas, J. Draï, et P. Thérond. 2008. « Biomarqueurs de la peroxydation lipidique: aspects analytiques ». In *Annales de Biologie Clinique*, 66:605–620.
- Mize, Charles E., et Robert G. Langdon. 1962. « Hepatic glutathione reductase I. Purification and general kinetic properties ». *Journal of Biological Chemistry* 237 (5): 1589–1595.
- Niedernhofer, Laura J., J. Scott Daniels, Carol A. Rouzer, Rachel E. Greene, et Lawrence J. Marnett. 2003. « Malondialdehyde, a product of lipid peroxidation, is mutagenic in human cells ». *Journal of Biological Chemistry* 278 (33): 31426–31433.
- Nieman, R. H. 1965. « Expansion of bean leaves and its suppression by salinity ». *Plant Physiology* 40 (1): 156.
- Paciolla, C., S. De Leonardis, et S. Dipierro. 2011. « Effects of selenite and selenate on the antioxidant systems in *Senecio scandens* L ». *Plant Biosystems* 145 (1): 253–259.
- Pan, Yong. 2011. « Mitochondria, reactive oxygen species, and chronological aging: a message from yeast ». *Experimental gerontology* 46 (11): 847–852.
- Pandey, Nalini, et Chandra Prakash Sharma. 2002. « Effect of heavy metals Co 2+, Ni 2+ and Cd 2+ on growth and metabolism of cabbage ». *Plant Science* 163 (4): 753–758.
- Pérez-Sirvent, Carmen, Maria J. Martínez-Sánchez, Salvadora Martínez-López, Jaume Bech, et Nanthi Bolan. 2012. « Distribution and bioaccumulation of arsenic and antimony in *Dittrichia viscosa* growing in mining-affected semiarid soils in southeast Spain ». *Journal of Geochemical Exploration* 123: 128–135.
- Pincemail, Joël, Karine Bonjean, Karine Cayeux, et Jean-Olivier Defraigne. 2002. « Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante ». *Nutrition clinique et métabolisme* 16 (4): 233–239.
- Pories, Walter J., Edward G. Mansour, Fred R. Plecha, Arthur Flynn, et William H. Strain. 1976. « Metabolic factors affecting zinc metabolism in the surgical patient ». *Trace elements in human health and disease* 1: 115–141.
- Rascio, Nicoletta, et Flavia Navari-Izzo. 2011. « Heavy metal hyperaccumulating plants: how and why do they do it? And what makes them so interesting? » *Plant Science* 180 (2): 169–181.
- Rice-evans, Catherine A., Nicholas J. Miller, Paul G. Bolwell, Peter M. Bramley, et John B. Pridham. 1995. « The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids ». *Free radical research* 22 (4): 375–383.
- Rodier, Jean, et others. 1975. *An analysis of water, natural water, waste water, sea water: chemistry, bacteriology, biology*. Dunod. <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201300521354>.

- Rout, Gyana Ranjan, et Premananda Das. 2009. « Effect of metal toxicity on plant growth and metabolism: I. Zinc ». In *Sustainable Agriculture*, 873–884. Springer. http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-90-481-2666-8_53.
- Sadeghzadeh, B. 2013. « A review of zinc nutrition and plant breeding ». *Journal of soil science and plant nutrition* 13 (4): 905–927.
- Sanders, Brenda M., Kenneth D. Jenkins, William G. Sunda, et John D. Costlow. 1983. « Free cupric ion activity in seawater: effects on metallothionein and growth in crab larvae ». *Science* 222 (4619): 53–55.
- Serdar, Zehra, Kemal Aslan, Melahat Dirican, Emre Sarandöl, Dilek Yeşilbursa, et Akın Serdar. 2006. « Lipid and protein oxidation and antioxidant status in patients with angiographically proven coronary artery disease ». *Clinical biochemistry* 39 (8): 794–803.
- Sezgin, Naim, H. Kurtulus Ozcan, Goksel Demir, Semih Nemlioglu, et Cuma Bayat. 2004. « Determination of heavy metal concentrations in street dusts in Istanbul E-5 highway ». *Environment international* 29 (7): 979–985.
- Sheoran, V., A. S. Sheoran, et P. Poonia. 2009. « Phytomining: a review ». *Minerals Engineering* 22 (12): 1007–1019.
- Shimizu, Haruki, Yutaka Kiyohara, Isao Kato, Takanari Kitazono, Yumihiro Tanizaki, Michiaki Kubo, Hirofumi Ueno, Setsuro Ibayashi, Masatoshi Fujishima, et Mitsuo Iida. 2004. « Relationship Between Plasma Glutathione Levels and Cardiovascular Disease in a Defined Population The Hisayama Study ». *Stroke* 35 (9): 2072–2077.
- Shri, Manju, Smita Kumar, Debasis Chakrabarty, Prabodh Kumar Trivedi, Shekhar Mallick, Prashant Misra, Devesh Shukla, et al. 2009. « Effect of arsenic on growth, oxidative stress, and antioxidant system in rice seedlings ». *Ecotoxicology and environmental safety* 72 (4): 1102–1110.
- Shtangeeva, Irina, Roza Bali, et Andrew Harris. 2011. « Bioavailability and toxicity of antimony ». *Journal of Geochemical Exploration* 110 (1): 40–45.
- Sies, Helmut. 1999. « Glutathione and its role in cellular functions ». *Free Radical Biology and Medicine* 27 (9): 916–921.
- Singh, Anita, Rajesh Kumar Sharma, Madhoolika Agrawal, et Fiona M. Marshall. 2010. « Health risk assessment of heavy metals via dietary intake of foodstuffs from the wastewater irrigated site of a dry tropical area of India ». *Food and Chemical Toxicology* 48 (2): 611–619.
- Splittgerber, Allan G., et Al L. Tappel. 1979. « Inhibition of glutathione peroxidase by cadmium and other metal ions ». *Archives of biochemistry and biophysics* 197 (2): 534–542.
- Stadtman, Earl R., et Rodney L. Levine. 2000. « Protein oxidation ». *Annals of the New York Academy of Sciences* 899 (1): 191–208.
- Stamler, Jonathan S., et Adam Slivka. 1996. « Biological chemistry of thiols in the vasculature and in vascular-related disease ». *Nutrition Reviews* 54 (1): 1–30.
- Susarla, Sridhar, Victor F. Medina, et Steven C. McCutcheon. 2002. « Phytoremediation: an ecological solution to organic chemical contamination ». *Ecological Engineering* 18 (5): 647–658.
- Tiffin, Lee O. 1967. « Translocation of manganese, iron, cobalt, and zinc in tomato ». *Plant physiology* 42 (10): 1427–1432.
- Vaillant, N., F. Monnet, A. Hitmi, H. Sallanon, et A. Coudret. 2005. « Comparative study of responses in four *Datura* species to a zinc stress ». *Chemosphere* 59 (7): 1005–1013.
- Valavanidis, Athanasios, Thomais Vlahogianni, Manos Dassenakis, et Michael Scoullou. 2006. « Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to

- toxic environmental pollutants ». *Ecotoxicology and environmental safety* 64 (2): 178–189.
- Valko, Marian, C. J. Rhodes, Jan Moncol, M. M. Izakovic, et Milan Mazur. 2006. « Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer ». *Chemico-biological interactions* 160 (1): 1–40.
- Vaughan, D., P. C. DeKock, et B. G. Ord. 1982. « The nature and localization of superoxide dismutase in fronds of *Lemna gibba* L. and the effect of copper and zinc deficiency on its activity ». *Physiologia plantarum* 54 (3): 253–257.
- Vijayarangan, P., et G. Mahalakshmi. 2013. « Zinc toxicity in tomato plants ». *World Applied Sciences Journal* 24 (5): 649–653.
- White, Michael C., Fred D. Baker, Rufus L. Chaney, et A. Morris Decker. 1981. « Metal complexation in xylem fluid II. Theoretical equilibrium model and computational computer program ». *Plant Physiology* 67 (2): 301–310.
- Wong, Chi Ming, Amrita K. Cheema, Lihua Zhang, et Yuichiro J. Suzuki. 2008. « Protein carbonylation as a novel mechanism in redox signaling ». *Circulation research* 102 (3): 310–318.
- Yang, Xiaoe, Ying Feng, Zhenli He, et Peter J. Stoffella. 2005. « Molecular mechanisms of heavy metal hyperaccumulation and phytoremediation ». *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 18 (4): 339–353.
- Zhao, Fang-Jie, et Steve P. McGrath. 2009. « Biofortification and phytoremediation ». *Current opinion in plant biology* 12 (3): 373–380.

Annexes

Annexe1 : Composition et préparation du milieu de culture

Solution 1 : macroéléments (mg/ml)

Composants	Quantité pour 100 ml
Nitrate d'ammonium	165 mg
Chlorure de calcium	44 mg
Sulfate de magnésium	37 mg
Nitrate de potassium	190 mg
Phosphate monopotassique	17 mg

Solution 2 : microéléments (mg/ml)

Composants	Quantité pour 100 ml
Sulfate de fer	3 mg
ETDA dissodique	4 mg
Sulfate de manganèse	2,2 mg
Sulfate de zinc	1 mg
Acide borique	1 mg
Iodure de potassium	1 mg
Molybdate de sodium	1 mg
Sulfate de cuivre	1 mg
Chlorure de cobalt	1 mg

❖ **Préparation du milieu** : la préparation a été faite comme suit :

- 5 ml de solution1+ 5 ml de solution 2.
- Ajuster le volume jusqu'à 100 ml.
- Ajouter 3g de saccharose et 1g d'agar
- Agiter à l'aide d'un agitateur et régler le pH à 5.

Annexe 2 : Préparation de la courbe d'étalonnage du zinc

A. Préparation des réactifs

- Acide chlorhydrique (d=1,19)
- Solution du chlorure d'ammonium (10%)
- Solution du sulfite de sodium (10%)
- Solution du ferrocyanure de potassium (0,5%)

B. Préparation de la solution mère du Zn et des séries de dilution

Préparer :

- une solution mère avec une concentration de 1mg/ml de Zn dans l'eau distillée.
- une série de dilutions (de 0 à 200 mg/l) à partir de la solution mère du Zn (voir tableau ci-dessous).

Tableau 2: Préparation des mélanges réactionnels pour le dosage du Zn

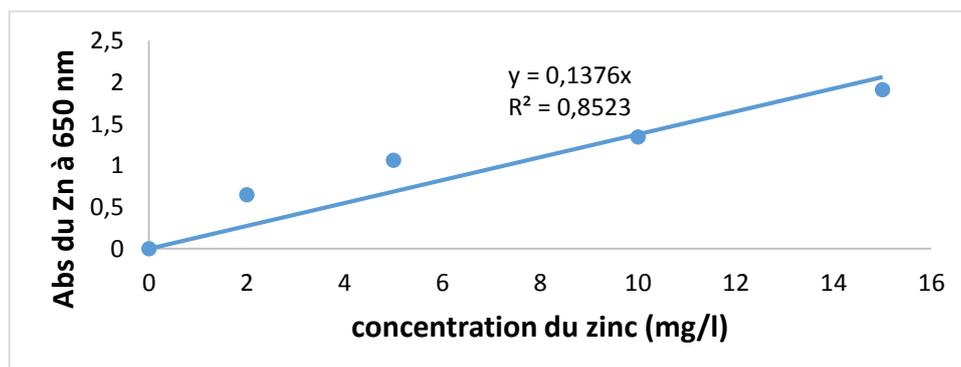
Concentration (mg/l)	Blanc	40	80	120	160	200
Solution mère du Zn (µl)	0	40	80	120	160	200
H ₂ O (µl)	1000	960	920	880	840	800
Acide chlorhydrique (µl)	400	400	400	400	400	400
Chlorure d'ammonium (µl)	800	800	800	800	800	800
Sulfite de sodium (une goutte)	1	1	1	1	1	1

-Agiter au vortex, puis ajouter dans chaque tube.

Ferrocyanure de potassium (µl)	240	240	240	240	240	240
--------------------------------	-----	-----	-----	-----	-----	-----

- Agiter au vortex et attendre 5min.
- Lire l'absorbance à 650nm.
- Tracer la courbe d'étalonnage du Zn.

C. Courbe d'étalonnage du Zn



Annexe 3 : Préparation de la courbe d'étalonnage des protéines

A. Composition de la solution mère (M)

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

Solution M= 1 ml (B) + 1 ml (C) + 98 ml (A)

B. Préparation du réactif de Folin

- * 10 ml du réactif de Folin ont dissous dans 10 ml de NaOH (0,1N).

C. Préparation de la BSA et de la série de dilution

Préparer :

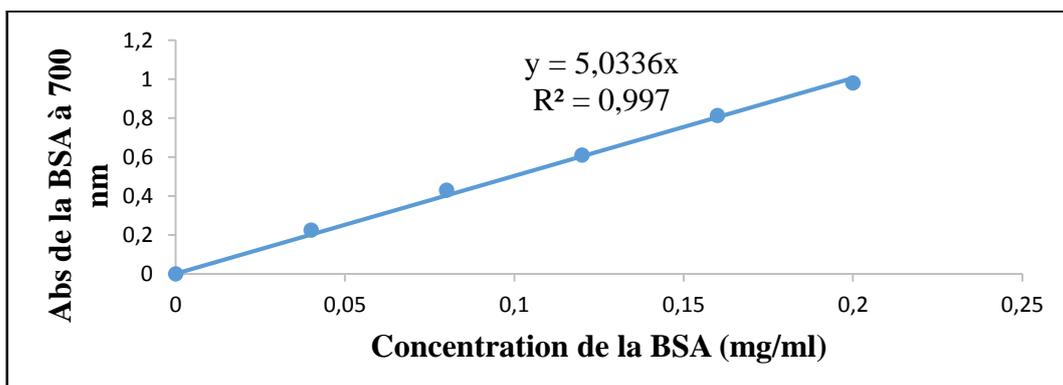
- une solution mère de la BSA avec une concentration de 1mg/ml dans l'eau distillée.
- Une série de dilution de la BSA de 0 à 0,2 mg/ml (voir tableau ci-dessous).

Tableau 3 : Préparation des séries de dilution de la BSA

	blanc	1/5	2/5	3/5	4/5	5/5
BSA (µl)	0	40	80	120	160	200
H ₂ O (µl)	200	160	120	80	40	0
Solution M ml	2	2	2	2	2	2

- Après 15 min, puis ajouter 200 µl du réactif de Folin.
- Agiter et incubé pendant 30 min à l'obscurité et à température ambiante.
- Lire l'absorbance à 700 nm.

D. Courbe d'étalonnage de la BSA



Résumé

Le but de cette étude est d'évaluer le niveau de stress oxydatif et le système de défense antioxydant chez une légumineuse poussant dans un milieu de culture traité par différentes concentrations en Zn.

La plante choisie pour cette étude est *Lens culinaris*. Elle a fait l'objet de l'analyse de la croissance, de l'évaluation des teneurs en protéines totale ainsi que de l'analyse des marqueurs de stress oxydatif (le malondialdéhyde MDA) et du système antioxydant (la peroxydase « POD » et la glutathion peroxydase « GPx »).

Les résultats obtenus montrent qu'à partir de 100µM, la croissance des lentilles est inversement proportionnelle à la concentration du Zn dans le milieu et que l'accumulation du métal est plus élevée dans les parties racinaires. Quand aux protéines, plus la concentration du Zn augmente, plus leur taux diminue. L'évaluation des activités enzymatiques indique que le déclin de la POD est concomitant à l'augmentation du GPx. L'activité de la GPx est maximale à 100000µM de Zn dans les deux parties de la plante alors que celle de la POD diminue par rapport aux plantes témoins.

Ce travail montre que le MDA est un vrai indicateur de stress oxydatif chez les lentilles. Ces dernières sont des plantes tolérantes au Zn dans le milieu de culture et dans leurs tissus en développant un système antioxydant puissant. Mais ce système s'épuise lorsque la concentration en zinc dépasse un certain seuil. Cela permet de déduire que *Lens culinaris* n'est pas un bon modèle pour la phytoremédiation des sols contaminés par le Zn.

Mots clés : *Lens culinaris*, croissance, stress oxydant, zinc, malondialdéhyde, GPx, POD.

The purpose of our study is to assess the level of oxidative stress and antioxidant defense system in a legume pushing in a culture medium Treaty by different concentrations of Zn.

The chosen plant for this study is *Lens culinaris*. It was the subject of the analysis of the growth, the assessment of the levels of total protein as well as the analysis of markers of oxidative stress (malondialdehyde “MDA”) and the antioxidant system (the peroxidase “POD” and glutathione peroxidase “GPx”).

The obtained results show that from 100 μ M, the growth of the lenses is inversely proportional to the concentration of Zn in the middle and that the accumulation of the metal is higher in the root. Concerning proteins, the more the concentration of Zn increases, the more their rate decreases. The evaluation of enzymatic activities indicated that the decline of the POD is concomitant to the increase of the GPx. The maximal activity of GPx is at 100000 μ M of Zn in the two parts of the plant, while that of the POD decreases compared with control plants.

This work shows that the MDA is a true indicator of oxidative stress in the lenses. These are tolerant plants in Zn in the culture medium and in their fabrics in developing a system powerful antioxidant. However, this system depleted when the concentration in zinc exceeds a certain threshold. This allows you to deduct that *Lens culinaris* is not a good model for the phytoremediation of soils contaminated by the Zn.

Keywords : *Lens culinaris*, Growth, Oxidative stress, Zinc, Malondialdehyde, GPx,POD.

الغرض من هذه الدراسة هو تقييم مستوى الأوكسدة ومنظومة الدفاع المضادة للأوكسدة على نوع من البقول نمت في وسط استنبات معامل بتراكيز مختلفة من الزنك.

النبته المختارة لهذه الدراسة هي *Lens culinaris* ما يعرف بالعدس. ولقد قمنا بهذا الموضوع لأجل تحليل النمو و تقييم محتوى البروتين الكلي وتحليل علامات الأوكسدة (فوق أكسدة الليبيدات (MDA) وأنشطة الأنزيمات المضادة للأوكسدة (البيروكسيداز (POD) و الجلوتاثيون بيروكسيداز (GPx)).

النتائج المتحصل عليها تبين أن ابتداءا من $100\mu\text{M}$, نمو العدس يتناسب عكسيا مع تركيز الزنك في الوسط و تراكم المعدن يكون أعلى في الأجزاء الجذرية. أما بالنسبة للبروتينات، كلما زاد تركيز الزنك في الوسط نقص معدلها في النبتة. وفيما يخص تقييم الأنشطة الأنزيمية فقد تبين أن تراجع إنزيم POD يصاحبه زيادة في GPx. حيث يبلغ إنزيم GPx نشاطه الأقصى في $100000\mu\text{M}$ من تركيز الزنك في كلتا أجزاء النبتة في حين أن نشاط POD يتناقص مقارنة مع النباتات الشاهدة.

لقد أظهر هذا العمل أن فوق أكسدة الليبيدات (MDA) هو مؤشر حقيقي للأوكسدة عند العدس. وتعتبر هذه الأخيرة من النباتات المنكيفة مع الزنك في الوسط وفي أنسجتها وذلك بتطوير نظام مضاد للأوكسدة فعال، لكن يتم استنفاد هذا النظام عندما يتجاوز تركيز الزنك عتبة معينة، وهذا ما يسمح باستنتاج أن *Lens culinaris* ليس هو النبات النموذجي للمعالجة النباتية للأتربة الملوثة بالزنك.

الكلمات المفتاحية: *Lens culinaris*, النمو, الأوكسدة, الزنك, فوق أكسدة الليبيدات, GPx, POD.

Lens culinaris est-elle une plante modèle pour la phytoremédiation?
Détermination du niveau d'accumulation du Zn et du statut oxydatif de la plante.

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention de diplôme de Master en Biochimie Moléculaire et Santé.

Résumé :

Le but de cette étude est d'évaluer le niveau de stress oxydatif et le système de défense antioxydant chez une légumineuse poussant dans un milieu de culture traité par différentes concentrations en Zn.

La plante choisie pour cette étude est *Lens culinaris*. Elle a fait l'objet de l'analyse de la croissance, de l'évaluation des teneurs en protéines totale ainsi que de l'analyse des marqueurs de stress oxydatif (le malondialdéhyde MDA) et du système antioxydant (la peroxydase « POD » et la glutathion peroxydase « GPx »).

Les résultats obtenus montrent qu'à partir de 100µM, la croissance des lentilles est inversement proportionnelle à la concentration du Zn dans le milieu et que l'accumulation du métal est plus élevée dans les parties racinaires. Quand aux protéines, plus la concentration du Zn augmente, plus leur taux diminue. L'évaluation des activités enzymatiques indique que le déclin de la POD est concomitant à l'augmentation du GPx. L'activité de la GPx est maximale à 100000µM de Zn dans les deux parties de la plante alors que celle de la POD diminue par rapport aux plantes témoins.

Ce travail montre que le MDA est un vrai indicateur de stress oxydatif chez les lentilles. Ces dernières sont des plantes tolérantes au Zn dans le milieu de culture et dans leurs tissus en développant un système antioxydant puissant. Mais ce système s'épuise lorsque la concentration en zinc dépasse un certain seuil. Cela permet de déduire que *Lens culinaris* ne représente pas un bon modèle pour la phytoremédiation des sols contaminés par le Zn.

Mots clés : *Lens culinaris*, croissance, stress oxydant, zinc, malondialdéhyde, GPx, POD.

Laboratoire de recherche : Biologie et Environnement

Jury d'évaluation :

Présidente du jury :	Mme CHENTLI A.	MCB- UFM Constantine
Encadreur :	Mme BENHAMDI A.	MCB- UFM Constantine
Examinatrice :	Mme BENCHIHEUB M.	MCB- UFM Constantine
Examinatrice :	Mme CHERFIA R.	MAB- UFM Constantine

Date de soutenance : 04/07/2016

