

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Constantine 1
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biochimie-Biologie Cellulaire et Moléculaire



N° d'Ordre :

N° de Série :

Thèse

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat 3ème cycle LMD

Option : Biochimie et Biotechnologie

Préparée par

BENHAMDI Asma

Thème

**Etude des enzymes de stress oxydatif chez
Hedysarum pallidum Desf. et *Lygeum spartum* L. en
réponse à la pollution du sol par l'antimoine.**

Soutenue le 06/07/2014

Devant le Jury :

Président :	KHELIFI D.	Prof. Université Constantine 1
Directrice de thèse :	MECHAKRA A.	Prof. Université Constantine 1
Co-directrice de thèse :	RACHED-MOSBAH O.	Prof. Université Constantine 1
Examineurs :	ABROUS-BELBACHIR O.	Prof. Université USTHB Alger
	BOUSSEBOUA H.	Prof. ENSB, Constantine
	LAHOUEL M.	Prof. Université Jijel

Année Universitaire 2013-2014

Remerciements

Le thème de cette thèse a été proposé par Mme MECHAKRA A. Professeur à l'université de Constantine 1 et suivi par Mme le Professeur RACHED O. Directrice du laboratoire de Biologie et Environnement de l'université de Constantine 1. Les travaux de cette thèse ont été réalisés en grande partie au niveau du laboratoire de Biologie et Environnement de Constantine 1 et en partie au sein du laboratoire de Biochimie et de Physiologie moléculaire de plantes (BPMP), Montpellier, France.

Préalablement à la présentation du travail effectué je tiens à témoigner ma profonde gratitude à mes deux encadrantes :

Mme le professeur MECHAKRA A. ma Directrice de thèse qui m'a accordé sa confiance pour réaliser cette thèse et s'est montrée très patiente avec moi en me prodiguant ses précieux conseils de façon ininterrompue.

Mme le Professeur RACHED O. ma co-directrice de thèse qui a organisé mes différentes sorties sur terrain et m'y a accompagné à chaque fois pour l'échantillonnage des plantes et du sol ainsi que la récolte des graines des plantes. Ses orientations opportunes et son suivi de près ont contribué efficacement à la réalisation de cette thèse du début à la fin.

J'adresse également mes vifs remerciements à Mr le Professeur BERTHOMIEU P. (Directeur de l'équipe de l'adaptation des plantes aux métaux lourds à l'unité de BPMP, Montpellier, France) pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et supervisée utilement durant le stage que j'ai effectué sous son égide en matière de biologie moléculaire et qui m'a été très bénéfique.

J'adresse aussi mes vifs remerciements Mr KHLIFI D. Professeur à l'université de Constantine 1 pour l'honneur qu'il me fait en daignant présider ce jury.

Je remercie également Mr le Professeur BOUSABOUA H. Directeur de l'école nationale supérieure de biotechnologie de Constantine pour l'intérêt apporté à mon travail en ayant accepté de l'examiner.

Je témoigne aussi ma reconnaissance à Mme ABROUS-BELBACHIR O. Professeur à l'Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene Alger qui a accepté spontanément de venir à Constantine pour examiner mon travail. Je lui exprime mes sentiments les plus respectueux.

Je remercie aussi Mr le Professeur LAHOUEL M. à l'Université Mohamed Seddik Ben Yahia Jijel d'avoir bien voulu accepter de se déplacer lui aussi à Constantine aux fins d'examen de ma thèse.

Je témoigne également toute ma gratitude à Mme le Professeur MERAIHI Z. qui a suivi de près notre promotion durant toutes les étapes de notre cursus universitaire.

Je tiens aussi à adresser mes remerciements à toute l'équipe du laboratoire de Biologie et Environnement de l'université Constantine1 et spécialement à Dalel l'ex ingénieur du laboratoire.

Je n'oublie pas l'équipe « adaptation des plantes aux métaux lourds de l'unité de BPMP de Montpellier », particulièrement Laurence pour sa précieuse collaboration et Oriane dont la sympathie ne s'est jamais démentie pour moi durant tout mon séjour.

Enfin je remercie toutes les personnes qui m'ont aidé de près ou de loin pour la réalisation de cette thèse.

Dédicaces

Je dédie cette thèse à mon père, ma mère et à toutes les personnes qui ont montré de l'intérêt pour mon travail, notamment ma famille et mes amies, particulièrement Mr

GHAZLAOUI Y.

Table des matières

Table des matières	i
Liste des figures	iv
Liste des tableaux	v
Liste des abréviations	vi
Introduction	1
PREMIERE PARTIE : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	
1. Pollution de l'environnement par les métaux lourds et les métalloïdes	3
1.1. Définition des métaux lourds et des métalloïdes.....	3
1.2. Origine de la pollution par les métaux lourds.....	3
1.3. Métaux lourds et leurs effets sur les organismes vivants (plantes).....	4
2. Phytoremédiation	6
2.1. Absorption des métaux lourds par les plantes et leurs mécanismes de tolérance.....	7
2.2. Processus majeurs impliqués dans l'accumulation des éléments traces métalliques par les plantes.....	8
2.2.1. Bio activation dans la rhizosphère.....	9
2.2.2. Absorption et le transport des métaux à travers le xyleme.....	10
2.2.3. Distribution, désintoxication et séquestration des métaux.....	11
3. Pollution par l'antimoine et l'arsenic	12
3.1. Origine des contaminations à l'arsenic et à l'antimoine.....	12
3.2. Influence des paramètres physicochimiques et des principaux constituants du sol sur la mobilité de l'antimoine et de l'arsenic.....	12
3.3. Accumulation de l'arsenic et de l'antimoine chez les plantes.....	13
3.4. Toxicité des plantes par l'arsenic et l'antimoine.....	14
3.5. Mécanismes d'absorption et d'accumulation de l'arsenic et de l'antimoine par les plantes.....	15
3.5.1. Absorption des ions arsénates et antimonates.....	15
3.5.2. Absorption des ions arsénites et antimonites.....	15
3.5.3. Transport et accumulation de l'arsenic et de l'antimoine par les plantes.....	16
4. Plantes et le stress oxydatif	17
4.1. Espèces réactives de l'oxygène.....	18
4.2. Sources des espèces réactives de l'oxygène dans les plantes.....	19
4.2.1. Mitochondries.....	20
4.2.2. Chloroplastes.....	20
4.2.3. Peroxysomes.....	21
4.3. Autres sources des radicaux libres dans la cellule.....	21
5. Métaux lourds et stress oxydatifs chez les plantes	21
5.1. Mécanismes de l'induction du stress oxydatif par les métaux.....	22
5.2. Conséquence de l'induction du stress oxydatif par les métaux dans les plantes.....	23
5.2.1. Peroxydation lipidique (LPO).....	23
5.2.2. Oxydation des protéines.....	25
5.2.3. Dommages de l'ADN.....	26
6. Les antioxydants	26
6.1 Les principaux antioxydants non enzymatiques.....	27
6.1.1. L'ascorbate ou vitamine C.....	27
6.1.2. Le glutathion.....	27

6.1.3. La proline.....	29
6.1.4. L'α-Tocopherols (Vitamin E).....	29
6.1.5. Les carotenoides (Car).....	30
6.1.6. Les flavonoides.....	30
6.2. Les enzymes antioxydantes.....	31
6.2.1. La superoxyde dismutase.....	31
6.2.2. La catalase.....	32
6.2.3. La peroxydase.....	32
6.2.4. Les enzymes du cycle de l'ascorbate.....	33
6.2.5. Les enzymes du cycle d'oxydoréduction du glutathion.....	34
6.2.5.1 La glutathion peroxydase (GPX).....	34
6.2.2.2 La glutathion réductase (GR).....	35
7. Les principales enzymes de détoxification des métaux lourds.....	35
7.1. La glutathion-S transferase (GST).....	35
7.1.1. Rôle de La GST de la classe tau dans la détoxification des métaux.....	37
7.1.2. Mécanisme de détoxification des métaux par la GST.....	37
7.2. La phytochélatine synthase.....	38

DEUXIÈME PARTIE : MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Zone d'étude.....	40
2. Echantillonnage du sol et des plantes.....	40
3. Méthodes de dosage biochimiques.....	40
3.1. Evaluation du niveau du malonedialdéhyde (MDA).....	40
3.2. Mesure des activités des enzymes antioxydantes	41
3.2.1. Préparation des échantillons.....	41
3.2.2. La superoxyde dismutase (SOD).....	41
3.2.3. La catalase (CAT)	42
3.2.4. La peroxydase (POD).....	42
3.2.5. L'ascorbate peroxydase (APX)	42
3.2.6. La glutathion S-transferase (GST).....	43
3.3. Dosage des protéines..... ;.....	43
4. Culture <i>in-vitro</i> de deux populations d'<i>H pallidum</i>.....	43
4.1. Matériel végétal.....	43
4.2. Milieu utilisé et conditions de culture in vitro.....	44
5. Clonage des gènes de la GSTtau et de l'actine.....	44
5.1. Choix des amorces.....	44
5.2. Extraction de l'ADN génomique de <i>H pallidum</i>	44
5.3. Test des amorces et amplification des gènes à partir de l'ADN génomique.....	45
5.4. Séparation de l'ADN par électrophorèse.....	46
5.5. Extraction et purification de l'ADN des gènes amplifiés.....	46
5.6. Plasmide et souches bactériennes utilisées.....	47
5.7. Culture bactérienne et extraction des plasmides.....	47
5.8. Digestion enzymatique des fragments d'ADN d'intérêt et des plasmides.....	48
5.9. Purification et précipitation des fragments de GST et d'actine.....	48
5.10. Clonage des produits de la PCR.....	48
6. Analyse statistique.....	49

TROISIÈME PARTIE : RÉSULTATS ET DISCUSSION

Chapitre 1 : Effet de Sb et As du sol sur la peroxydation lipidique et les enzymes de stress oxydatif chez *H. pallidum* et *L. spartum*.

1. Choix des plantes	50
2. concentrations des métalloïdes dans les zones d'échantillonnage	51
3. Accumulation de l'antimoine et de l'arsenic par les deux plantes	51
4. Effet de l'antimoine et de l'arsenic sur la peroxydation lipidique	54
5. Résultats les activités antioxydantes chez <i>H. pallidum</i> et <i>L. spartum</i>	55
5.1. La superoxyde dismutase (SOD).....	56
5.2. La catalase (CAT).....	57
5.3. La peroxydase (POD).....	58
5.4. L'ascorbate peroxydase (APX).....	59
5.5. La Glutathion S-transférase (GST).....	61
6. Interaction entre le MDA et les activités enzymatiques pour les deux parties des deux espèces par rapport aux zones	62
Conclusion	64

Chapitre 2 : Séquençage des gènes de la GST tau et de l'actine chez deux populations d'*H. pallidum*

1. Recherche des gènes codant la GST et l'actine à partir de l'ADN génomique des deux populations d'<i>H. pallidum</i>	65
1.1. Détermination des amorces pour l'amplification des gènes de la GST et de l'actine.....	65
1.2. Test des amorces et clonage des fragments amplifiés par PCR.....	68
2. Séquençage des fragments clonés et comparaison de séquences	68
2.1. Fragments des gènes des actines.....	68
2.2. Fragments des gènes de la GST clonés.....	72
3. Comparaison des séquences clonées avec celles des autres Fabaceae	74
4. Structure générale des gènes de GST	75
4.1. Domaine N-terminal (site G).....	76
4.2. Domaine C-terminal (site H).....	77
Conclusion	77
CONCLUSION GÉNÉRALE	79
Références bibliographiques	82
Annexes	
Résumés	
Publications	

Liste des figures

- Figure 1 :** Mécanismes impliqués dans l'hyper tolérance et la distribution des ETM dans les plantes.
- Figure 2 :** Mécanismes moléculaires impliqués dans l'accumulation de métaux de transition par les plantes.
- Figure 3 :** Translocation des métaux lourds des racines vers les feuilles chez les plantes hyperaccumulatrices.
- Figure 4 :** Représentation schématique des principaux processus impliqués dans l'absorption, le métabolisme, la séquestration vacuolaire et la translocation de l'As dans les racines des plantes.
- Figure 5 :** Etapes successives de la réduction de l'oxygène.
- Figure 6 :** principaux sites de production des ROS dans la cellule végétale.
- Figure 7 :** Synthèse et dégradation de l'acide ascorbique.
- Figure 8 :** Biosynthèse et cycle d'oxydoréduction du glutathion.
- Figure 9 :** Cycle de l'ascorbate-glutathion.
- Figure 10 :** Détoxification des métaux lourds par le glutathion dans les plantes.
- Figure 11 :** Modèles schématiques pour la fonction de la phytochélatine synthase.
- Figure 12 :** Carte de restriction du plasmide Blue Scribe KS+.
- Figure 13 :** Evaluation du niveau du MDA dans les deux plantes *H. pallidum* et *L. spartum* collectées dans l'ancienne zone minière d'antimoine de Djebel Hamimat.
- Figure 14 :** Activités de la SOD des racines et des parties aériennes de *H. pallidum* et *L. spartum*.
- Figure 15 :** Activités de la CAT des racines et des parties aériennes de *H. pallidum* et *L. spartum*.
- Figure 16 :** Activités de la POD des racines et des parties aériennes de *H. pallidum* et *L. spartum*.
- Figure 17 :** Activités de l'APX des racines et des parties aériennes de *H. pallidum* et *L. spartum*.
- Figure 18 :** Activités de la GST des racines et des parties aériennes de *H. pallidum* et *L. spartum*.
- Figure 19 :** Arbre phylogénétique des séquences de gènes de GST tau de *Caragana korchinski*, *Medicago*.
- Figure 20 :** Séquences d'actine de *Caragana korshinskii* et de *Hedysarum coronarium*.
- Figure 21 :** Séparation par électrophorèse des fragments de gènes de GST (a), d'actine 1 (b) et d'actine 2 (c) amplifiés par PCR avant et après clonage dans le plasmide pBS KS+.
- Figure 22 :** Alignement des séquences nucléiques et protéiques des fragments de gènes de l'actine 1 et 3 et des fragments de gènes de l'actine 2 des feuilles des deux populations d'*H. pallidum*.
- Figure 23 :** Alignement des séquences des nucléiques et protéiques des gènes des GST tau des feuilles des deux populations d'*H. pallidum*.
- Figure 24 :** Alignement multiple des séquences protéiques des fragments de gènes des GST tau1 et 2 des feuilles des deux populations d'*H. pallidum* et de quelques fabacées.
- Figure 25 :** Structure tridimensionnelle de PtGSTU2.

Liste des tableaux

- Tableau 1 :** Les enzymes antioxydantes majeures impliquées dans la détoxification des ROS.
- Tableau 2 :** Les différentes classes de GST communes dans les plantes.
- Tableau 3 :** Les différents couples d'amorces choisis pour l'amplification de quelques gènes de GST tau et d'actine d'*H. pallidum*.
- Tableau 4 :** Les différents couples d'amorces pour l'amplification de l'ADNc de la GST et de l'actine.
- Tableau 5 :** Teneurs en Sb et As des sols des zones étudiées.
- Tableau 6 :** Bioconcentration de Sb et d'As (mg.kg⁻¹) dans les deux parties d'*H. pallidum* et de *L. spartum*.
- Tableau 7 :** ANOVA à trois facteurs (zones, espèces et parties) pour la MDA et les activités des enzymes antioxydantes.
- Tableau 8 :** Pourcentage d'identité entre les séquences protéiques de GST tau et d'actine d'*H. pallidum* et des autres Fabaceae.

Liste des abréviations

ABC	: ATP binding cassette
ABCC	: ATP binding-cassette C Transporter
AGPI	: Acides gras polyinsaturés
APX	: Ascorbate peroxydase
AR	: Arséniate réductase
AsA-GSH	: Ascorbate-glutathione cycle
ASC	: Ascorbate
CAT	: Aatalase
CAX	: Cation Exchangers
CAX	: Mining cation (CAX) transporter
CBP4	: Calmodulin-binding protein
CDF	: Cation Diffusion Facilitators;
Chl	: Chlorophylle
Cl-	: Chlorure
COPT	: Copper (Cu) transporter
DHAR	: Dehydroascorbate reductase
DHAR	: Déhydroascorbate réductase
DW	: Dry weight
ERO	: Espèces réactives de l'oxygène
ETC	: Chaîne de transport d'électrons
ETM	: Eléments traces métalliques
FDR3	: Ferric Reductase Defective 3
GPX	: Glutathion peroxydase
GR	: Glutathion réductase
GSH	: Glutathion
GST	: Glutathion S-Transférase
H-ATPase	: Pompe ATPasique protons
HM	: Heavy Metals
HMA	: Heavy Metal transporting ATPases
HMA3	: heavy metal ATPase 3
HMA4	: Heavy metal transporting ATPases4
HNE	: 4-Hydroxy-2-nonenal
IRT	: Iron-regulated transporter
IPTG	: Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
LeGSTU1	: <i>Lycopersicon esculentum</i> GST tau 1
LPO	: Lipid peroxidation
MDA	: Malondialdéhyde
MDHAR	: Monodehydroascorbate reductase
Mt	: Metallothioneine
MT2b	: Metallothioneine2b
MTP	: <i>Metal</i> tolerance proteins
NA	: Nicotinamine
NADH	: Nicotinamide adénine dinucléotide hydrogène
NIP	: Nodulin 26-like Intrinsic Proteins;
NO ₃ -	: Nitrate
P5C	: D1-pyrroline-5-carboxylate d'éthyle
P5CDH	: P5C déshydrogénase

P5CR :	: D1-pyrroline-5-carboxylate reductase.
P5CS	: D1-pyrroline-5-carboxylate synthetase
pBSK	: p Bluescript SK
PC	: Phytochélatines
POD	: peroxydase
Prodh	: Proline déshydrogénase (oxydase)
PSI	: Photosystème I
PSII	: Photosystème II
PtGSTU2	: <i>Pinus tabulaeformis</i> GST tau2
ROS	: Reactive oxygen species
Sb	: Antimoine
SEM	: Standard error of the mean
SOD	: Superoxyde dismutase
VTE1	: Tocopherol cyclase
X-GAL	: 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside
XOD	: xanthine oxydase
YSL	: Yellow Strip 1-Like Proteins;
ZIP	: Zinc-regulated transporter Iron-regulated transporter Proteins.
γ -EC	: γ -glutamylcystéine
γ -TMT	: γ -tocopherol methyl transferase
γ -ECS	: γ -glutamylcystéine synthétase
dNTP	: deoxyribonucleoside triphosphate
PSTI	: <i>Providencia stuartii</i>
pUC	: Plasmide of University of California

INTRODUCTION

La pollution de l'environnement par les métaux lourds et les métalloïdes est un problème croissant dans le monde. Ces métaux sont biopersistants et entraînent des effets graves sur les différents milieux : perturbation des écosystèmes et détérioration des sols, des eaux de surface, des forêts et des cultures. Les principales causes de cette pollution sont liées aux activités humaines, telles que l'exploitation minière et la fusion des minerais.

L'Union européenne et l'Agence américaine de protection de l'environnement ont estimé que l'antimoine et l'arsenic sont les polluants qui suscitent le plus d'intérêt parce qu'ils sont dangereux pour la santé humaine et sont même cancérigènes (EU consul, 1976; USEPA, 1998).

Lorsque les plantes sont exposées à des niveaux élevés de métaux lourds, il y a induction du stress oxydatif, ce qui provoque une cascade de réactions qui endommagent les membranes cellulaires, les acides nucléiques et les pigments des chloroplastes. Pour se protéger contre ce stress, les plantes produisent des enzymes antioxydantes ainsi que des composés non enzymatiques (Somashekaraiah et al., 1992), ce qui permet le maintien d'une capacité antioxydante élevée dans les cellules et l'augmentation de la tolérance au stress. Le rôle des mécanismes de défense antioxydants cellulaires contre les métalloïdes (Sb et As) a été décrit chez quelques plantes supérieures (Feng et al., 2009; Pan et al., 2011) en milieu expérimental, mais la bibliographie ne mentionne aucune étude sur les effets de l'antimoine et de l'arsenic sur la réponse antioxydante chez les végétaux dans les milieux naturels.

Une étude, effectuée précédemment sur les communautés végétales (Rached-Mosbah et Gardou, 1988) d'une mine d'antimoine abandonnée (nord-est de l'Algérie), a mis en évidence des niveaux très élevés de Sb dans les sols qui entourent les déblais de mines (de 9 à 22 650 mg / kg), entraînant des modifications de la végétation spontanée. Un certain nombre d'espèces végétales a pu survivre sur les sols les plus pollués par l'antimoine. L'analyse des parties aériennes de quelques-unes de ces espèces végétales a montré que certaines d'entre elles se sont développées sur les dits sols en limitant l'absorption du Sb, tandis que d'autres ont permis son accumulation dans leurs parties supérieures (Rached-Mosbah et al., 1992). Parmi ces espèces, *Hedysarum pallidum* Desf, une Fabaceae, concentre jusqu'à 53 mg/kg de Sb dans ses parties supérieures et *Lygeum spartum* L., une Poaceae, prélève une quantité de Sb ne dépassant pas 17,5 mg/kg. Cependant, au moment de l'étude suscitée, les sols des déblais de mines étaient dénudés de végétation et les espèces végétales n'avaient été échantillonnées que sur les sols les entourant. De plus, l'arsenic, connu pour accompagner

souvent le Sb n'avait pas été analysé à cette époque. La période écoulée depuis l'étude en question laisse supposer que ces deux espèces seraient en mesure d'accumuler de plus grandes quantités de Sb que celles déterminées à ce moment, qu'elles présenteraient des concentrations élevées d'As et qu'elles auraient développé des stratégies différentes dans leurs modes de prélèvement des deux métalloïdes.

Une autre hypothèse est que les concentrations élevées en Sb et en As dans le sol joueraient un rôle primordial dans l'induction d'un stress oxydatif et de réponses antioxydantes chez les deux plantes, *H. pallidum* et *L. spartum*. Leur effet devrait être comparable à celui obtenu, par d'autres auteurs, dans des conditions expérimentales pour d'autres plantes avec les mêmes métalloïdes ou d'autres éléments traces.

Il est également supposé que l'adaptation d'*H. pallidum* aux teneurs excessives de Sb et d'As se serait traduite par une expression plus importante d'un ou de plusieurs gènes d'une des enzymes antioxydantes (la GST) de sa population des déblais de mine, par rapport à sa population des zones non contaminées.

En première partie et pour expliquer ces hypothèses, le niveau de la peroxydation lipidique et les activités des enzymes antioxydantes (SOD, CAT, POD, APX et GST) ont été déterminées chez *H. pallidum* et *L. spartum*. Préalablement à ces déterminations, les deux plantes ont été échantillonnées à partir de classes de concentrations croissantes des deux métalloïdes dans le sol. Pour cela, notre étude s'est basée sur les résultats des dosages de Sb et As réalisés antérieurement dans le sol et dans les plantes.

La deuxième partie correspond à l'analyse des séquences de quelques gènes de la GST *tau* chez deux populations d'*H. pallidum*. Elle a nécessité la réalisation des étapes suivantes :

- la culture *in-vitro* des graines d'*Hedysarum pallidum* .
- le séquençage des gènes de l'actine et de la GST des deux populations d'*H. pallidum*.

PREMIÈRE PARTIE :
SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Pollution de l'environnement par les métaux lourds et les métalloïdes

L'intensification des activités humaines, notamment industrielle et agricole et la consommation croissante de l'énergie fossile ont contribué au cours de ces dernières décennies à la contamination des agroécosystèmes par les métaux lourds (Chiffolleau and Claisse, 2001). Ces derniers représentent un groupe hétérogène d'éléments chimiques. Certains d'entre eux, comme le fer et le cuivre, sont considérés comme essentiels pour la nutrition et les activités métaboliques de l'organisme vivant, tandis que d'autres, tels que le cadmium, ne sont jusqu'à présent pas reconnus comme remplissant une fonction chez les êtres vivants (Yang et al., 2005; Zhang et al., 2009).

1.1. Définition des métaux lourds et des métalloïdes

Les métaux lourds sont un groupe d'éléments inorganiques distribués largement dans la nature : eau, sol, air et différentes formes d'organismes. On parle généralement de métaux lourds pour les éléments métalliques caractérisés par une masse volumique supérieure à 5 kg par décimètre cube. Ce sont des composants naturels de l'écorce terrestre présents en général en quantité très faible. C'est pour cette raison que les scientifiques les appellent « éléments traces métalliques (ETM) » (Chiffolleau and Claisse, 2001) Certains métaux présents dans l'environnement jouent un rôle important dans la cellule (cuivre, fer, manganèse, nickel et zinc, ...). D'autres, comme le cadmium, le plomb et des métalloïdes tels que l'antimoine et l'arsenic, ne sont pas nécessaires à la vie et sont préjudiciables dans tous les cas (Zhang et al., 2009)

Les métalloïdes sont des éléments qui ne présentent, à l'état de corps simples, ni les caractéristiques des métaux, ni les caractéristiques des non-métaux. En général, ils n'ont pas l'éclat dit métallique et sont de mauvais conducteurs électriques. Ils ont une densité relativement faible. Ils sont toujours électronégatifs et peuvent se combiner avec les métaux pour former des sels. Parmi les métalloïdes nous pouvons citer B, Si, Ge, As, Sb et Te (Naquet and Hanriot, 1890).

1.2. Origine de la pollution par les métaux lourds

La présence des métaux lourds dans l'environnement est due aux activités agricole et industrielle (Khan, 2005), telles que l'utilisation des engrais et des pesticides, l'émission des fonderies métallurgiques et des incinérateurs d'ordures, l'exploitation minière, la combustion des

carburants, la galvanoplastie, etc (Adamis et al., 2004). Toutes ces sources conduisent à l'accumulation des métaux dans le sol, les eaux et l'air et provoquent la pollution de l'environnement (Cabrera et al., 2006).

1.3. Métaux lourds et leurs effets sur les organismes vivants

Si certains éléments métalliques ou oligo-éléments (Fe, Mn, Zn, Cu, Mo, Ni), présents à l'état de traces, sont essentiels pour l'organisme, l'accroissement de leur concentration peut représenter un danger pour les êtres vivants. Les autres éléments comme le plomb, le mercure, le cadmium, le chrome, le cobalt, l'arsenic et l'antimoine ne sont pas nécessaires aux activités métaboliques et sont généralement toxiques à faible concentration (Adriano, 2001; Alkorta et al., 2004).

La contamination des milieux solide et aquatique par les métaux provoque l'accumulation de ces derniers dans les plantes, *via* un transfert sol-plante et chez les humains et les animaux, à travers la chaîne alimentaire (Khan, 2005; Khan et al., 2008). L'accumulation des métaux chez les humains et les animaux induit des mutations au niveau de l'ADN, en donnant naissance à différents types de cancers (Yang et al., 2005), ainsi qu'un retard dans la croissance et une inhibition des métabolismes cellulaires. Par exemple, l'arsenate dissodium (l'analogue chimique du phosphate) inhibe la phosphorylation oxydative alors que le plomb se lie aux groupements prosthétiques et inhibe la formation du complexe de l'hème (Schröder et al., 2009).

Le risque majeur des métaux est leur persistance pour une longue durée. Par exemple, le plomb est retenu dans le sol de 150 à 5000 ans et garde une concentration élevée pour plus de 150 ans dans le sol après contamination (Yang et al., 2005). L'effet commun de tous les métaux et les métalloïdes est la production des espèces réactives d'oxygène (Zhang et al., 2009).

Les plantes exposées à des niveaux élevés de cadmium (Cd) présentent des symptômes visibles de dommages (chlorose, inhibition de la croissance, brunissement des racines) ainsi que d'autres symptômes (réduction de la photosynthèse, de l'absorption d'eau et des nutriments et même la mort cellulaire) (Wójcik and Tukiendorf, 2004; Mohanpuria et al., 2007).

Dans les sols contaminés par le cadmium, le zinc (Zn) est toujours présent. Les fortes concentrations en Zn empêchent de nombreuses fonctions métaboliques des plantes et se traduisent par un retard de croissance et même une sénescence. L'excès de zinc provoque la

chlorose chez les jeunes feuilles, qui peut s'étendre aux feuilles plus âgées. Ce métal peut conduire aussi à une carence en fer et une déficience en manganèse (Mn) et en cuivre (Cu) dans les feuilles des plantes ainsi qu'à une carence en phosphate qui se traduit par une couleur rouge violacée (Ebbs and Kochian, 1997).

Le cuivre (Cu) est considéré comme un oligo-élément pour les plantes (Thomas et al., 1998). Il joue un rôle important dans l'assimilation du CO₂ et dans la synthèse de l'ATP. L'excès de Cu dans le sol induit un stress oxydatif provoquant des lésions dans les plantes, des perturbations dans les voies métaboliques, un retard de croissance végétale et une chlorose des feuilles (Lewis et al., 2001).

Le mercure (Hg) peut facilement s'accumuler dans les plantes supérieures et aquatiques (Kamal et al., 2004 ; Wang and Greger, 2004 ; Israr et al., 2006) . Le niveau toxique de Hg²⁺ peut entraîner des lésions visibles et des troubles physiologiques chez les plantes (Zhou et al., 2007). Par exemple, le Hg²⁺ peut se lier aux aquaporines, induisant ainsi la fermeture des stomates des feuilles et l'obstruction physique de l'écoulement de l'eau dans les plantes (Zhang and Tyerman, 1999).

La toxicité du chrome (Cr) a été étudiée chez diverses plantes. L'excès de ce métal provoque l'inhibition de la croissance des plantes, la chlorose chez les jeunes feuilles, le déséquilibre de nutrition minérale, le flétrissement des sommets et la blessure des racines. Il peut aussi altérer les processus physiologique et métabolique des plantes par un effet direct sur les enzymes et leurs métabolites (Shanker et al., 2005).

Le plomb (Pb) est l'un des éléments toxiques les plus abondants dans le sol. Il exerce un effet négatif sur la morphologie, la croissance et les processus photosynthétiques de la plante. Il provoque également une inhibition de l'activité enzymatique au niveau cellulaire, des modifications de la perméabilité de la membrane, des perturbations de la nutrition minérale (Sharma and Dubey, 2005) en plus de l'augmentation de la production des ROS dans les plantes (Reddy et al., 2005).

L'excès de Nickel (Ni) dans le sol provoque divers changements physiologiques et divers symptômes de toxicité, tels que la chlorose et la nécrose des espèces de plantes différentes (Zornoza et al., 1999; Pandey and Sharma, 2002; Rahman et al., 2005). Le Ni²⁺ affecte aussi la

composition lipidique et l'activité de la H-ATPase de la membrane plasmique dans la partie aérienne d'*Oryza sativa* (ROS et al., 1992; Gajewska et al., 2006).

L'arsenic (As) et l'antimoine (Sb) ne sont pas des éléments essentiels pour les plantes. Une fois absorbés, ils entrent en compétition avec des métabolites essentiels, ce qui les rend phytotoxiques (Bowen, 1979). Comme pour l'homme, la toxicité de ces deux éléments pour les plantes dépend de leur nature chimique ; les formes inorganiques sont plus toxiques que les formes organiques. Biochimiquement, l'arsenic a deux effets majeurs :

- il interrompt les chaînes de transport d'électrons mitochondriales en se substituant au phosphore dans la réaction de formation de l'ATP.
- à forte concentration, les formes inorganiques entraînent la précipitation des protéines en interagissant avec leurs groupements sulfhydryles et leurs sites actifs.

À l'instar de l'arsenic, l'antimoine agirait sur les groupements thiols du glutathion et des protéines entraînant leur dénaturation (Sun et al., 2000).

2. Phytoremédiation

La phytotoxicité des métaux lourds est le résultat de l'altération des processus physiques et biochimiques aux niveaux moléculaire et cellulaire par l'inhibition de la croissance et de la division cellulaire des plantes, l'endommagement de la structure des enzymes, le blocage des groupements fonctionnels des métabolites cellulaires, la substitution des éléments essentiels et l'altération de l'intégrité de la membrane (Cheng, 2003; Rascio and Navari-Izzo, 2011). Certaines plantes peuvent croître dans des zones polluées par les métaux lourds en accumulant et séquestrant ces métaux dans leurs différentes parties. Ces plantes représentent un bon modèle pour le processus de la phytoremédiation.

La phytoremédiation est une technologie naissante qui utilise les plantes et les microorganismes associés de la rhizosphère (Susarla et al., 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 et souterraines et même dans l'atmosphère. Actuellement, elle est employée pour traiter de nombreuses catégories de contaminants, y compris les hydrocarbures pétroliers, les solvants chlorés, les pesticides, les explosifs, les métaux lourds et les radionucléides (Susarla et al., 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 et al., 2002).

Selon Pulford and Watson (2003), 5 principaux sous-groupes de phytoremédiation ont été identifiés :

- la phytoextraction : les plantes enlèvent les métaux du sol et les concentrent dans leurs différentes parties.

- la phytodégradation : les plantes et les microbes associés dégradent les polluants organiques.

- la rhizofiltration : les racines des plantes absorbent les métaux à partir des rivières et des ruisseaux contaminés.

- la phytostabilisation : les plantes réduisent la mobilité et la disponibilité biologique des polluants dans l'environnement par immobilisation ou prévention de la migration.

- la phytovolatilisation : volatilisation des polluants dans l'atmosphère par l'intermédiaire des plantes.

2.1. Absorption des métaux lourds par les plantes et leurs mécanismes de tolérance

Les plantes absorbent les éléments traces métalliques (ETM) essentiels et non essentiels du sol par une absorption sélective d'ions par les racines ou par diffusion directe de ces éléments à travers le sol. Le niveau d'accumulation des métaux diffère entre et au sein des espèces (McGrath et al., 2002). D'après Baker (1981), les plantes peuvent être classées en trois groupes :

- les excluders : ce sont les plantes limitant la translocation des ETM et maintenant de faibles niveaux de ces derniers dans leurs tissus aériens sur une vaste gamme de concentrations dans le sol.

- les accumulateurs représentent celles qui accumulent des quantités élevées d'ETM dans leurs tissus.

- Les indicateurs accumulent des métaux dans leurs tissus suivant la teneur en ETM dans le sol, jusqu'à ce que la toxicité se produise.

2.2. Processus majeurs impliqués dans l'accumulation des ETM par les plantes

La majorité des métaux qui entre dans les plantes est soit accumulée au niveau des racines, soit transloquée vers les feuilles (**voir figure 1**).

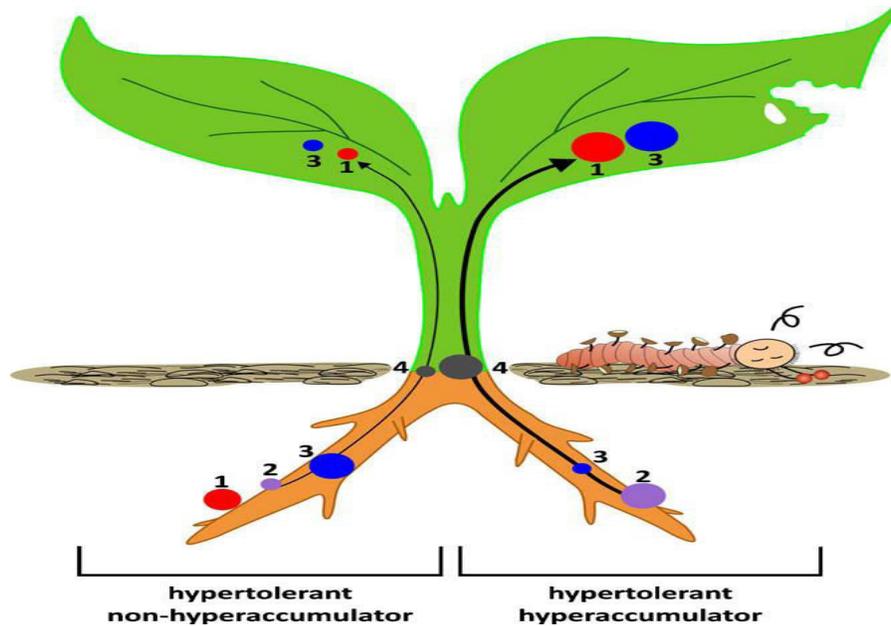


Figure 1 : Mécanismes impliqués dans l'hyper tolérance et la distribution des ETM dans les plantes hyper accumulatrices (à droite) et non hyper accumulatrices (à gauche) (Rascio and Navari-Izzo, 2011) : (1) la liaison des métaux lourds aux parois cellulaires et / ou aux exsudats de cellules, (2) l'absorption racinaire, (3) la chélation dans le cytosol et / ou la séquestration dans les vacuoles, (4) la translocation des racines vers les feuilles. Les points indiquent l'organe végétal dans lequel les différents mécanismes se produisent et leurs tailles indiquent la concentration des métaux dans ces organes

Les plantes qui tolèrent les métaux lourds dans leurs différentes parties sont classées en deux catégories :

- les plantes accumulatrices ou non hyperaccumulatrices qui absorbent et accumulent une grande partie des métaux dans leurs racines en limitant leur translocation vers les autres organes (Clemens et al., 2002).

- les plantes hyper accumulatrices des métaux qui absorbent ceux-ci du sol, les transloquent des racines vers les tissus aériens pour les accumuler et les séquestrer (Yang et al., 2005).

Les principales étapes de l'accumulation des ETM dans les plantes sont :

- la bioactivation et la solubilisation dans la rhizosphère,
- l'absorption et le transport via le xylème,

- la distribution, la détoxification et la séquestration dans les vacuoles des parties aériennes (pour les plantes hyperaccumulatrices) (Sheoran et al., 2009).

2.2.1. Bioactivation dans la rhizosphère

La plupart des métaux lourds sont moins solubles dans l'eau et sont fortement liés aux matrices organiques du sol et aux silicates, ce qui nécessite leur mobilisation pour être accumulés par les plantes (Robinson et al., 2003). C'est pour cette raison que la biodisponibilité et la mobilité des ETM dans la rhizosphère est un phénomène important pour l'absorption des métaux du sol et leur transfert vers les racines (Maestri et al., 2010). Les racines des plantes et les bactéries de la rhizosphère interagissent entre elles et jouent un rôle important dans la mobilisation des ETM (Clemens et al., 2002). Leur mobilisation dans le sol se fait par sécrétion des protons, diminution du pH, production des acides organiques (acide acétique, succinate) et des acides aminés (histidine), production des agents chélateurs (phytosiderphose), etc (**voir figure2**). En plus de cela, les bactéries secrètent des antibiotiques, des hormones et des antifongiques qui aident à l'augmentation de la biomasse des plantes d'une part, et à celle de la longueur des racines d'autre part (Maestri et al., 2010; Sheoran et al., 2009).

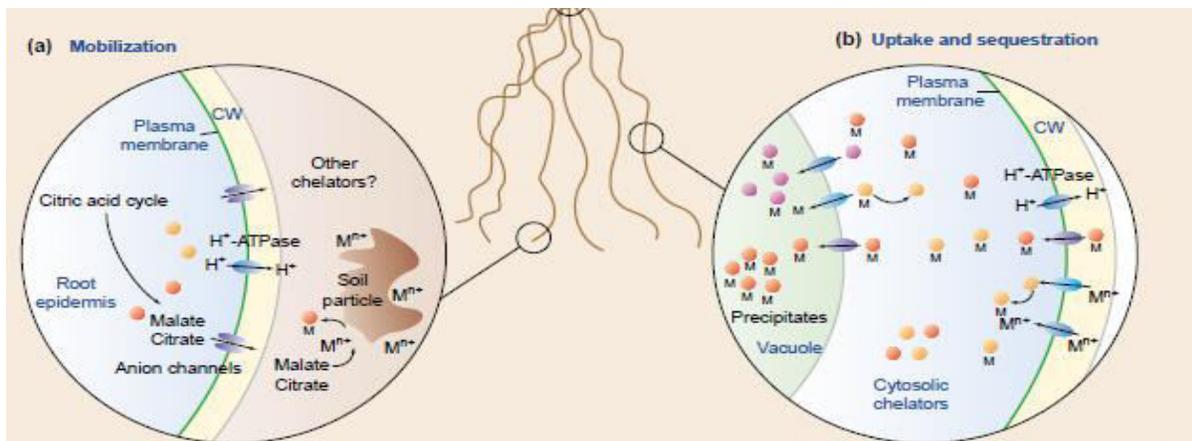


Figure 2 : Mécanismes moléculaires impliqués dans l'accumulation de métaux de transition par les plantes (Clemens et al., 2002).

La figure 2 schématise les mécanismes moléculaires impliqués dans l'accumulation de métaux ; les ions métalliques sont mobilisés par la sécrétion de chélateurs et par l'acidification de la rhizosphère (a) et l'absorption des ions hydratés des métaux ou des complexes métal-chélateur est assurée par différents systèmes d'absorption dans la membrane plasmique (b) (Clemens et al., 2002).

Il est noté aussi que l'acidification de la rhizosphère se fait par sécrétion des protons par les racines et qu'elle est opérée par l' H^+ -ATPase et la pompe hydrogène de la membrane plasmique (Yang et al., 2005).

2.2.2. Absorption et le transport des métaux à travers le xylème

L'absorption des métaux du sol se fait à travers la membrane plasmique grâce à des transporteurs spécifiques (**voir figure 3**), tels que :

- les protéines de transport de la famille ZIP qui sont responsables du transport de Zn, Cd et Mn (Yang et al., 2005),
- les transporteurs P pour l'arsenic, (Caille et al., 2005),
- les IRT pour le Fe et le Mn,
- les COPT pour le Cu,
- les CBP4 pour le Pb (Clemens, 2001).

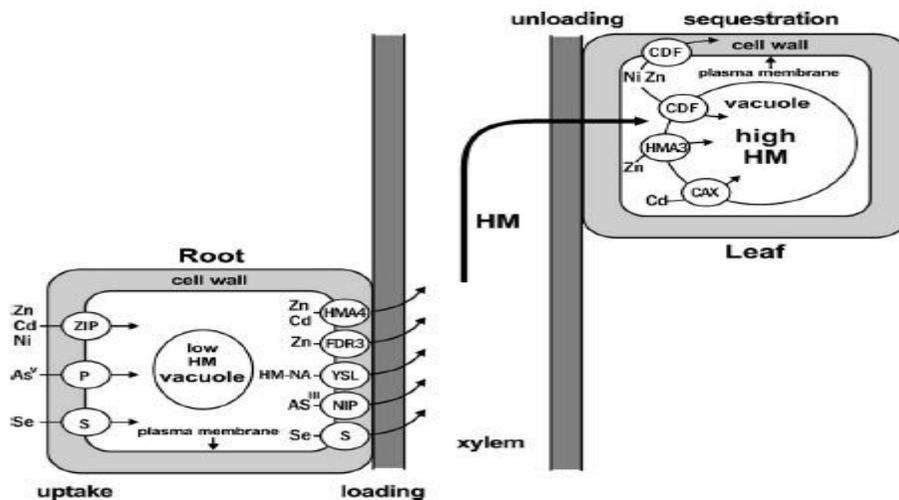


Figure 3: Translocation des métaux lourds des racines vers les feuilles chez les plantes hyperaccumulatrices (Rascio and Navari-Izzo, 2011). La translocation se fait grâce à différents transporteurs : CAX = *Cation Exchangers*; CDF = *Cation Diffusion Facilitators*; FDR3 = *a member of the Multidrug and Toxin Efflux family*; HM= *Heavy Metals*; HMA= *Heavy Metal transporting ATPases*; NA= *Nicotinamine*; NIP = *Nodulin 26-like Intrinsic Proteins*; P = *Phosphate transporters*; S = *Sulphate transporters*; YSL = *Yellow Strip 1-Like Proteins*; ZIP = *Zinc-regulated transporter Iron-regulated transporter Proteins*.

Certaines plantes non hyper accumulatrices séquestrent les métaux dans les vacuoles des racines grâce aux transporteurs MTP. Ces métaux sont liés aux acides organiques et aux phytochélatines (Zhao and McGrath, 2009). D'autres plantes (hyperaccumulatrices) transloquent les métaux vers les tiges *via* le xylème par différents transporteurs membranaires (HMA4 et MT2b pour le Zn et le Cd, FDR3 pour le Zn, YSL pour le complexe HM-Na, NIP pour l'As (III),

etc) (Grispen et al., 2011). La pompe de la membrane plasmique participe aussi, dans certains cas, à la translocation des métaux *via* le xylème (Sheoran et al., 2009).

Au moment de leur transport vers les vaisseaux du 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 (telles que la nicotiamine et la métallothionine) (Rascio and Navari-Izzo, 2011).

2.2.3. Distribution, détoxification et séquestration des métaux

Le mécanisme général de détoxification des métaux dans les plantes est leur distribution dans les différents tissus. Une fois transloqués vers les tiges, les métaux sont distribués dans le trichome, l'épiderme, le mésophile, la paroi cellulaire et la vacuole, cela pour ne pas endommager les processus vitaux cellulaires (Sheoran et al., 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 GHS pour les inactiver et les transporter vers les vacuoles à travers les transporteurs membranaires (Sheoran et al., 2009) ; c'est le cas du CAX pour Cd, du HMA3 pour Zn et du CDF pour Zn, Ni (**voir figure 3**).

Les acides organiques jouent également un rôle majeur dans la détoxification des ETM pour prévenir la persistance de ces derniers dans le cytoplasme en tant qu'ions libres et permettre leur occlusion dans les vacuoles. Exemples : le citrate se lie au Ni dans les feuilles de *T. goesingense* et le malate au Cd chez *T. caerulea* et au Zn chez *A. halleri* (Rascio and Navari-Izzo, 2011).

L'augmentation de la synthèse du glutathion réduit également été remarquée en tant que molécule antioxydante utilisée pour la séquestration des métaux. Exemples : Cd et Hg se lient à 2 molécules de glutathion et As à trois molécules (Yang et al., 2005).

3. Pollution par l'antimoine et l'arsenic

L'Arsenic (As) et l'antimoine (Sb) sont deux métalloïdes d'origine naturelle. Ils appartiennent au groupe 15 du tableau périodique avec l'azote (N), le phosphore (P) et le bismuth (Bi) et font partie de la famille des pnictogènes. Dans la nature, l'As se trouve dans divers états d'oxydation + V, + III, 0, et -III, ce qui lui permet de former des liaisons avec le carbone, le soufre et de subir des transformations biologiques dans le sol (Schiferl and Barrett, 1969). L'Antimoine (Sb) est principalement trouvé dans deux états d'oxydation III et V dans l'environnement avec Sb(OH)_3 et Sb(OH)_6^- respectivement (Filella et al., 2002).

3.1. Origine des contaminations à l'arsenic et à l'antimoine

Dans la croûte terrestre, les concentrations ont été estimées de 2 jusqu'à 5 mg.kg^{-1} pour l'arsenic (Greenwood et al., 1984) et de 0,2 mg.kg^{-1} pour l'antimoine (Crommentuijn et al., 2000). Dans le sol, elles sont présentes de 0,1 à 40 mg Kg^{-1} pour l'arsenic et de 0,3 à 8,4 mg.Kg^{-1} pour l'antimoine (Crommentuijn et al., 2000; Kabata-Pendias and Mukherjee, 2007).

La pollution de l'environnement par l'antimoine est liée principalement aux activités minières, industrielles et au trafic automobile avec des rejets mondiaux estimés à environ 38 tonnes par an (Zheng et al., 2000). Pour l'arsenic, l'émission volcanique participe à 90% des rejets dans l'atmosphère. D'autres émissions proviennent de la combustion mal maîtrisée de charbon et de fuel et des rejets des industries métallurgiques.

En agriculture, l'arsenic entre aussi dans la composition de nombreux produits destinés aux traitements du bois ou à l'élaboration de produits phytosanitaires comme les fongicides, les herbicides et les défoliants, ce qui constitue une autre source de pollution (Deneux-Mustin et al., 2003).

3.2. Influence des paramètres physicochimiques et des principaux constituants du sol sur la mobilité de Sb et As

Dans le sol, l'As se trouve principalement sous forme d'arsenate (AsO_4^{3-}) et d'arsenite (AsO_3^{3-}) (Matschullat, 2000). Il présente un comportement voisin de l'anion phosphate PO_4^{2-} avec lequel il peut entrer en compétition pour son absorption (Boisson et al., 1999). En condition neutre, les formes solubles de l'arsenic s'absorbent fortement aux oxydes de fer (Jain et al., 1999) et de manganèse (Cox et al., 1996) mais peuvent être absorbées par les argiles naturellement

présentes dans le sol ou apportées (béringite), ce qui limite considérablement leur migration (Boisson et al., 1999). Dans les sols acides, l'arsenic s'associe à l'aluminium et au fer pour former $AlAsO_4$ et $FeAsO_4$ (Bothe and Brown, 1999) tandis que dans les sols calcaires et basiques, ce sont l'arséniate de calcium $Ca_3(AsO_4)_2$ et l'autre forme hydroxylée d'hydrogène-acétate $Ca_5(AsO_4)_3OH$ qui dominent (Matschullat, 2000).

Les conditions d'oxydoréduction et le pH influencent la mobilité de l'arsenic en changeant directement son degré d'oxydation et ceux des éléments avec lesquels il peut former des liaisons stables (tels que le Fe et le S). Il peut en résulter la formation de complexes solubles ou la dissolution des phases porteuses de l'arsenic (oxyde de fer et sulfures). De plus, la solubilité de l'arsenic sous forme anionique stable, augmente lorsque le pH augmente (Deneux-Mustin et al., 2003).

L'antimoine est susceptible d'être présent sous forme de sulfure très peu soluble (principalement Sb_2S_3), ou sous forme d'anions inorganiques (antimonite $Sb(III)O_2^-$, et antimoniate $Sb(V)O_3^-$) ainsi que sous diverses formes méthylées (Hammel et al., 2000). Ce métalloïde s'associe aux oxydes hydratés de manganèse, de fer et d'aluminium, relativement immobiles, en oxydant le Sb III en Sb V (Lintschinger et al., 1998). Il s'associe aussi aux argiles et aux substances organiques (notamment les acides humiques) qui interviennent dans la sorption de l'antimoine. Cette dernière augmente avec la diminution du pH du sol mais toutefois son rôle reste mineur (Hammel et al., 2000).

D'autre part, l'antimoine est relativement mobile ; cela dépend de la nature du sol, s'il est sableux, limoneux, argileux, organique, calcaire, etc (AIEA, 1994).

3.3. Accumulation de l'arsenic et de l'antimoine chez les plantes

Sur des sols non pollués, les plantes présentent en général de faibles concentrations en métalloïdes ; environ $0,009$ à $1,5 \text{ mg kg}^{-1}$ pour l'arsenic et $0,1 \text{ mg kg}^{-1}$ pour l'antimoine (Markert and Haderlie, 1996). En ce qui concerne les plantes comestibles, les teneurs demeurent également relativement faibles, même lorsque la culture est réalisée sur des sites contaminés (Hammel et al., 2000). Sur les sites miniers présentant localement des concentrations extrêmement élevées en arsenic ou en antimoine, les plantes sont tolérantes à ces polluants et sont capables de les accumuler ou de les exclure (Pratas et al., 2005). Dans les deux cas, ces espèces présentent un intérêt pour la phytostabilisation et la revégétalisation de ces sites (Hooper and Vitousek, 1997).

Depuis la première identification de *Pteris vittata* L. comme hyperaccumulatrice de l'Arsenic (Chen et al., 2002), d'autres plantes ont été identifiées par la suite. C'est le cas de *Pityrogramma calomelanos*, *Pteris cretica*, *P. longifolia*, *P. umbrosa*, *P. biaurita* L., *P. quadriaurita* Retz, et *P. ryukyuensis* Tagawa (Wang et al., 2007). Ces plantes contiennent de 5 000 jusqu'à 10 000 mg.kg⁻¹ (DW) d'As et la plupart d'entre elles appartiennent à des espèces de fougères (Lombi et al., 2002).

Plusieurs plantes accumulatrices de l'antimoine ont également été signalées. C'est le cas de *Achillea ageratum*, *Plantago lanceolata*, *Silene vulgaris* (Baroni et al., 2000) et *Trifolium pratense* L. (Tschan et al., 2009). Les plantes qui poussent dans les zones minières, autour des fonderies, contiennent de l'antimoine de 50 mg Sb kg⁻¹ jusqu'à 900 mg Sb kg⁻¹ (Hammel et al., 2000; Murciego et al., 2007). Des valeurs exceptionnellement élevées (jusqu'à 1367 mg kg Sb) ont été mesurées dans *Achillea ageratum*, *Plantago lanceolata* et *Silene vulgaris* (Baroni et al., 2000). Les mécanismes d'accumulation du Sb dans ces plantes n'ont pas encore été résolus.

3.4. Toxicité des plantes par l'arsenic et l'antimoine

L'As et le Sb ne sont pas des éléments essentiels pour les plantes ; au contraire, ils sont toxiques. Cependant, les plantes peuvent les absorber dans une certaine mesure et leur accumulation peut retarder l'allongement des racines des plantes et inhiber leur croissance (Shaibur et al., 2008).

Le mécanisme de la toxicité de l'antimoine semble inclure les interactions avec les groupes thiols fonctionnels du glutathion et des protéines (Sun et al., 2000). En général, les composés inorganiques du Sb sont plus toxiques que les composés organiques et la forme trivalente du Sb (III) est plus toxique que sa forme pentavalente Sb (V) (Filella et al., 2002). Dans sa forme trivalente, le Sb peut avoir un niveau de génotoxicité similaire à l'arsenic trivalent (Gebel, 1997).

Il en est de même pour l'arsenic où les formes trivalentes sont plus toxiques que les formes pentavalentes (Mourón et al., 2005). Ces deux formes sont capables de provoquer plusieurs phénomènes :

- déclenchement de l'apoptose,
- induction des cassures chromosomiques et chromatidiques,
- dommage de l'ADN par oxydation de ses bases ou par formation des sites apuriniques / apyrimidique (Shi et al., 2004), ...

3.5. Mécanismes d'absorption et d'accumulation de l'arsenic et de l'antimoine par les plantes

Il a été établi que l'As et le Sb présentent un comportement similaire dans l'environnement (Adriano, 2001) mais que l'absorption du Sb par les plantes peut se produire différemment par rapport à l'absorption de l'As (Shtangeeva et al., 2011). Les mécanismes d'absorption de l'arsenic ont été bien caractérisés chez les plantes supérieures. En revanche, ils demeurent encore inconnus par rapport à l'antimoine (Zangi and Filella, 2012).

3.5.1. Absorption des ions arséniate (As(V)) et antimoniates (Sb(V))

L'arséniate est transféré dans les plantes à travers les membranes cellulaires par les mêmes transporteurs que ceux du phosphate (Asher and Reay, 1979). Au contraire, l'absorption de l'antimoniate Sb V n'est pas affectée par la présence de phosphate, ce qui laisse penser qu'ils ne sont pas transportés par les mêmes transporteurs (Tschan et al., 2008). Ainsi, Tschan et al. (2009) ont émis deux hypothèses pour le transport de l'antimoine :

- l'antimoniate pénètre dans le symplaste des racines probablement *via* les transporteurs d'anions, tels que ceux qui transportent le Cl^- ou le NO_3^- , avec une faible sélectivité.
- l'antimoniate pénètre dans le xylème par la voie apoplastique en passant par les bandes de Caspary qui ne sont pas hermétiquement fermées ou endommagées.

D'après (Tschan et al., 2009), la deuxième hypothèse est la plus vraisemblable dans le cas des plantes.

3.5.2. Absorption des ions arsénites As(III) et antimonites Sb(III)

Au cours de l'absorption du Sb (III) et de l'As (III) par les organismes vivants, une concurrence a été observée chez la *Leishmania* (Brochu et al., 2003) et le riz (*Oryza sativa*) (Meharg and Jardine, 2003). Ceci indique que le Sb (III) et l'As (III) peuvent utiliser les mêmes voies d'absorption.

Il a été prouvé que l'absorption de l'As (III) est facilitée par les chaînes de glycérol (appelées aquaporines) dans la levure (*Saccharomyces cerevisiae*) (Wysocki et al., 2001) et dans le riz (*Oryza sativa*) (Meharg and Jardine, 2003). Ainsi, Renwei Feng (2013) a supposé que la voie d'absorption du Sb (III) dans les plantes se produit également à travers les aquaporines et peut être affectée de manière significative par le courant d'eau.

3.5.3. Transport et accumulation de l'arsenic et de l'antimoine

Il a été souligné que les mécanismes d'absorption de l'As (V) et du Sb (V) par les plantes sont probablement différents. Cependant, une fois à l'intérieur des cellules et après réduction de l'As (III) et du Sb (III), les deux métalloïdes présentent une forte affinité pour les ligands riches en SH. Les deux peuvent être compartimentés par des transporteurs ABC dans les vacuoles *via* des complexes de type thiol. Il semble possible que l'As (III) et Sb (III) puissent interagir de manière antagoniste à l'intérieur des plantes, mais le mécanisme exact de l'assimilation de l'antimoine dans les plantes reste inconnu (Zangi and Filella, 2012). C'est pourquoi, la partie du transport des deux métalloïdes dans les plantes est consacrée uniquement au transport de l'arsenic (**voir figure 4**)

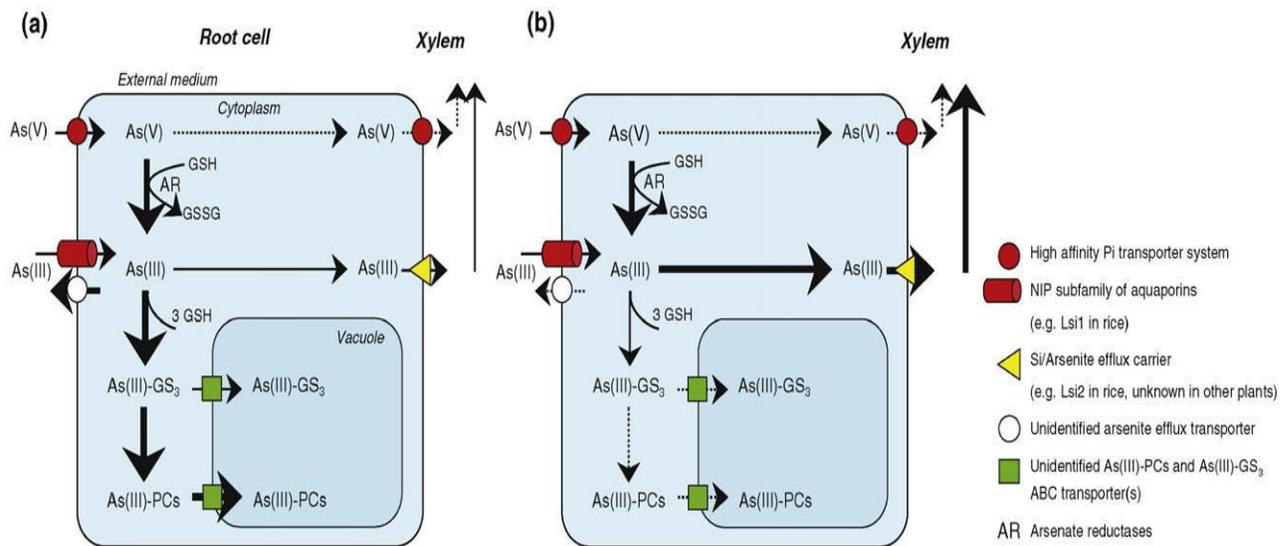


Figure 4 : Représentation schématique des principaux processus impliqués dans l'absorption, le métabolisme, la séquestration vacuolaire et la translocation de l'As dans les racines des plantes non hyperaccumulatrices (a) et hyperaccumulatrices (b) (Verbruggen and Hermans, 2008). N.B : L'épaisseur des lignes concerne le taux du flux. Les points d'interrogation se réfèrent à des processus mal caractérisés.

D'après la **figure 4**, l'arsenic ne peut pénétrer à l'intérieur de la cellule des racines que sous forme d'As (V) ou d'As (III). L'As (V), la principale forme d'arsenic absorbée par les fougères hyperaccumulatrices, est transporté par les transporteurs de phosphate et est rapidement réduit en As (III) par l'arséniate réductase (AR). L'As (III) est repris par la protéine nodulin 26-like protein (NIP), une sous-famille des aquaporines. Dans les plantes non hyperaccumulatrices, une partie de l'As (III) est effluée à partir des racines vers la rhizosphère par un transporteur non identifié. Cet écoulement est négligeable dans les hyperaccumulatrices. L'As (III) peut former des complexes avec le glutathion et l'As (III)-GS₃ et être transporté par la suite dans la vacuole par

les transporteurs ABC. **La figure 4** indique aussi que dans les plantes non hyperaccumulatrices, la complexation du métalloïde avec la PC et la séquestration de complexes As (III)-PC se fait chez *Arabidopsis* dans les vacuoles des racines par les transporteurs ABCC (ABCC1 et ABCC2). Dans les plantes hyperaccumulatrices, il existe une faible complexation de PC et de l'As (III) et la majorité de l'arsénite est chargée dans le xylème pour être transportée vers la partie aérienne (Verbruggen and Hermans, 2008)

Chez les plantes, le phloème est le tissu conducteur spécialisé dans le transport vertical des nutriments et des métaux essentiels pour le développement des graines, ce qui suggère son implication dans le transport des métaux et métalloïdes non essentiels. L'analyse de diverses espèces végétales a montré que les principales molécules métal-ligand trouvées dans le phloème sont la nicotianamine, le GSH et la PC. La nicotianamine forme des complexes avec les Fe, Cu, Zn et Mn, tandis que les GSH et PC ont plus d'affinité pour les Cd, Zn, Hg et As (III). Les PC ont longtemps été considérés comme des molécules qui interviennent dans le transport des métaux du cytosol vers les vacuoles. Cependant, la recherche a révélé qu'elles interviennent également dans le transport à longue distance de l'As (Weber et al., 2006).

L'hyperaccumulation de l'arsenic et des autres métalloïdes ou métaux implique donc une série de processus : absorption dans les racines, réduction et séquestration dans les vacuoles des racines, renforcement de la translocation des racines vers les feuilles et séquestration accrue dans les vacuoles des feuilles par les transporteurs ABCC (Verbruggen and Hermans, 2008).

4. Plantes et stress oxydatif

Le stress oxydatif (ou stress oxydant) est un type d'agression des constituants de la cellule dû aux espèces réactives oxygénées et aux espèces réactives azotées oxydantes qui vont s'attaquer aux membranes cellulaires, aux protéines et à l'ADN.

Un stress oxydant peut être induit lors de la surproduction d'espèces réactives et/ou par suite de l'inhibition des systèmes antioxydants qui peuvent être inactivés, soit directement, soit par défaut de synthèse. Il correspond à un déséquilibre entre molécules pro-oxydantes (espèces réactives oxygénées) et molécules de défenses antioxydantes (vitamines, enzymes) au niveau cellulaire (Peltier et al., 2004).

4.1. Espèces réactives d'oxygène

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

Ce sont soit des espèces actives radicalaires de l'oxygène tels que le radical superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), le radical hydroxyle (OH^{\cdot}), les peroxydes (ROO^{\cdot}) ou les alkoxydes (RO^{\cdot}), soit des espèces actives non radicalaires de l'oxygène, comme l'oxygène singulet (1O_2), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou l'ozone (O_3). Les premières dérivent de l'oxygène par des réductions monoélectroniques, alors que les dernières dérivent de l'oxygène et peuvent être des précurseurs de radicaux (Krieger-Liszkay, 2005; Noguchi, 2002).

L'origine principale des formes oxygénées actives réside dans la réduction d' O_2 électron par électron (voir figure 5)

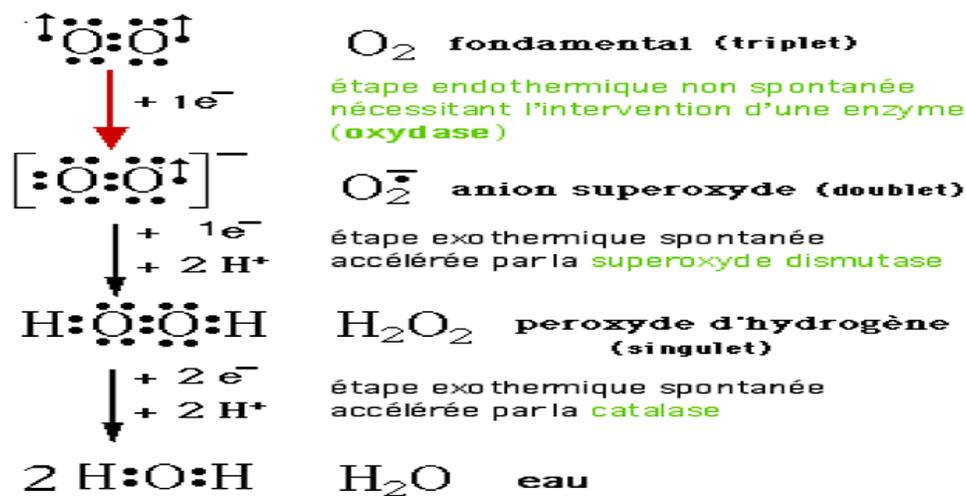


Figure 5 : Etapes successives de la réduction de l'oxygène *in vivo*. (Deby and Deby-Dupont)

La figure 5 indique les étapes successives de la réduction de l'oxygène *in vivo*. La première étape est une réduction incomplète qui aboutit à la formation d'un anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$ et ne peut être effectuée qu'en présence d'un catalyseur (enzyme du type oxydase) (Cadenas and Davies, 2000). En milieu protoné, l'anion superoxide subit généralement une réaction spontanée (ou accélérée par la SOD) de dismutation, aboutissant à la formation de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2).

En présence de métaux de transition sous forme réduite, le peroxyde d'hydrogène se dégrade en radical hydroxyl (OH^\bullet), un radical libre très réactif (réaction de Fenton) qui peut être formé par la scission homolytique de la liaison $-\text{O}-\text{O}-$ de l' H_2O_2 (Bergendi et al., 1999).



4.2. Sources des espèces réactives d'oxygène dans les plantes

Les plantes photosynthétiques sont les plus exposées au stress oxydatif, en raison de leurs conditions oxygénées et l'abondance des photosensibilisants et des acides gras polyinsaturés (AGPI) dans la membrane plastidiale. En présence de la lumière, les chloroplastes et les peroxysomes sont la principale source de production des ROS (Parent et al., 2008), alors que dans l'obscurité, les mitochondries semblent être les principales productrices des ROS (voir figure 6)

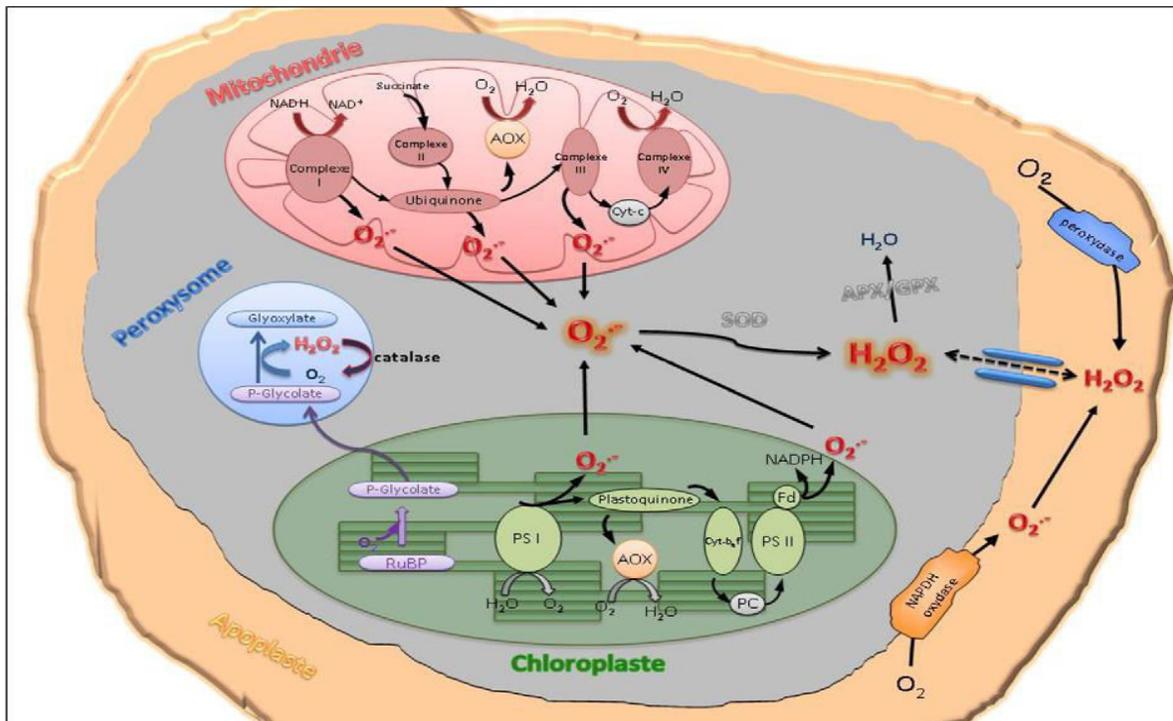


Figure 6 : principaux sites de production des ROS dans la cellule végétale (Parent et al., 2008).

4.2.1. Mitochondries

Les mitochondries sont considérées comme un site majeur de production des ROS. La production de ces derniers se déroule dans des conditions respiratoires normales mais peut être intensifiée en réponse à diverses conditions de stress biotiques et abiotiques. Les Complexes I (NADH déshydrogénase) et III (cytochrome bc1) de la chaîne de transport d'électrons (ETC) mitochondrial indiqués sur la figure 6 sont les sites les plus connus pour la production d' $O_2^{\cdot-}$. Il se forme des composés intermédiaires radicalaires d'ubisemiquinones issus de la réduction du pool d'ubiquinones. Cependant, les flavoprotéines du complexe II pourraient également contribuer à cette production d' $O_2^{\cdot-}$ (Young et al., 2002). En solution aqueuse, l' O_2 est modérément réactif mais il peut être réduit en H_2O_2 par la SOD (Quan et al., 2008)

Il a été estimé qu'environ 1 à 5% de la consommation d' O_2 mitochondriale conduit à la production de H_2O_2 (Møller, 2001). Ce dernier peut réagir avec le Fe^{+2} et le Cu^+ pour produire le OH^{\cdot} hautement toxique, qui peut traverser les membranes et quitter la mitochondrie. La peroxydation des AGPI de la membrane mitochondriale est initiée par l'abstraction d'un atome d'hydrogène par les ROS, en particulier par le radical OH^{\cdot} . Cela conduit à la formation du 4-hydroxy-2-nonéal, du malondialdéhyde (MDA), des oxylipines, etc. Une fois formés, les produits de la LPO peuvent causer des dommages cellulaires par réaction avec les protéines, les lipides et les acides nucléiques (Rhoads et al., 2006).

4.2.2. Chloroplaste

Le chloroplaste est le lieu où se déroule la photosynthèse chez les plantes supérieures et les algues. Il contient un système de membrane, des thylakoïdes, très organisé. La présence de centres réactionnels de production des ROS, tel que le triplet Chl de l'ETC dans les photosystèmes : PSI et PSII, fait du chloroplaste un site majeur de production des ROS ($O_2^{\cdot-}$, 1O_2 et H_2O_2) (Zhang et al., 2007). L'oxygène généré dans les chloroplastes pendant la photosynthèse peut accepter des électrons qui passent à travers les photosystèmes. Cela se traduit par la formation d' $O_2^{\cdot-}$.

Divers stress biotiques et abiotiques, tels que l'excès de lumière, la sécheresse, le stress salin et la pollution, augmentent la production des ROS dans les chloroplastes. Durant le stress, la carboxylation du ribulose 1,5-biphosphate (RuBP), présente dans le chloroplaste, est inhibée favorisant son oxygénation et entraînant la production de phosphoglycolate. Celui-ci est

transporté vers le peroxyosome où il est converti en glyoxylate par la glycolate oxydase, produisant ainsi le peroxyde d'hydrogène. A l'extérieur de la surface membranaire du stroma l' $O_2^{\cdot-}$ est spontanément dismuté en H_2O_2 par la CuZn-SOD (Gill and Tuteja, 2010; Takahashi and Asada, 1988).

4.2.3. Peroxysome

En raison de leurs caractéristiques, les peroxyosomes ont longtemps été considérés comme des organites spécialisés dans la détoxification du peroxyde d'hydrogène. Les peroxyosomes sont en fait le siège d'une forte activité dans le métabolisme oxydatif. Ils possèdent une structure simple, une taille réduite et une très grande quantité de catalases (Zhang et al., 2007).

Comme les mitochondries et les chloroplastes, les peroxyosomes représentent une source importante de production des ERO intracellulaires ; ils produisent l' $O_2^{\cdot-}$ suite à des métabolismes normaux. Les principaux processus responsables sont la photorespiration (la réaction de glycolate-oxydase), la β -oxydation des acides gras, la réaction enzymatique de la flavine oxydase et la dismutation des radicaux $O_2^{\cdot-}$. le radical NO^{\cdot} est également produit par la dégradation des acides aminés produits lors de la photomorphogenèse, etc (Hu, 2007).

4.3. Autres sources des radicaux libres dans la cellule

Il existe d'autres sources importantes de production des ROS dans les plantes, telles que les réactions de désintoxication catalysées par le cytochrome P450 dans le cytoplasme et dans le réticulum endoplasmique et les réactions de réduction catalysées par l'oxalate oxydase et l'amine oxydases dans l'apoplaste des cellules végétales (Gill and Tuteja, 2010).

5. Métaux lourds et stress oxydatif chez les plantes

La conséquence commune de l'empoisonnement des plantes par les métaux lourds est la production des ROS qui sont les principaux indicateurs du stress oxydatif et qui interfèrent avec l'activité de la chaîne de transport des électrons de la membrane du chloroplaste. L'augmentation des ROS expose la cellule au stress oxydatif provoquant la peroxydation lipidique, la détérioration des macromolécules biologiques, le blocage des ions, etc... (Yadav, 2010).

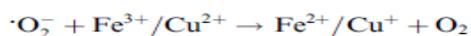
Un certain nombre de réactions biochimiques se produit dans les plantes stressées par les métaux lourds et les métalloïdes. La plupart de ces réactions sont produites par le déplacement

des centres de protéines cationiques ou par l'augmentation d'espèces réactives de l'oxygène. Avec une meilleure capacité à s'adapter aux effets de toxicité, certaines plantes sont capables de survivre dans les sites contaminés ou pollués par les métaux lourds et les métalloïdes et sont de meilleurs candidats pour la phytoremédiation (Peralta-Videa et al., 2009).

5.1. Mécanismes de l'induction du stress oxydatif par les métaux

Les espèces réactives de l'oxygène, tels que $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 et OH^{\cdot} , sont généralement obtenues dans des conditions de stress ou d'activité oxydante fortes qui peuvent attaquer tous les types de biomolécules. L'exposition des plantes à certains ions de métaux lourds déplace l'équilibre du métabolisme des radicaux libres vers une accumulation de l' H_2O_2 . En présence de métaux de transition, tels que les Cu^+ et Fe^{2+} , l' H_2O_2 peut être converti en une molécule très réactive $^{\cdot}OH$ via la réaction de Fenton. Les ions métalliques oxydés sont ensuite réduits par l' $^{\cdot}O_2^-$ (voir réaction). L' $^{\cdot}OH$ peut aussi être formé directement à partir de l' H_2O_2 et le $O_2^{\cdot-}$ par la réaction de Haber-Weiss et ce, indépendamment du métal (Gill and Tuteja, 2010).

Fenton reaction:



Haber-Weiss reaction:



La molécule OH^{\cdot} est une des espèces les plus réactives connues. En raison de sa capacité à initier des réactions radicalaires en chaîne, il est très probable qu'elle soit responsable des modifications chimiques irréversibles des différents composants cellulaires. Un autre ROS qui pourrait être impliqué principalement dans la peroxydation des lipides est la forme protonée de l' $O_2^{\cdot-}$ qui est le radical hydroperoxyde (HO_2^{\cdot}) (Vranová et al., 2002).

Les métaux qui n'appartiennent pas aux métaux de transition provoquent aussi une accumulation des ROS. Leurs ions métalliques inhibent l'activité des enzymes anti-oxydantes, en particulier de la glutathion réductase, et une accumulation naturelle des ROS en serait la conséquence (Schützendübel and Polle, 2002).

5.2. Conséquence de l'induction du stress oxydatif par les métaux dans les plantes

Les espèces réactives de l'oxygène, générées lors de l'exposition aux métaux ou à d'autres stress, peuvent réagir avec la plupart des constituants cellulaires en oxydant les lipides, les protéines, l'ADN et d'autres molécules. Ils peuvent même mener à la mort cellulaire (Garg and Manchanda, 2009).

5.2.1. La peroxydation lipidique (LPO)

La peroxydation des lipides est considérée comme le processus le plus dommageable qui se produit chez tous les organismes vivants. L'altération de la membrane est l'indicateur du niveau de destruction des lipides sous différentes contraintes. Les produits de la peroxydation lipidique (LPO) sont formés à partir des acides gras polyinsaturés. Parmi ces produits il y a le MDA, le 4-Hydroxy-2-nonenal (HNE) et d'autres qui leurs dérivent (Møller et al., 2007).

La LPO a lieu au niveau des membranes cellulaires et des organites lorsque le niveau des ROS dépasse un certain seuil, ce qui affecte non seulement le fonctionnement cellulaire normal, mais aggrave aussi le stress oxydatif par la production de radicaux dérivés de lipides (Yadav et al., 2010).

La LPO a des conséquences multiples sur les cellules des plantes. Elle provoque :

- des dommages aux protéines membranaires,
- une diminution de la fluidité de la membrane,
- une augmentation de la charge négative de la surface permettant aux phospholipides

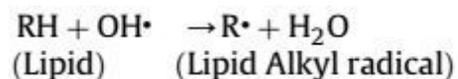
les échanges entre les deux moitiés de la bicouche lipidique.

On observe ainsi une inactivation des récepteurs, des enzymes et des canaux ioniques et une augmentation de la perméabilité de la membrane à des substances qui ne la traversent normalement que par des canaux spécifiques (Gill and Tuteja, 2010).

L'ensemble du processus de la LPO comporte trois étapes distinctes : l'initiation, la propagation et la terminaison (Davies, 2000; Fam and Morrow, 2003).

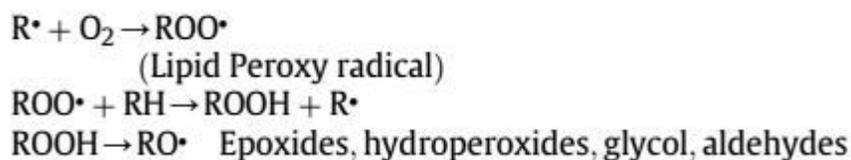
La réaction d'initiation produit un radical libre par rupture d'une liaison C-H. Elle se produit principalement par l' OH^\bullet mais aussi par l' $\text{O}_2^{\bullet-}$ et l' H_2O_2 . Il y a une abstraction d'un atome d'hydrogène de la chaîne d'un acide gras polyinsaturé par l' OH^\bullet (**Voir réaction 1**)

Réaction 1 :



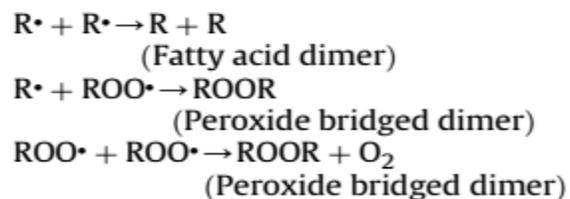
L'étape de propagation correspond à la fixation très rapide des radicaux libres alkyles (R^\bullet), issus lors de l'initiation, avec l'oxygène moléculaire à l'état normal. Il se forme des radicaux libres peroxydés ($\text{ROO}^{\bullet*}$) instables (**voir réaction 2**) pouvant réagir avec une nouvelle molécule d'acide gras insaturée pour former des lipides hydroperoxydes susceptibles d'être décomposés en d'autres espèces réactives (Davies, 2000; Fam and Morrow, 2003).

Réaction 2 :

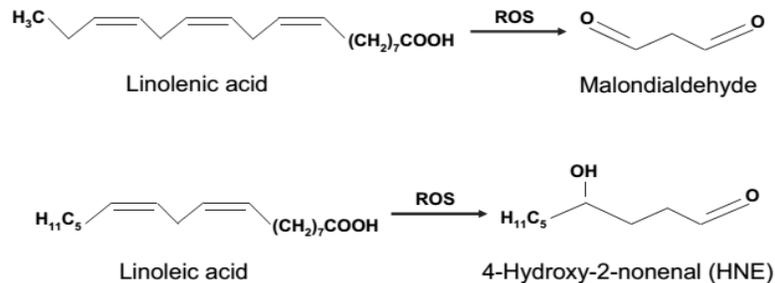


Dans la phase de terminaison, les radicaux formés précédemment réagissent entre eux pour conduire à plusieurs produits (**voir réaction 3**) qui ne sont plus des radicaux libres (peroxydes ROOR) (Fam and Morrow, 2003).

Réaction 3



Les acides gras polyinsaturés (l'acide linoléique (18:2) et l'acide linoléique (18:3)) sont particulièrement susceptibles aux attaques de $^1\text{O}_2$ et OH^\bullet en donnant lieu à des complexes d'hydropéroxydes lipidiques. L'augmentation de la peroxydation des AGPI diminue la fluidité de la membrane, augmente sa perméabilité et provoque des dommages secondaires à ses protéines. Plusieurs aldéhydes, tels que le 4-hydroxy-2-nonanal (HNE) et le MDA, ainsi que les hydroxyles et les céto acides gras, sont formés suite à la peroxydation des AGPI (ci-dessous).



Les produits de dégradation des aldéhydes peuvent former des conjugués avec l'ADN et les protéines (Møller et al., 2007).

5.2.2. Oxydation des protéines

Les protéines sont aussi susceptibles d'être oxydées par les ROS, de façon comparable à l'oxydation des lipides. Cette oxydation provoque une carbonylation (Levine, 2002). Ces réactions, fréquemment influencées par les cations métalliques comme le Cu^{2+} et le Fe^{2+} , peuvent provoquer :

- des cassures au niveau des liaisons peptidiques en modifiant la chaîne protéique,
- des modifications des peptides par l'addition de produits issus de la peroxydation lipidique (tels que le MDA et le HNE),
- des insertions des radicaux libres directement sur les groupements d'acides aminés des protéines (Shringarpure and Davies, 2002).

L'oxydation d'un certain nombre d'acides aminés des protéines (en particulier Arg, His, Lys, Pro, Thr et Trp) donne des groupes carbonyles libres qui peuvent inhiber ou modifier l'activité de la protéine et augmenter la susceptibilité à l'attaque protéolytique (Møller et al., 2007).

Les ROS ciblent beaucoup plus les acides aminés contenant des groupes thiols. Cys et Met sont assez réactives en particulier avec $^1\text{O}_2$ et le OH^\bullet . L'Oxygène actif peut abstraire un atome de H à partir du résidu de la cystéine pour former un radical thiyle qui se lie avec un autre radical thiyle pour former des ponts disulfures (Hancock et al., 2006). L'oxygène peut aussi s'ajouter sur un résidu de méthionine pour former les dérivés de sulfoxyde de méthionine. L'oxydation des protéines dans la plupart du temps est irréversible sauf lorsqu'il s'agit des acides aminés contenant du soufre (Ghezzi and Bonetto, 2003).

5.2.3. Dommage de l'ADN

Bien que le génome de la plante soit stable, son ADN peut être endommagé suite à son exposition aux facteurs du stress biotique et abiotique qui exercent un stress génotoxique (Tuteja et al., 2009). OH^\bullet est le radical le plus réactif qui peut causer des dommages à tous les composants de la molécule d'ADN. Il altère à la fois les bases des purines et des pyrimidines et également le squelette désoxyribose (Halliwell and Gutteridge, 1986). $^1\text{O}_2$ attaque principalement la guanine (voir réaction) et H_2O_2 et $\text{O}_2^{\bullet-}$ ne réagissent pas (Wiseman and Halliwell, 1996). Les ROS peuvent causer la suppression des bases, la formation des dimères de pyrimidine, la rupture des brins d'ADN, les modifications des bases par leur alkylation et leur oxydation (Tuteja and Tuteja, 2001).

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

6. Les antioxydants

Pour se protéger contre les ROS et leurs dérivés, les cellules végétales utilisent des systèmes de défense antioxydants enzymatiques et non enzymatiques (Duquesnoy et al., 2010; Yadav et al., 2010). La concentration des ROS dans les tissus de la plante est le résultat d'un équilibre dynamique entre les taux de leur production et de leur élimination par les antioxydants (Djébal et al., 2011).

6.1 Les principaux antioxydants non enzymatiques

Les principaux antioxydants non enzymatiques sont l'ascorbate, le glutathion, la proline, les α -tocopherols, les caroténoïdes et les flavonoïdes.

6.1.1. L'ascorbate

L'acide L-ascorbique ou vitamine C (ASC) est un antioxydant omniprésent dans les plantes. Contrairement aux cellules animales, sa concentration est très élevée dans les cellules végétales (plusieurs mM) ce qui en fait un composant incontournable. Les feuilles vertes contiennent de l'acide ascorbique et de la chlorophylle dans des concentrations équimolaires. L'ASC joue un rôle important dans la croissance, la différenciation et le métabolisme cellulaire. (Foyer et al., 1994). Il est toutefois beaucoup plus connu pour ses propriétés antioxydantes. L'ASC est synthétisé à partir de D-glucose et agit comme un réducteur dans le cytosol et les chloroplastes (Chen and Gallie, 2004; Foyer and Noctor, 2005a). Il se lie avec le superoxyde, le peroxyde d'hydrogène ou les radicaux de tocophérol pour donner de l'acide monodéhydroascorbique (MDHA) ou de l'acide déhydroascorbique (DHA) (**voir figure 7**)

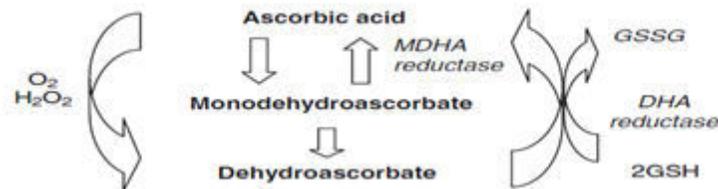


Figure 7 : Synthèse et dégradation de l'acide ascorbique (Lyubenova and Schröder, 2010)

Ces derniers peuvent être recyclés en acide ascorbique, un processus catalysé par la monodéhydroascorbate reductase (EC 1.6.5.4) et la déhydroascorbate reductase (EC 1.8.5.1) en utilisant le NAD(P)H⁺ et le GSH comme sources d'électrons. Le déshydroascorbate peut également être métabolisé en tartrate ou oxalate (Lyubenova and Schröder, 2010).

6.1.2. Le glutathion

Le glutathion (L- γ -glutamyl-L-cystéinyglycine) est un tripeptide, avec un groupement thiol, très abondant ; il se retrouve de façon ubiquitaire chez les animaux et les végétaux. C'est le composant majeur de la voie AsA-GSH chez la plupart des plantes (Anjum et al., 2012; Noctor and Foyer, 1998; Yadav et al., 2010).

Chez les plantes, le glutathion joue un rôle important dans la régulation du développement des procédés, tels que la division cellulaire (Vernoux et al., 2000) et la floraison (Ogawa et al., 2004). Il est impliqué dans une multitude de processus cellulaires, y compris la défense contre les ROS (Foyer and Noctor, 2005b; Mullineaux and Rausch, 2005), la détoxification des xénobiotiques et la séquestration des métaux lourds (Cobbett and Goldsbrough, 2002a; Freeman et al., 2004). Ce phénomène est assuré par des réactions de conjugaison catalysées par la glutathion S-transférase. Le glutathion représente une forme majeure de transport et de stockage de soufre réduit (Dixon et al., 1998; Yadav et al., 2010) et est considéré comme un biomarqueur du stress oxydatif (Anjum et al., 2012).

Le GSH est synthétisé par deux réactions dépendantes de l'ATP, où la γ -glutamylcystéine synthétase (γ -ECS, EC 6.3.2.2) catalyse la formation d'une liaison peptidique entre le groupe carboxyle de glutamate et le groupe amino de la cystéine pour donner γ -glutamylcystéine (γ -EC). Dans la deuxième réaction, le glutathion synthétase (GS, EC 6.3.2.3) assure la ligature d'un résidu de glycine avec γ -CE pour former le GSH (Wachter and Rausch, 2005) (**Voir figure 8**).

Dans **la figure 8**, apparaissent les deux formes redox distinctes du glutathion ; La forme réduite (GSH) est un tripeptide stable, à fort pouvoir réducteur et la forme oxydée (GSSG) est le glutathion disulfide (Koivula and Eeva, 2010).

L'état redox du GSH dans les plantes, du moins dans les feuilles, est remarquablement constant. Il est très sensible au stress oxydatif provoqué par les facteurs de stress, y compris les métaux lourds et les métalloïdes. Il change aussi au cours des réactions non enzymatiques de GSH avec différents ROS (tels que, $^1\text{O}_2$, $\text{O}_2^{\cdot-}$, OH^{\cdot} et H_2O_2). Le changement dans le rapport du GSH réduit sur GSSG oxydé au cours de la dégradation des ROS est important dans certaines voies de signalisation redox. Le maintien de l'équilibre entre les deux formes est assuré par le cycle d'oxydoréduction du glutathion (Anjum et al., 2012; Foyer and Noctor, 2005b; Millar et al., 2003).

La figure 8 indique que le cycle d'oxydo-réduction fait intervenir deux enzymes essentielles, la glutathion réductase (GR, EC:1.6.4.2) qui transforme le glutathion oxydé (GSSG) en sa forme réduite (GSH) et la glutathion peroxydase (GPx, EC: 1.11.1.9) qui active la réaction de transformation des hydroperoxydes ainsi que l'oxydation du glutathion réduit (GSH) en glutathion oxydé (GSSG). Ce cycle contient également la glutathion S-transférase (GST).

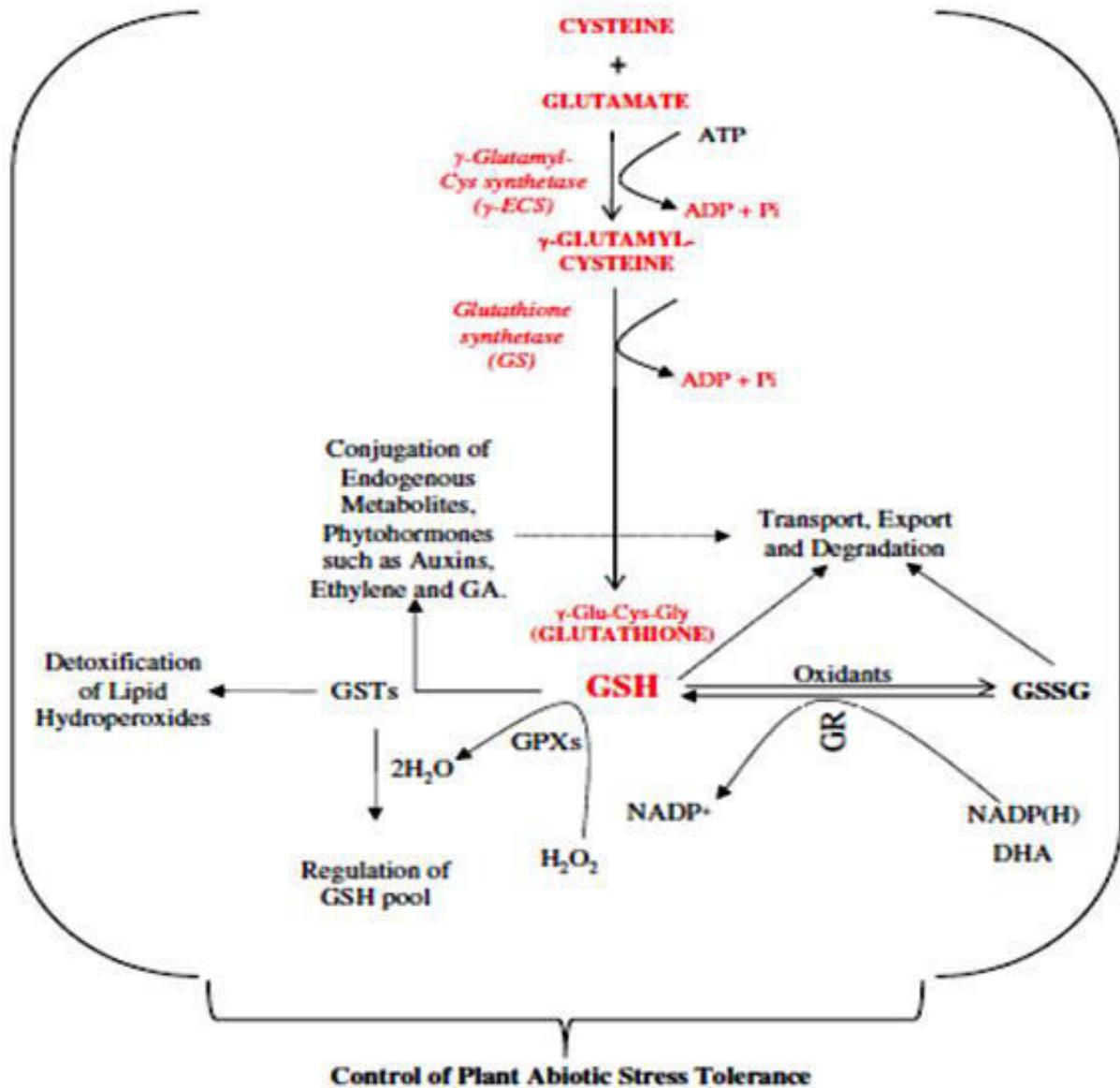


Figure 8 : Biosynthèse et cycle d'oxydoréduction du glutathion (Anjum et al., 2012), modifié par Gill et al. (2013).

qui catalyse la réaction de conjugaison entre le glutathion réduit et les substances étrangères (xénobiotiques, carcinogènes et composés électrophiles, etc... avec la formation des métabolites glutathion-conjugués (Gill et al., 2013).

6.1.3. La proline

Outre son rôle dans le métabolisme primaire en tant que constituant des protéines, la proline est l'une des molécules souvent accumulée en réponse à des contraintes environnementales variées. Elle joue un rôle important dans la tolérance des plantes aux contraintes environnementales. Elle est considérée comme un antioxydant non enzymatique dont les plantes ont besoin pour agir contre les ROS (OH^\cdot et $^1\text{O}_2$) formés lors d'un stress salin, métallique ou lors d'une déshydratation (Rejeb et al., 2012).

La proline joue plusieurs rôles : stabilisateur de protéines et de complexes macromoléculaires, piègeur de radicaux libres, régulateur du potentiel redox cellulaire, chélateur de métaux et inhibiteur de la LPO. Sa concentration intracellulaire dépend d'une régulation fine entre sa biosynthèse et sa dégradation (Gill and Tuteja, 2010).

La capacité de la proline à piéger les ROS et à inhiber l'apoptose causée par les ROS est une fonction importante dans la réponse à un stress cellulaire. Siripornadulsil et al., (2002) ont rapporté que le taux de la proline libre est en corrélation avec l'état redox du GSH et les taux de le MDA dans les algues traitées avec le cadmium. Ces résultats montrent que la proline libre agit comme un antioxydant dans les cellules stressées par le cadmium. Gajewska and Skłodowska (2005) ont également étudié l'effet de Ni sur des plants de pois et ont constaté que la stimulation de l'activité de la GST ainsi que l'accumulation de la proline dans les tissus expliquent la tolérance des plants au stress induit par ce métal.

6.1.4. L' α -tocopherol

L' α -tocopherol ou vitamine E est une vitamine liposoluble recouvrant un ensemble de huit molécules organiques, quatre tocophérols et quatre tocotriénols. Les tocopherols sont des antioxydants majeurs qui protègent les membranes en piégeant les radicaux libres, tels que $^1\text{O}_2$, et en bloquant la propagation de la réaction en chaîne de la peroxydation lipidique. Ils sont localisés au niveau de la membrane des thylakoïdes des chloroplastes et existent en quatre isomères dans la plante (α , β , γ , δ). La forme α possède la plus forte activité antioxydante, due à

la présence de trois groupes méthylés dans sa structure moléculaire. Elle est synthétisée à partir de γ -tocophérol dans les chloroplastes par la γ -tocopherol methyl transferase (γ -TMT) (Desel et al., 2007; Ghedira, 2005).

Récemment, il a été montré qu'une molécule d' α -tocophérol peut piéger jusqu'à 120 molécules de $^1\text{O}_2$ (Munne-Bosch, 2005). Il a été prouvé aussi que le stress oxydatif active l'expression de gènes responsables de la synthèse des tocophérols dans les plantes supérieures. Srivastava et al., 2005 ont rapporté une forte induction de l' α -tocophérol dans *Anabaena doliolum* sous le stress induit par le NaCl et le Cu^{2+} . Par ailleurs, le rôle de la vitamine E a été rapporté dans le stress lumineux (Giacomelli et al. (2007) et sous la sécheresse (Liu et al., 2008).

6.1.5. Les caroténoïdes

Les caroténoïdes sont des pigments végétaux lipophiles formant une famille de plus de 600 molécules. Ils assurent trois fonctions principales. Premièrement, ils absorbent la lumière à une longueur d'onde comprise entre 400 et 550 nm et la transfèrent à la Chl (Gill and Tuteja, 2010) ; deuxièmement, ils protègent l'appareil photosynthétique contre le triplet (Chl^3), le $^1\text{O}_2$ et d'autres radicaux libres nocifs qui sont naturellement formés au cours de la photosynthèse (Collins, 2001) ; troisièmement, ils stabilisent les complexes protéiques photocollecteurs et la membrane des thylakoïdes. En plus de leur rôle protecteur contre le stress oxydatif, les monoterpènes améliorent également la thermotolérance des plantes (Peñuelas and Munné-Bosch, 2005). De même, une augmentation de la teneur en carotène a été notée en présence du Cd (Foyer et al., 1994).

6.1.6. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes constituent un groupe de plus de 6.000 composés naturels très répandus dans le règne végétal (Ghedira, 2005). Ils sont parmi les métabolites secondaires les plus réactifs dans les plantes. Ils se trouvent généralement dans les feuilles, les parties florales et les pollens.

Les flavonoïdes assurent plusieurs fonctions telles que la pigmentation des fleurs, des fruits et des graines, la protection contre les UV et la défense contre les phytopathogènes. Ils jouent également un rôle dans la fertilité des plantes et la germination des pollens et agissent en tant que molécules de signalisation dans les interactions plante-microbe (Olsen et al., 2010). La propriété des flavonoïdes la mieux décrite est leur activité antioxydante et leur capacité à piéger les

radicaux libres : radicaux hydroxyles (OH[•]), anions superoxydes (O₂^{•-}) et radicaux peroxylipidiques. Ils inactivent et stabilisent les radicaux libres grâce à leur groupement hydroxyle (C3-OH) fortement réactif. Ils sont également capables de chélater les ions métalliques (Ghedira, 2005). Des travaux ont montré que les niveaux des flavonoides augmentaient dans les cas de stress biotique et abiotique, tels que le stress hydrique, la toxicité aux métaux et la privation de nutriments (Winkel-Shirley, 2002).

6.2. Les enzymes antioxydantes

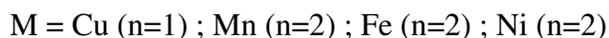
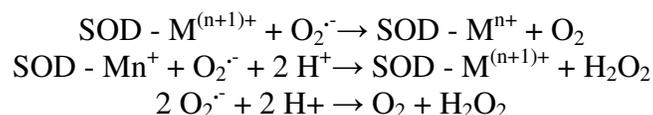
La défense enzymatique contre le stress oxydatif est représentée par CAT, POD, SOD, les enzymes du cycle de l'ascorbate (APX, DHAR, MR, et GR) et les enzymes du cycle d'oxydoreduction du glutathion (principalement GR et GPX). Ces enzymes agissent en cascade et chacune d'elles assure une réaction. Le produit de l'une est généralement le substrat de l'autre (voir tableau 1).

Tableau 1 : Les enzymes antioxydantes majeures impliquées dans la détoxification des ROS.

Enzymatic antioxidants	Enzyme code	Reactions catalyzed
Superoxide dismutase (SOD)	EC 1.15.1.1	$O_2^{\cdot-} + O_2^{\cdot-} + 2H^+ \rightarrow 2H_2O_2 + O_2$
Catalase (CAT)	EC 1.11.1.6	$H_2O_2 \rightarrow H_2O + \frac{1}{2}O_2$
Ascorbate peroxidase (APX)	EC 1.11.1.11	$H_2O_2 + AA \rightarrow 2H_2O + DHA$
Guaicol peroxidase (GPX)	EC 1.11.1.7	$H_2O_2 + GSH \rightarrow H_2O + GSSG$
Monodehydroascorbate reductase (MDHAR)	EC 1.6.5.4	$MDHA + NAD(P)H \rightarrow AA + NAD(P)^+$
Dehydroascorbate reductase (DHAR)	EC 1.8.5.1	$DHA + 2GSH \rightarrow AA + GSSG$
Glutathione reductase (GR)	EC 1.6.4.2	$GSSG + NAD(P)H \rightarrow 2GSH + NAD(P)^+$

6.2.1. La superoxyde dismutase

La superoxyde dismutase ou SOD (EC 1.15.1.1) est une métallo-enzyme se retrouvant dans tous les organismes aérobies. Elle est la première enzyme antioxydante de défense contre le stress oxydatif biotique ou abiotique. Elle catalyse la dismutation de deux anions superoxydes en dioxygène et en peroxyde d'hydrogène (Arora et al., 2002) et diminue le risque de formation du radical OH[•] via la réaction de Habere-Weiss (Mittler, 2002). (Voir réactions ci-dessous).

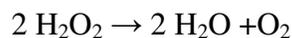
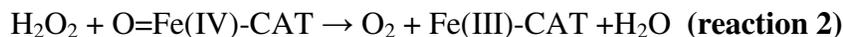
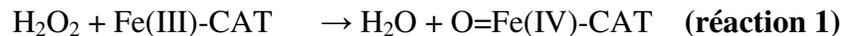


Selon le cofacteur métallique, 3 types de SOD sont connus, Cu/Zn-SOD, Mn-SOD et Fe-SOD. Elles sont localisées dans différents compartiments cellulaires (Mittler, 2002), essentiellement dans la mitochondrie et les peroxysomes pour Mn-SOD, dans les chloroplastes pour Fe-SOD (Alscher et al., 2002) et dans le chloroplaste et le cytosol pour Cu/Zn-SOD (Luis et al., 2003).

6.2.2. La catalase

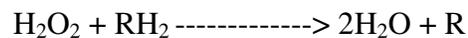
La catalase ou CAT (EC 1.11.1.6) est une enzyme peroxysomale assurant la dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau et en dioxygène (Arora et al., 2002). C'est une enzyme indispensable pour la détoxification des radicaux libres durant le stress. Elle est formée de quatre chaînes polypeptidiques d'environ 500 acides aminés. Chacune d'elles possède un groupe hémique comprenant un atome de fer (Reid et al., 1981). Une molécule de catalase peut convertir 6 millions de molécules d'H₂O₂ en H₂O et O₂ par minute (Polidoros and Scandalios, 1999).

Pour catalyser la réaction, l'atome de fer réalise une coupure hétérolytique de la liaison O-O du peroxyde d'hydrogène, créant de ce fait une molécule d'eau et un groupement Fe(IV)=O hautement oxydant (**réaction 1**). Ce dernier peut ensuite oxyder une autre molécule de peroxyde d'hydrogène pour donner du dioxygène et de l'eau (**réaction 2**).



6.2.3. La peroxydase III

La peroxydase ou POD (EC 1.11.1.7) est une hémoprotéine qui catalyse la réduction du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) par de nombreux substrats, tels que les composés phénoliques et les précurseurs de lignine, (Halušková et al., 2010) selon l'équation suivante :



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

Dans les tissus d'un certain nombre de plantes, l'activité de la POD est corrélée de manière significative avec les niveaux élevés de Cu (Mocquot et al., 1996), de Zn (Weckx and Clijsters,

1997) et de Cd (Schützendübel and Polle, 2002). L'augmentation de son activité joue un rôle clé dans le mécanisme de défense cellulaire contre le stress oxydatif (Assche and Clijsters, 1990).

6.2.4 Les enzymes du cycle de l'ascorbate

L'autre système de détoxification des ROS chez les plantes est le cycle de l'ascorbate-glutathion (AsA-GSH). Il s'agit de la principale voie de métabolisation du H₂O₂ dans les organismes photosynthétiques. Celle-ci est donc importante pour le maintien de l'homéostasie cellulaire chez les plantes exposées aux métaux et aux métalloïdes. En fait, la voie de l'AsA-GSH est un élément clé du réseau de réactions faisant intervenir des enzymes importantes et des métabolites ayant des propriétés redox pour l'élimination efficace de la majorité des ROS. Cela donc permet d'éviter les dommages oxydatifs induits par les ROS chez les plantes (Asada, 1992).

Le cycle de l'AsA-GSH se déroule dans le stroma plastidal. Différents mécanismes enzymatiques conduisent à l'élimination de l'espèce oxygène superoxyde formée au niveau du pôle accepteur d'électrons du PSI (Farineau and Morot-Gaudry, 2006).

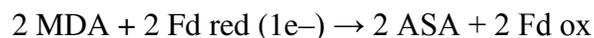
La **figure 9** montre que ce cycle est catalysé principalement par APX, la MDHAR, la DHAR et la GR. Il se poursuit dans les chloroplastes des plantes afin d'éliminer de grandes quantités de H₂O₂ générées durant la photosynthèse. L'activité spécifique élevée de ces enzymes dans des plastes indique clairement qu'il s'agit de la principale voie de métabolisation du H₂O₂ dans ces organites photosynthétiques et dont l'ascorbate peroxydase est l'enzyme clé (Chew et al., 2003).

Dans le chloroplaste, H₂O₂ est éliminé par l'action de l'acrobate peroxydase agissant en présence de l'acide ascorbique.

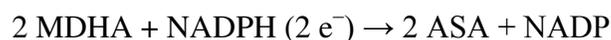


Le monodéhydro-ascorbate est une forme semi oxydée de l'ascorbate après perte de son proton. La régénération de l'acide ascorbique a lieu selon trois voies (Farineau and Morot-Gaudry, 2006) par :

- la ferredoxine réduite au niveau de la surface du thylacoïde:



- l'action de la monodéhydroascorbate réductase (MDHAR) au niveau du stroma :



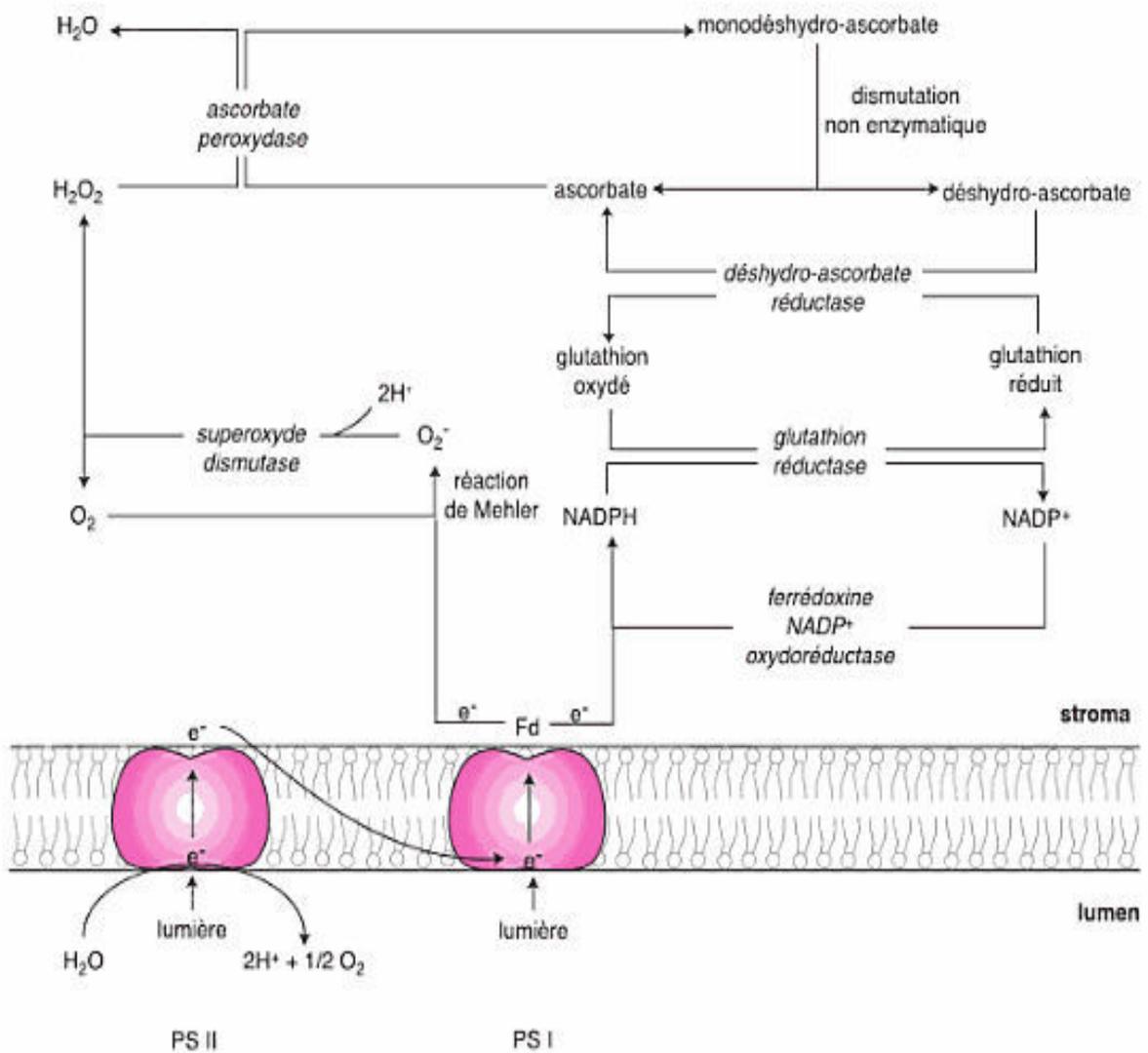
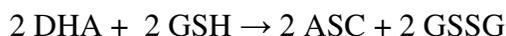


Figure 9 : Cycle de l'ascorbate-glutathion (Farineau and Morot-Gaudry, 2006).

- l'action de la déhydroascorbate réductase (DHAR) qui catalyse la réduction du DHA en ASC, via l'oxydation de deux molécules de GSH :



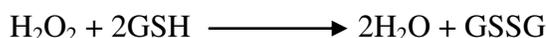
La dernière réaction de ce cycle est la réduction du GSSG par la glutathion réductase utilisant pour cela du NADH comme cofacteur : $\text{GSSG} + \text{NADPH} \rightarrow 2 \text{ GSH} + \text{NADP}^+$

6.2.5. Les enzymes du cycle d'oxydoréduction du glutathion

Il existe plusieurs enzymes qui jouent directement ou indirectement un rôle essentiel dans l'élimination de l'excès des ROS et des produits de leurs réactions dans les organismes vivants, y compris les plantes. Le glutathion réduit est la principale molécule antioxydante. Son rôle est très important dans la détoxification des composés toxiques par des réactions de conjugaison catalysées par la GST. Afin de maintenir un équilibre entre sa forme réduite et oxydée dans les cellules, le cycle d'oxydoréduction du glutathion fait intervenir deux enzymes anti oxydantes essentielles : GR et GPx qui participent à la régulation du rapport GSH/GSSG (Ballatori et al., 2009; Bashan et al., 2009; Díaz-Flores et al., 2012).

6.2.5.1 La glutathion peroxydase

Les GPXs sont une grande famille des isoenzymes qui catalysent la réduction des hydroperoxydes organiques et lipidiques et de H_2O_2 en utilisant le glutathion réduit comme donneur de protons, ce qui provoque son oxydation en glutathion oxydé (GSSG) et aide les plantes à lutter contre le stress oxydatif (Noctor et al., 2002) (**voir réaction**).



Millar et al., (2003) ont identifié plusieurs isoenzymes chez *Arabidopsis* présents dans le cytosol, le chloroplaste, les mitochondries et le réticulum endoplasmique. Ainsi, le Cd augmente l'activité de la GPX dans les cultivars de plantes *C. annuum* (León et al., 2002) et la tolérance au stress abiotique chez les plantes transgéniques est améliorée par la surexpression de la GPX (Gill and Tuteja, 2010).

6.2.5.2 La glutathion réductase

Le maintien de l'activité de la GSH-péroxydase nécessite la régénération du GSH qui est assurée par la GSH-réductase (voir figure 10). Cette enzyme est une oxydoréductase de la famille des flavoprotéines. Elle catalyse la réduction du GSH en utilisant le NADPH comme cofacteur (Romero-Puertas et al., 2006). Il s'agit d'une enzyme potentielle du cycle de l'ASH-GSH qui joue un rôle important dans le système de défense contre les ROS en maintenant l'état réduit du GSH. Elle se trouve chez les procaryotes et les eucaryotes (Meyer and Hell, 2005). Chez les plantes, cette dernière est localisée principalement dans les chloroplastes, mais une petite quantité de cette enzyme a également été trouvée dans les mitochondries et le cytosol. Elle joue un rôle crucial dans le système cellulaire antioxydant de défense des plantes contre les contraintes biotique et abiotique et elle maintient le GSH nécessaire pour le fonctionnement des cellules de la plante (Rao and Reddy, 2008).

7. Les principales enzymes de détoxification des métaux lourds

Outre son rôle dans le système antioxydant et la défense contre les ROS, le GSH joue un rôle fondamental dans de nombreux processus de détoxification cellulaire des xénobiotiques et des métaux lourds. Le processus de détoxification des métaux lourds par le glutathion chez les plantes se fait soit :

- directement par l'action de la glutathion S-transferase (GST) où le glutathion forme un conjugué avec le métal.
- indirectement par l'action de la phytochélatine synthase (PCS) où le glutathion sert un substrat pour la synthèse des phytochélatines (qui forment un complexe avec les métaux).

Les deux enzymes, GST et PCS, sont considérées comme les principales enzymes de détoxification des métaux chez les plantes (Yadav et al., 2010).

7.1. La glutathion S-transferase

La GST est une grande famille d'enzymes catalysant la conjugaison du glutathion avec de nombreux substrats xénobiotiques ou composés naturels souvent cytotoxiques de nature électrophiles, selon la réaction suivante : $GSH + R-X \rightarrow GSR + HX$ (RH représente un substrat électrophile). C'est l'enzyme majeure de la détoxification enzymatique des xénobiotiques (Anjum et al., 2012). Elle est très soluble et est largement répandue dans les eucaryotes ; chez les plantes,

elle représente 2% des enzymes solubles (Frova, 2003). Elle est dimérique et chaque sous-unité porte deux sites de fixation. Le premier est spécifique au GSH, site « G » au niveau du N terminal, alors que le second est spécifique pour le substrat proprement dit, site « H » formé par le domaine C terminal (Axarli et al., 2004; Del Buono et al., 2007; Zhang et al., 2013).

Les GST interviennent dans la réponse des plantes aux stress biotique et abiotique. Dans l'organisme, elles catalysent la conjugaison du glutathion avec les herbicides et les métaux en les désactivant. Elles peuvent avoir des activités peroxydase, isomérase ou thiol transférase et intervenir dans l'homéostasie des hormones et la modulation de la signalisation cellulaire (Dixon et al., 2010). Noctor et al., (2002) rapportent que les GST participent à l'élimination des composés génotoxiques ou cytotoxiques qui peuvent réagir et endommager l'ADN, l'ARN et les protéines.

Les GST végétales sont donc une famille de protéines de séquences divergentes avec une structure conservée qui se lie sélectivement au GSH et inductible par le stress. Elles sont dans la plupart du temps cytosoliques, mais on les trouve également dans les microsomes, les plastides, les nucleus et les apoplastes (Foyer and Noctor, 2005b). En ce qui concerne les études transcriptomiques et protéomiques, le groupe le mieux étudié des GST est celui d'*Arabidopsis thaliana* où l'on retrouve 54 membres de la famille des gènes des GST. Ceux-ci sont subdivisés en 7 classes : phi, tau, theta, zeta, lambda, DHAR et TCHQD. Les six premières sont les plus communes chez les plantes (Halušková et al., 2009) et chacune d'elle assure une fonction spécifique (Dixon et al., 2010) (**voir tableau 2**).

Tableau 2 : Les différentes classes de GST communes dans les plantes (Lyubenova and Schröder, 2010).

Enzymes	Localisations	Fonctions
Phi	Cytosol (+ chloroplast)	Réponse au stress (telle que sécheresse), métabolisme des hormones végétales,
Tau	Cytosol (+ nucleus)	Réponse au stress biotique et abiotique, détoxification des herbicides via GSH.
Theta	Peroxisome + nucleus	Activité peroxydase
Zeta	Cytosol	Activité isomérase
Lambda	Cytosol + chloroplast (+ peroxisome)	Activité réductase
DHAR	4 Cytosol + chloroplast + peroxisome	Cycle de l'acorbate par réduction de l'ascorbate.

7.1.1. Rôle de la GST de la classe tau dans la détoxification des métaux

Plusieurs chercheurs ont montré le rôle de la GST de la classe tau dans le processus de détoxification des métaux (Lyubenova and Schröder, 2010; Marrs, 1996; Licciardello et al., 2014). C'est une sous classe de GST qui se trouve beaucoup plus dans le cytosol mais aussi dans le nucleus. Chez les plantes, les gènes de cette classe sont induits lors d'un choc thermique, d'une infection par un agent pathogène ou d'une exposition aux métaux lourds et aux herbicides. La forte expression de ces gènes a été observée :

- dans les feuilles d'orge exposées aux Cu^{2+} , Cd^{2+} et Zn^{2+} (Kunieda et al., 2005).
- dans les racines du riz en présence des Cd, Co, Pb et Zn (Moons, 2003).
- chez *Hordeum. vulgare* exposée à l'Hg (Halušková et al., 2009).

7.1.2. Mécanisme de détoxification des métaux par la GST

Le mécanisme de l'inactivation des métaux lourds par la GST consiste à la formation d'un conjugué GSH-TM (selon le métal) qui va être transporté vers les vacuoles (Mendoza-Cózatl et al., 2005). Le complexe formé est acheminé dans les vacuoles par les transporteurs membranaires ABC ou transporteurs à ATP Binding Cassette dans le tonoplaste (DeRidder et al., 2002; Edwards et al., 2000; Martinoia et al., 2000) pour être soit séquestré, soit secrété à l'extérieur de la plante ou stocké sous forme stable inactive (Dalton et al., 2009).

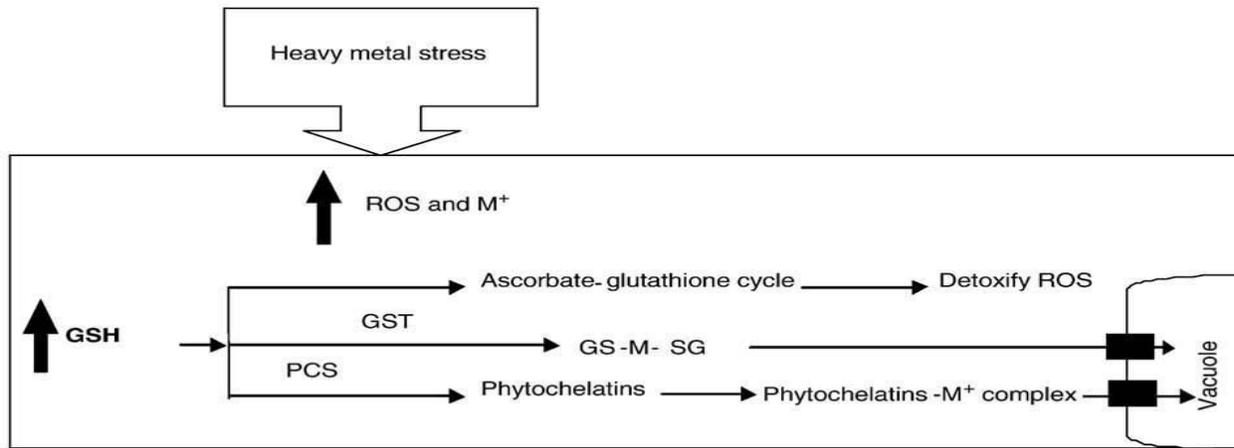


Figure 10 : Détoxification des métaux lourds par le glutathion dans les plantes (Yadav, 2010).

La figure 10 montre le mécanisme de détoxification des métaux lourds par le glutathion. L'exposition des plantes à l'excès de métaux lourds génère des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et favorise l'accumulation des ions métalliques (M^+). Premièrement le glutathion détoxifie les ROS par le cycle ascorbate-glutathion. Deuxièmement, la glutathion-S-transférase catalyse la conjugaison du GSH avec les ions métalliques pour être séquestrés dans la vacuole. Troisièmement, le GSH est également utilisé par la phytochélatine synthase (PCS) dans la synthèse des phytochélatines (PC). Ces dernières forment des complexes avec les ions métalliques dans le cytosol et les transportent vers la vacuole (Yadav et al., 2010)

7.2. La phytochélatine synthase

La phytochélatine synthase est une γ -glutamyl-cystéine transpeptidase. Elle catalyse la production de phytochélatines $[(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{Gly}]$ (avec $n = 2-11$) à partir du glutathion ($\gamma\text{-Glu-Cys-Gly}$). Elle est activée par une variété de métaux lourds qui vont se lier aux phytochélatines. La première structure identifiée d'un membre de la famille des phytochélatine synthase a révélé un repliement d'enzymes de type de celui des protéases à cystéine avec un mécanisme catalytique conservé (Wünschmann et al., 2007).

Les phytochélatines (PC) sont des polypeptides qui se trouvent chez toutes les plantes. Elles jouent un rôle important dans la détoxification de nombreux métaux lourds toxiques. Elles ont une structure générale $(\alpha\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$, où $n = 2$ à 11 (Tsuji et al., 2003). Elles possèdent en C-terminal un acide aminé variable, tel que la glycine, l'alanine, la serine ou l'acide glutamique, et sont classées en fonction de cet acide aminé terminal (Cobbett and Goldsbrough, 2002a).

Ce sont des peptides riches en cystéine qui se lient aux ions métalliques tels que : le Cd^{2+} , l' Ag^+ , le Bi^{3+} , le Pb^{2+} , le Zn^{2+} , le Cu^{2+} , l' Hg^{2+} , etc (Loeffler et al., 1989). Le modèle le plus documenté sur le mécanisme de détoxification par les phytochélatines concerne le Cd (Cobbett and Goldsbrough, 2002b) (**voir figure 11**). La reconnaissance de l'ion métallique se fait par la partie C-terminale alors que la partie N-terminale agit comme un domaine catalytique. La chélation se fait à partir de liaisons formées entre les unités sulfures de la cystéine et de l'ion métallique. Ainsi le complexe formé, Cd-PC, va se déplacer dans la vacuole. En raison des conditions acides dans la vacuole, le complexe se dissocie et le Cd^{2+} est chélaté par des acides organiques vacuolaires, tels que le citrate et le malate (Gadapati and Macfie, 2006).

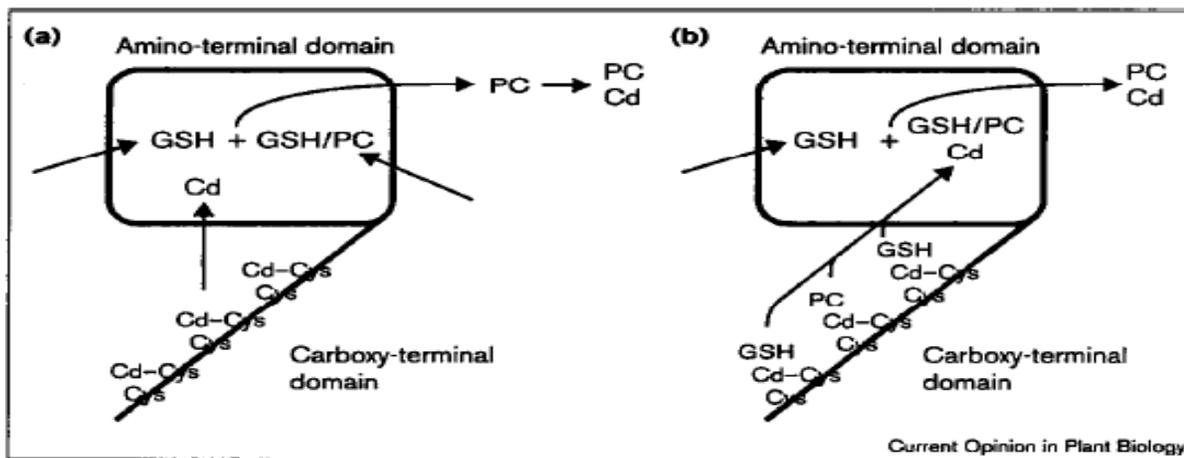


Figure 11 : Modèles schématiques pour la fonction de la phytochélatine synthase (Cobbett, 2000).

D'après la **figure 11**, le domaine C-terminal agit comme un capteur local d'ions de métaux lourds. Les résidus Cys se lient aux ions du Cd, les mettant à proximité du domaine catalytique N-terminal. Ce domaine activé catalyse le transfert du groupement $\gamma\text{Glu-Cys}$ d'une molécule de glutathion sur une deuxième molécule de GSH (ou une molécule de PC existante) pour former la PC. Dans le modèle a, le Cd interagit avec les résidus Cys et ensuite avec un site d'activation du domaine N-terminal qui est distinct des sites de PCs/GSH-*substrate-binding*. Le produit de la PC formé se lie au Cd. Dans le modèle b, les ions de Cd cytoplasmiques liés au GSH ou à la PC précédemment formée, interagissent d'abord avec les résidus Cys dans le domaine C-terminal, puis avec le site catalytique du N-terminal où le Cd reste une partie intégrante du substrat et par conséquent, le produit de la réaction (Cobbett, 2000).

DEUXIÈME PARTIE :
MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Zone d'étude

La zone d'étude est une ancienne mine d'antimoine ayant fait l'objet d'une exploitation à ciel ouvert jusqu'en 1952. Elle est située dans le Nord-est de l'Algérie, plus précisément dans la Wilaya d'Oum El Bouaghi (35 ° 58 '37, 64 "N-7 ° 11' 22, 80" E 36 ° 01 '09, 78 "N-7 ° 14 '38, 38" E) au flanc de la montagne « Djebel Hamimat », à une altitude moyenne de 865 m. Le climat est semi-aride, méditerranéen avec un hiver frais. La température annuelle moyenne de l'air est de 14,3 °C et la précipitation annuelle totale est en moyenne de 435 mm, avec la saison des pluies de Novembre à Avril.

2. Echantillonnage du sol et des plantes

Cinq zones d'échantillonnage sont sélectionnées sur et autour des déblais de mine le long des berges de la rivière. Les prélèvements sont effectués selon un gradient de niveaux de pollution en Arsenic (As) et en Antimoine (Sb).

Les deux plantes sélectionnées pour cette étude sont *Hedysarum pallidum* Desf. (une Fabacea) et *Lygeum spartum* L. (une Poacea), car elles ont la capacité de tolérer de fortes concentrations en métalloïdes dans le sol (Rached-Mosbah et al., 1992). Pour le dosage des métalloïdes, vingt échantillons de chaque plante sont sélectionnés au hasard dans les trois zones les plus polluées sur et à proximité des dépouilles minières.

Pour la mesure de l'activité des enzymes, les racines et les parties aériennes de six spécimens de *H. pallidum* et de *L. spartum* sont collectées au hasard et séparément au niveau de 5 zones (Z1, Z2, Z3, Z4 et Z5) classées selon le gradient de concentration en Sb et en As dans le sol.

3. Méthodes de dosage biochimiques

3.1. Mesure du malonedialdéhyde (MDA)

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

0,5 g des plantes fraîches, broyées en poudre par l'azote liquide, sont homogénéisées avec 5 mL d'une solution contenant de l'acide trichloroacétique (TCA) à 20% et de l'acide thiobarbiturique (TBA) à 5%. Le mélange est incubé à 95 ° C pendant 30 min et la réaction est arrêtée par immersion des tubes dans la glace. Le mélange refroidi est centrifugé à 5000g pendant 10 min à 25 °C. L'absorbance non spécifique à 600 nm est soustraite de l'absorbance à 532 nm et la concentration en MDA est déterminée par son coefficient d'extinction molaire $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Elle est exprimée en $\mu\text{mol/gramme}$ de tissu.

3.2. Mesure de l'activité des enzymes antioxydantes

3.2.1. Préparation des échantillons

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

3.2.2. La superoxyde dismutase (SOD)

L'activité de la SOD cytosolique est déterminée selon la méthode de Marklund and Marklund, (1974). Le principe repose sur la capacité d'inhibition de l'autoxydation du pyrogallol par la SOD à 420 nm.

La mesure de l'activité est réalisée dans un volume final de 3 ml. A 2,85 ml de tampon Tris HCl (0.1M, pH 8,2) sont additionnés 0,1 ml de l'extrait enzymatique, 25 μl de la catalase (30 μM dans du tampon phosphate 0,1M, pH 9) et 25 μl de pyrogallol (24 mM préparé dans 10 mM de HCl). Après incubation de 30 s, le changement de l'absorbance est mesuré à 420 nm à chaque minute, dans un intervalle de temps de trois minutes.

L'activité de la SOD est exprimée en Unité/mg de protéine. Une unité de l'activité de la SOD est définie comme l'enzyme qui causerait l'inhibition de 50 % de l'autoxydation de pyrogallol.

3.2.3. La catalase (CAT)

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

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

3.2.4. La peroxydase (POD)

La mesure de l'activité de la peroxydase est effectuée selon la méthode de Chance and Machly (1967). Le purpurogalline formé entre l' H_2O_2 et le pyrogallol, par l'action de la peroxydase, est déterminé par la mesure de l'absorbance à 420 nm contre un blanc.

0,5 ml de l'extrait enzymatique est ajouté au mélange réactionnel contenant 2 ml de tampon phosphate 0,1 M, pH 6,8, 1 ml de pyrogallol 0,01M et 1ml H_2O_2 0,05 M. Le mélange est incubé à 25° pendant 5 mn. La réaction est arrêtée par l'addition de 1 ml de 2,5 N H_2SO_4 .

Le blanc est préparé par l'addition de l'extrait enzymatique après H_2SO_4 et l'activité enzymatique est exprimée en unité = 0,1 absorbance $\text{mn}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de protéine.

3.2.5. L'ascorbate peroxydase (APX)

La mesure de l'activité de l'ascorbate peroxydase est réalisée selon la méthode de Nakano and Asada (1980). La réaction est basée sur l'oxydation de l'ascorbate par l'ascorbate peroxydase en présence de H_2O_2 à 290 nm ($\epsilon = 2.8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Le mélange réactionnel contient 4 μl de H_2O_2 50 mM et 40 μl d'extrait enzymatique dans 956 μl de tampon phosphate 50 mM, pH 7 contenant de l'ascorbate à 0,5 mM. La lecture se fait directement chaque minute durant 2 à 3 mn au maximum. L'activité enzymatique est exprimée en $\mu\text{M mn}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de protéine.

3.2.6. La glutathion S-transferase (GST)

La mesure de la glutathion S-transférase est effectuée selon la méthode de Habig and Jakoby (1981) détaillée dans le Kit de SIGMA. Le principe est basé sur la mesure de l'absorbance à 340 nm du complexe Glutathione-2,4-Dinitrobenzene formé entre le GSH et le CDNB par l'action de la GST ($\epsilon=9,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

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

Une unité correspond à la conjugaison de 1 μ mole de 1-chloro-2,4-dinitrobenzene avec le glutathion réduit par minute.

3.3. Dosage des protéines

Les concentrations de protéines sont quantifiées selon la méthode de Lowry et al., (1951) en utilisant la BSA comme protéine étalon.

4. Culture *in-vitro* de deux populations d'*H. pallidum*

4.1. Matériel végétal

Les graines de deux populations d'*H. pallidum* cueillies au mois de juin 2011 sont utilisées pour l'étude de l'expression des gènes de la GST en réponse à différentes concentrations en antimoine dans le milieu de culture. La première population provient des déblais de mine et la deuxième d'une zone non contaminée située à proximité du site.

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

Les graines des deux populations d'*H. pallidum* sont scarifiées à l'aide d'un scalpel, stérilisées pendant 30 min avec du bayrochlore à 1% puis rincées plusieurs fois avec H₂O distillée stérile. Elles sont ensuite mises à germer dans des boîtes de pétri contenant du papier filtre imbibé d'eau ultra pure stérile pendant 24 h à l'obscurité, à 4°C. Les graines sont ensuite transférées dans de gros flacons à bouchon contenant le milieu MS/2 solide (Murashige and Skoog, 1962) (**voir**

annexe 1) traité avec l'antimoine à raison de 6 graines par boîte pour chaque concentration. Les boîtes sont ensuite placées dans la chambre de culture à 22°C, avec une photopériode de 16 h par jour pour une durée de 20 jours.

5. Clonage et séquençage des gènes de la GST tau et de l'actine

5.1. Choix des amorces

L'actine est choisie dans notre étude comme gène de ménage, car elle est parmi les gènes de contrôle qui ne changent pas d'expression en cas de stress dans la plante (Giulietti et al., 2001; Ghareeb et al., 2011)

Comme les gènes de l'actine et de la GST d'*H. pallidum* ne sont pas encore élucidés, nous avons cherché, dans la banque NCBI, les gènes de la GST et de l'actine d'une plante de la famille d'*H. pallidum*, *Caragana korchinski* et de deux proches de la famille, *Medicago truncatula* et *Glycine max*. Nous nous sommes basés sur les résultats de la banque nucléotidique générale (nr) et expressed sequence tag (est) de NCBI. L'objectif est de trouver des séquences consensus entre les GST de ces plantes et celles de l'actine de ces mêmes plantes. Ces séquences serviront comme amorces pour l'amplification des gènes de *H. pallidum*.

La comparaison entre les séquences est réalisée par deux moyens : L'utilisation du logiciel de comparaison BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) et l'établissement de l'arbre phylogénique (www.phylogeny.fr).

5.2. Extraction de l'ADN génomique de *H. pallidum*

L'ADN est extrait à partir de feuilles congelées (3 à 4 jeunes feuilles) dans des tubes Eppendorf de 1,5 ml par broyage au broyeur à bille pendant 5 min (2 tubes pour deux individus des déblais de mine et deux tubes pour les individus témoins). Avant que les échantillons ne décongèlent, 500 µl de tampon tris HCl pH 8 100 mM et 300 µl de SDS 20% (w/v) sont ajoutés dans chaque tube ; le tampon d'extraction contient de l'EDTA 50 mM, du NaCl 500 mM, du β-mercaptoéthanol 10 mM.

Le mélange est incubé pendant 10 min à 65°C puis additionné de 130 µl d'un mélange d'acétate de potassium composé à 60 % d'acétate de potassium (v/v), 11,5 % d'acide acétique pur à (v/v) et 28,5 % de H₂O (v/v). Après agitation, les tubes sont mis dans la glace pendant 5 min

puis centrifugés à une vitesse de 10000 x g à 4°C pendant 10 min. Les surnageants sont transférés dans des tubes de 2 ml préalablement remplis de 640 µl d'isopropanol et de 60 µl d'acétate de sodium 3M pH 5,2. Après une bonne agitation, les tubes sont incubés 10 mn dans la glace puis centrifugés à 15000 g à 4°C pendant 15 min. Les culots sont récupérés, rincés par 0,5 ml d'éthanol froid à 70 % (v/v) puis centrifugés de nouveau à 15 000 g pendant 10 min. Les culots obtenus sont laissés sécher pendant une nuit puis repris dans 100 µl d'eau Milli-Q et congelés à -20°C.

L'ADN est dosé au NanoDrop Spectrophotometer. L'absorbance est lue à 260 nm en utilisant 1 µl d'ADN. La concentration est affichée directement sur l'appareil en ng/µl.

5.3. Test des amorces et amplification des gènes à partir de l'ADN génomique

Plusieurs amorces sont utilisées pour l'amplification des gènes de GST et de l'actine (voir tableau 3).

Tableau 3 : Les différents couples d'amorces choisis pour l'amplification de quelques gènes de GST tau et d'actine d'*H. pallidum*.

Nom des amorces		Séquence (5'-3')
GST1 (long)	F	CAGGAATTCTGCTAGATTTCTGGCCAAGTCC
GST1 (long)	R	GGTCTGCAGTCTCCCAACTGTTCTCCAAC
GST1 (court)	F	CAGGAATTCGCCCTTGCTGAAAAGGGTATC
GST1 (court)	R	GGTCTGCAGCAACATAATCAGCCCAGAATC
GST2	F	CAGGAATTCGGAAGCCATTTGTGTGCAGGG
GST2	R	GGTCTGCAGTCCTTCAGCTCATTCTCAAG
Act 1 (long)	F	CAGGAATTCAGAAGCTGAGGATATTCAACC
Act 1 (long)	R	GTGCTGCAGCTTTTGCAATCCACATCTG
Act 2 (court)	F	CAGGAATTC AACCCAAAGGCTAATCGTGAG
Act 2 (court)	R	GTGCTGCAGTGTCATTTTCTCACGATTAGCC
Act 2 (long)	F	CAGGAATTCTACAATGAACTTCGTGTGGC
Act 2 (long)	R	GTGCTGCAGACCTGTTGTACGACCACTGGC
Act 1 (court)	F	CAGGAATTCGGTGAAGGCTGGATTTGCTGG
Act 1 (court)	R	GTGCTGCAGCAACATCACACTTCATGATAG

F et R correspondent au couple d'amorces sens et anti-sens (ou forward et reverse).

Long et court correspondent à la taille du fragment à amplifier.

Les réactions PCR sont réalisées pour chaque couple d'amorces et pour les différentes combinaisons. Dans un volume final de 40 µl sont ajoutés 1 µl d'ADN génomique, 5 unités

d'ADN Polymerase, le tampon approprié à l'enzyme (Green GoTaq™ Reaction Buffer, Promega), 125 µM de dNTPs et 20 pmol d'amorces.

5 tubes sont préparés pour chaque couple d'amorces :

- 1 tube témoin où l'eau est utilisée à la place de l'ADN génomique,
- 2 tubes pour l'ADN des plantes témoins,
- 2 tubes pour l'ADN des plantes des déblais de mine.

L'amplification est réalisée par le thermocycleur «Master Cycler gradient» en appliquant le programme de 3 mn à 94°C pour la dénaturation suivie d'une série de 49 cycles avec trois phases :

- dénaturation de 30 s à 94°C,
- hybridation des amorces avec la séquence adéquate de 30 s à la température spécifique d'hybridation des amorces,
- élongation à 72°C de 1 min et 30 s.

À la fin des 49 cycles, les échantillons sont mis à 4°C pour stopper la réaction.

5.4. Séparation de l'ADN par électrophorèse

L'électrophorèse des fragments d'ADN clonés est réalisée sur un gel d'agarose (à 1,2 % w/v) dans lequel est ajouté le bromure d'éthidium (BET) (1µl pour 50 ml du gel). Ce dernier intercale les acides nucléiques et fluoresce sous un rayonnement ultraviolet (310 nm). La migration a lieu en présence du tampon TAE 0,5X à un voltage constant (de 50 à 100 V) pour une durée de 20 à 30 mn. Le marqueur de taille utilisé est le GeneRuler 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

5.5. Extraction et purification de l'ADN des gènes amplifiés

Les fragments d'ADN d'intérêt produits par la PCR et testés par l'électrophorèse sont purifiés en utilisant le kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System Promega (**voir annexe 2**).

5.6. Plasmide et souche bactérienne utilisée

Le plasmide utilisé pour cloner les gènes est le Blue Scribe KS+ (pBS KS+) développé dans la souche bactérienne *E coli* DH5 α (voir figure 12).

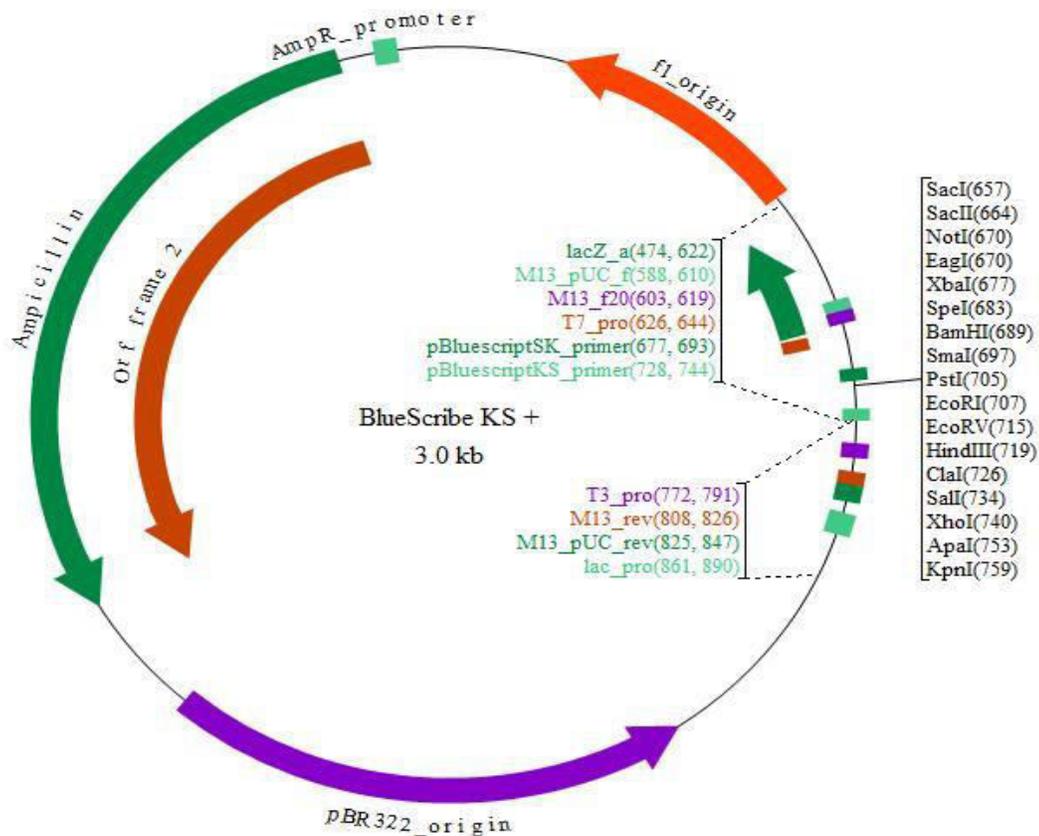


Figure 12 : Carte de restriction du Blue Scribe KS+ (<http://www.biovisualtech.com/bvplasmid/BluescribeKSPlus.htm>)

Le pBluescript KS est un phagemide de 2964 pb dérivé de pUC19. Il possède une origine de réplication de phage filamenteux f1, une origine ColE1, le promoteur Lac Z (pour la sélection des colonies bleues et blanches), le gène de la β -lactamase qui confère aux bactéries transfectées la résistance à l'ampicilline. La cassette de clonage est flanquée par les séquences promotrices des ARN polymérases des phages T3 et T7, permettant la transcription des inserts ; elle est placée en phase dans le gène codant pour la partie N-terminale de la β -galactosidase (lacZ).

5.7. Culture bactérienne et extraction des plasmides

La suspension bactérienne transformée par le plasmide (pBS KS+), est mise en culture sur milieu LB (composé de : bactotryptone 1g, extrait de levure 0,5g et NaCl 1g pour 100 ml) en

présence de l'ampiciline à 200 mg/L, pendant une nuit à 37°. Les plasmides sont extraits selon le kit Promega (Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System) (**voir annexe 3**).

5.8. Digestion enzymatique des fragments d'ADN et des plasmides

La double digestion enzymatique est effectuée aussi bien pour les plasmides où les gènes sont clonés que pour les fragments d'ADN de la GST et de l'actine, par les enzymes de restriction : EcoR1 et PST1. Le mélange de digestion est constitué de 10 µL de tampon H, 4,5µL d'EcoR1, 4,5µL du PST1 et 1 µL de BSA. A ce mélange sont ajoutés :

- pour la GST et l'actine, 50 µL d'ADN extrait à partir du produit de la PCR et 30 µL d'eau ultra pure.
- pour le plasmide, 70 µL d'ADN plasmidique (3 à 5 µg) et 10µL d'eau ultra pure.

Après agitation et incubation au bain marie pendant 3 h à 37°C, les échantillons (100 ml de volume final) sont congelés à -20°C.

5.9. Purification et précipitation des fragments de GST et d'actine

Cette étape a pour but de supprimer les polymérases, de dessaler la solution d'ADN (enlever le tampon) et de concentrer l'ADN.

100 µl de l'ADN issu de la digestion sont ajoutés à 50 µL d'H₂O et 100 µL de phénol. Le mélange est additionné de 100 µL de chloroforme puis centrifugé à 15000 g pendant 5 min. Le surnageant récupéré (150 µl) est additionné de 150 µL de chloroforme. Après une deuxième centrifugation, le surnageant est récupéré à nouveau puis mélangé à 10% d'acétate de sodium 3M, pH 5,2 et 2V d'éthanol pur. Après centrifugation le surnageant est jeté et le culot rincé par 500 ml d'éthanol.

Après une dernière centrifugation, le surnageant est jeté et le culot laissé sécher. Ce dernier est repris dans 10 µL d'eau ultra pure pour la GST et l'actine et 20 µL pour le pBS KS+. Après cette étape une électrophorèse est effectuée pour vérifier la présence et la qualité des ADN et du plasmide avant leur transformation dans les bactéries compétentes.

5.10. Clonage des produits de la PCR

Le clonage des fragments de l'ADN est fait par :

- ligation des fragments d'ADN aux plasmides (pBS KS+)

- transformation des nouveaux plasmides dans les bactéries thermocompétentes (*E coli* DH5a)

- Sélection des clones.

Pour la ligation, 1 μ L de plasmide pBS KS+ (à peu près 26 ng) est mélangé aux fragments de l'actine et de la GST purifiés. 0,9 μ L de T4 DNA Ligase (Promega) et 1 μ l du tampon 10X ATP (Promega) sont ajoutés au mélange (le volume final de la réaction est de 10 μ l). Le mélange final est mis dans une chambre froide à 4°C durant une nuit.

La transformation des nouveaux plasmides est effectuée sur les bactéries thermocompétentes. Pour cela, 1 μ L du produit de la ligation est mélangé aux bactéries puis incubé pendant 30 minutes dans la glace. Après un choc thermique de 90 secondes à 42°C, les échantillons sont remis dans la glace pendant 2 minutes. Ensuite, 1 ml de LB liquide sans ampicilline est ajouté et les échantillons sont mis en culture à 37°C pendant 1h sans agitation. Pour vérifier la qualité de la transformation, la suspension bactérienne est étalée sur un milieu LB solide contenant de l'ampicilline (200 mg/l) et incubée à 37°C pendant une nuit.

La sélection des clones est réalisée selon le test X-GAL avec réétalement des clones bactériens (après l'incubation d'une nuit) sur des boîtes carrées contenant un milieu LB solide mélangé à l'ampicilline (à 200 mg/l), à l'IPTG (à 1 mM) et au X-GAL (50 mg/l). Les boîtes sont incubées à 37° pendant une nuit.

La présence de l'insert est vérifiée aussi par PCR en utilisant les amorces universelles M13 Forward - M13 Reverse. Les colonies bactériennes contenant les inserts sont mises en suspension dans un milieu LB liquide avec ampilicine. L'ADN plasmidique est envoyé pour le séquençage à la société GATC (www.gatc-biotech.com).

6. Analyse statistique

Les tests statistiques réalisés au cours de ce travail sont la moyenne \pm SEM, l'analyse de la variance suivie du test Tukey et l'analyse de la variance à trois facteurs (ANOVA). Le traitement des résultats est effectué à l'aide des logiciels XLStat752 (version 7.5) et STATISTICA (version 6.0) et un seuil de signification de 0,05.

TROISIÈME PARTIE :
RÉSULTATS ET DISCUSSION

Chapitre I :

**Effets des Sb et As du sol sur la
peroxydation lipidique et les enzymes du
stress oxydatif chez *H. pallidum* et chez *L.
spartum*.**

1. Choix des plantes

Les espèces végétales qui poussent dans la zone étudiée, une ancienne mine d'antimoine, possèdent différents comportements se répartissant selon les trois types suivant (Rached-Mosbah et al., 1992).

- Toxicophobes (ou non résistantes), ne se trouvant que dans les sols à faible teneur en métalloïdes.

- Toxicophytes (ou résistantes), se développant beaucoup plus sur des substrats très toxiques.

- Indifférentes, présentes aussi bien sur les sols à fortes concentration en métalloïdes que sur les sols à faible concentration.

Parmi les espèces indifférentes, Rached-Mosbah et al., (1992) ont montré que *Hedysarum pallidum* Desf. et *Lygeum spartum* L. ont la capacité de tolérer de fortes concentrations en antimoine dans le sol, soit par leur accumulation dans les tissus comme c'est le cas pour *H. pallidum*, soit par la tendance à les exclure de leurs tissus comme c'est le cas pour *L. spartum*.

Hedysarum pallidum est une plante vivace, cespiteuse, à longue tige plus ou moins prostrée qui appartient à la famille des *Leguminosae*, ou *Fabaceae*, et à la sous famille des *Papilionoaceae*, endémique du Nord d'Afrique (Quézel and Santa, 1962). Elle a un intérêt agronomique grâce à sa qualité fourragère et à sa capacité d'améliorer la fertilité des sols par la fixation de l'azote atmosphérique. Elle peut être exploitée dans la valorisation des régions dégradées, surtout dans les zones arides et semi-arides (Hannachi-Salhi et al., 2004)

Lygeum spartum L. (Poaceae) est une graminée vivace des régions méditerranéennes semi-arides qui peut tolérer des conditions extrêmes de sécheresse, de salinité et des températures élevées (Nedjimi, 2009). Elle est recommandée notamment pour les projets de restauration des zones arides. Dans une expérience sur terrain, Alvarez Rogel et al., (2001) ont démontré que *L. spartum* peut être utilisée comme un bio-indicateur de la salinité des sols. Elle a également été suggérée comme une espèce appropriée pour la phytoremédiation en raison des taux élevés de translocation de Cd vers les tissus aériens (Conesa et al., 2007).

2. Concentrations des métalloïdes dans les zones d'échantillonnage

Les concentrations des métalloïdes dosées antérieurement dans le sol par Bentellis A. (Benhamdi et al., 2014) sont synthétisées dans le **tableau 5**. De fortes disparités des niveaux du Sb et de l'As sont observées avec des concentrations variant de 1 mg/kg à 81 500 mg/kg pour le Sb et de 10 mg/kg à 3000 mg/kg pour l'As.

Tableau 5 : Teneurs en Sb et As des sols des zones étudiées

	Zone (Z1)	Zone 2 (Z2)	Zone 3 (Z3)	Zone 4 (Z4)	Zone 5 (Z5)
Sb (mg/ kg)	2,0±0.2c [1.0 -3.2]	344 ±41c [200-530]	2800±417c [1099-4104]	12600±1970b [6220-18991]	62000±4924a [41590-81446]
As (mg/kg)	14±2c [8-22]	170±15c [120-240]	350±27bc [249-450]	670±72b [432-949]	2300±186a [1556-3080]

Les valeurs sont représentées en fonction de la MOY ± SEM de six répétitions. Pour chaque variable, les différentes lettres indiquent les différences statistiques entre les zones correspondantes (en utilisant ANOVA suivie par le test de Tuckey, $p < 0,05$).

Dans la zone 1, les concentrations en As et en Sb sont inférieures aux seuils imposés par la majorité des pays pour les sols agricoles, tandis que dans les zones 2, 3, 4 et 5, elles sont toutes au-dessus des concentrations maximales admissibles (10 mg/kg pour le Sb et de 2 à 50 mg/kg pour l'As) (Kabata-Pendias, 1985). La zone 1 peut être considérée comme un contrôle. Les rapports moyens des concentrations du Sb dans les zones 2, 3, 4 et 5 sur celle de la zone 1 sont respectivement de 170, 1400, 6300 et 31000. Comparés à l'étude de Wilson et al., (2010) pour d'autres zones minières d'antimoine, les niveaux de Sb des autres zones sont globalement plus élevés.

3. Accumulation de l'antimoine et de l'arsenic par les deux plantes

Les concentrations des métalloïdes dosées antérieurement dans les plantes sont synthétisées dans le **tableau 6**. Les concentrations de Sb dans les deux parties des plantes des deux espèces (**tableau 6**) sont supérieures aux valeurs normales de 0,1-200 µg/kg proposées par Markert (1992). Il en est de même pour l'As dont les concentrations sont également plus élevées que celles qui sont considérées comme normales (0,01 à 1,5 mg/kg) dans la majorité des échantillons des deux espèces.

Tableau 6 : Bioconcentration de Sb et d'As (mg.kg^{-1}) dans les deux parties d'*H. pallidum* et de *L. spartum*.

Plants	Sb			As		
	Racines	Parties aériennes	TF	Racines	Parties aériennes	TF
<i>H. pallidum</i>	90,02 ± 11,48 [20,86-182,94]	72,20 ± 16,80 [4,05-263,04]	1,21 ± 0,31 ^a [0,053-4,94]	27,00 ± 7,37 [1,95-116,74]	10,75 ± 2,67 ^b [1,02-46,28]	0,86 ± 0,24 ^a [0,195-4,42]
<i>L. spartum</i>	61,04 ± 8,10 [11,06-126,18]	18,58 ± 3,53 ^b [1,79-54,49]	0,34 ± 0,055 [0,077-0,94]	71,66 ± 29,36 [4-611,01]	5,58 ± 2,39 ^b [0,11-49,78]	0,15 ± 0,04 [0,002-0,84]

Les résultats sont représentés en fonction de la MOY ± SEM de 20 échantillons. Les minimums et les maximums sont entre parenthèses. TF (facteur de transfert) : le rapport entre la concentration de l'As ou du Sb des parties supérieures sur les racines. ^a-Statistiquement différent par rapport à *L. spartum*. ^b-Statistiquement différent par rapport aux racines pour chaque plante.

Les teneurs maximales en Sb sont largement supérieures à celles trouvées dans les mêmes espèces, de la même zone, rapportées par Rached-Mosbah et al., (1992). Elles sont aussi supérieures à celles déterminées par Pratas et al., (2005) et Qi et al., (2011) dans les zones minières respectives du Portugal et de la Chine.

Il ressort que *H. pallidum* accumule plus de Sb que *L. spartum* dans ses parties aériennes ainsi que dans ses racines (**tableau 6**). C'est également le cas pour l'As dans les parties aériennes, mais, *L. spartum* accumule plus d'As dans les racines.

Cependant *H. pallidum* accumule le Sb légèrement plus dans ses parties supérieures que dans ses racines et l'As beaucoup plus dans ses racines que dans ses parties aériennes. *L. spartum* accumule les deux métalloïdes beaucoup plus dans ses racines que dans ses parties supérieures. Le facteur de transfert montre que le transfert du Sb et de l'As de la racine vers la partie supérieure est significativement ($p < 0,0001$) plus élevé dans *H. pallidum* que dans *L. spartum*.

En général, les plantes qui poussent sur un sol non contaminé accumulent de 0,0001 à 0,2 mg du Sb kg^{-1} et de 0,01 à 1,5 mg d'As kg^{-1} (Bowen, 1979). Les valeurs d'accumulation des métalloïdes par les deux plantes (voir tableau 6) dépassent les valeurs de référence de la phytotoxicité d'antimoine dans le tissu végétal (5-10 ppm) (Kabata-Pendias, 1985; Levresse et al., 2012) et les concentration typiques de l'arsenic dans les tissus végétaux (0,02 à 7 ppm) (Alloway and Alloway, 1995). En effet, les concentrations en Sb et en As dans *H. pallidum* et dans *L. spartum* sont plus élevées que celles des plantes provenant des mines abandonnées du Portugal (entre 0,01-139 ppm pour le Sb et 0,08 -30,07 ppm pour l'As) (Pratas et al., 2005).

Par contre les concentrations en Sb dans les deux plantes sont moins élevées que celles des plantes :

- de la zone active de l'exploitation minière du Sb en Chine (109-4029 mg de kg^{-1}) (Okkenhaug et al., 2011).

- des zones minières polluées , comme les deux parties de *Dittrichia viscosa* (environ 1136 mg Sb kg⁻¹) (Murciego et al., 2007) et les racines de *Juncus capitatus* Weig (186 mg en kg⁻¹) et *Scirpus holoschoenus* L. (jusqu'à 3164 mg Comme kg-1) (Otones et al., 2011).

Les résultats de l'accumulation des métalloïdes et de leur transfert vers les parties aériennes indiquent que les deux plantes les tolèrent. Comme l'As est transféré du sols vers les plantes, à travers les membranes cellulaires, par les mêmes transporteurs que ceux du phosphate (Asher and Reay, 1979), son accumulation en général est faible par rapport à l'antimoine vue le phénomène de compétition qui s'établie entre l'arsenic et le phosphate. Aussi, la translocation du Sb des racines vers les parties supérieures est peut être limitée par sa précipitation au niveau des barrières membranaires des racines qui contrôlent le transport des métaux dans les feuilles de certaines plantes (Pérez-Sirvent et al., 2012; Shtangeeva et al., 2011) comme c'est le cas pour *L. spartum*.

4. Effet de l'antimoine et de l'arsenic sur la peroxydation lipidique

La peroxydation lipidique a été évaluée par la mesure de la concentration du MDA dans les deux plantes *H. pallidum* et *L. spartum* (figure 13).

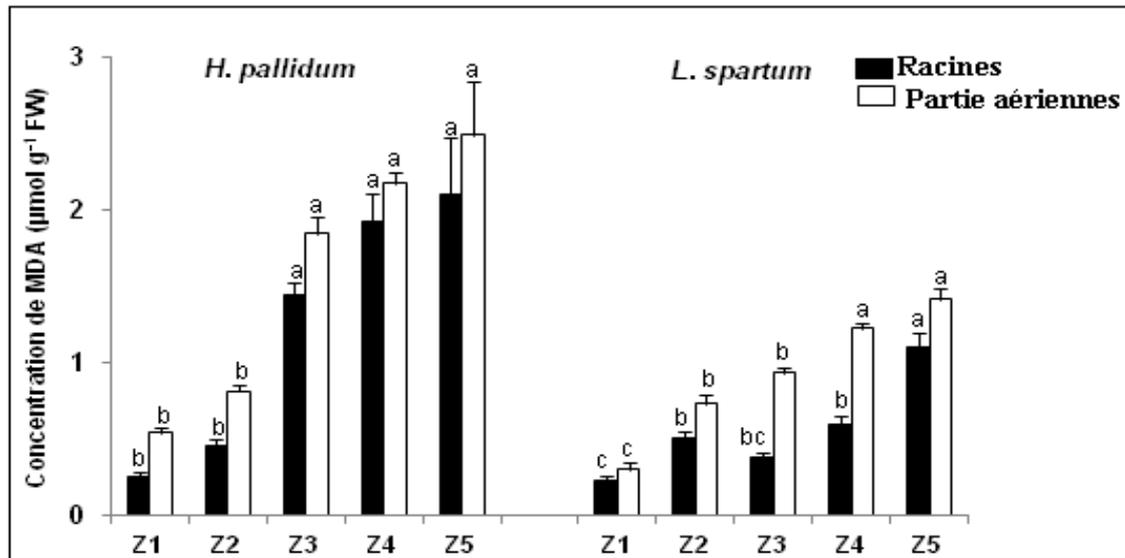


Figure 13: Evaluation du niveau du MDA dans les deux parties de *H. pallidum* et de *L. spartum* collectées dans l'ancienne zone minière d'antimoine de Djebel Hamimat. Les zones (Z1, Z2, Z3, Z4 et Z5) sont classées en fonction de l'augmentation des concentrations de Sb et d'As dans les sols. La zone 1 est considérée comme témoin. Les valeurs des concentrations du MDA représentent la moyenne \pm SEM (n = 6). Les lettres représentent les différences statistiques entre les cinq zones pour chaque partie de la plante (en utilisant ANOVA suivie par le test HSD de Tukey, $p < 0.05$).

La figure 13 montre que le MDA augmente très significativement avec l'augmentation de la concentration du Sb et de l'As chez les deux espèces, dans les différentes zones d'échantillonnage. Le MDA est significativement plus élevée chez *H. pallidum* que chez *L. spartum*, quelle que soit la partie de la plante, en particulier dans les zones 3, 4 et 5. Dans l'ensemble, les deux espèces produisent plus de MDA dans leurs parties supérieures.

L'exposition des plantes aux métaux lourds induit le stress oxydatif dans les plantes, en particulier le déclenchement de la peroxydation des lipides membranaires (Anjum et al., 2012). Les résultats du MDA indiquent que les effets de l'antimoine et de l'arsenic sont similaires à ceux des autres métalloïdes et métaux lourds (Schützendübel and Polle, 2002 ; Gill and Tuteja, 2010). Ils induisent donc la formation des ROS (tels que : $^1\text{O}_2$, $\text{O}_2^{\cdot-}$, OH^{\cdot} , H_2O_2 et ROO^{\cdot}), directement ou indirectement, dans *H. pallidum* et dans *L. spartum* et augmentent le niveau de la peroxydation des lipides dans les deux parties des plantes. Dazy et al., (2009) ont déduit que le premier site endommagé par les métaux lourds est la membrane cellulaire. En effet, les acides gras polyinsaturés des lipides membranaires vont réagir avec les ROS ou les intermédiaires oxygénés toxiques accumulés lors du stress induit par les

métalloïdes, pour former les radicaux lipidiques et les aldéhydes réactifs (Lyubenova et al., 2009). La conséquence majeure est l'altération de la fluidité et de la composition des membranes cellulaires.

Le niveau élevé du MDA dans les deux parties de *H. pallidum* par rapport à *L. spartum* indique un degré élevé de stress oxydatif et des dommages cellulaires dans cette plante. Cela peut être dû au fait que *L. spartum* accumule moins de Sb et d'As dans ses tissus que *H. pallidum*.

Néanmoins, les deux espèces produisent plus de MDA dans leurs parties aériennes que dans leurs racines, mais la différence entre le MDA dans les deux parties des plantes est non significative. Par conséquent, l'absorption des métalloïdes semble conduire à une plus grande toxicité dans les parties supérieures que dans les racines. Les résultats sont en accord avec ceux rapportés par Lamhamdi et al. (2011) qui ont constaté que le MDA était plus important dans les feuilles que dans les racines des plantules de blé exposées au plomb. Shri et al., (2009) ont conclu que la différence dans les voies de translocation entre les parties supérieures et les racines peut impliquer des différences dans les systèmes antioxydants et les mécanismes de séquestration.

Les métaux lourds provoquent une dégradation de la chlorophylle (Cherif et al., 2011; Dazy et al., 2009) qui peut être la conséquence de la peroxydation de la membrane des chloroplastes ou bien de la réduction des constituants de la membrane des thylakoides par les métaux lourds (Dazy et al., 2009; Pätsikkä et al., 2002). Cela peut expliquer le niveau du MDA plus élevé dans les parties aériennes que dans les racines des deux plantes.

5. Résultats les activités antioxydantes chez *H. pallidum* et *L. spartum*

L'effet de l'accumulation de l'antimoine et de l'arsenic chez *H. pallidum* et *L. spartum* est évalué par la mesure de l'activité des enzymes antioxydantes suivantes : SOD, CAT, POD, APX et GST.

5.1. La superoxyde dismutase (SOD)

Les résultats de l'activité de la SOD mesurée chez les deux plantes sont représentés dans la **figure 14**. L'activité de cette enzyme est différente dans les deux plantes. Dans l'ensemble, elle est plus élevée dans *H. pallidum* que dans *L. spartum*. Elle l'est davantage dans les parties racinaires que aériennes dans la zone 5 pour *H. pallidum* et dans la zone 3 pour *L. spartum*. Pour les autres zones, elle ne diffère pas beaucoup entre les parties des deux espèces.

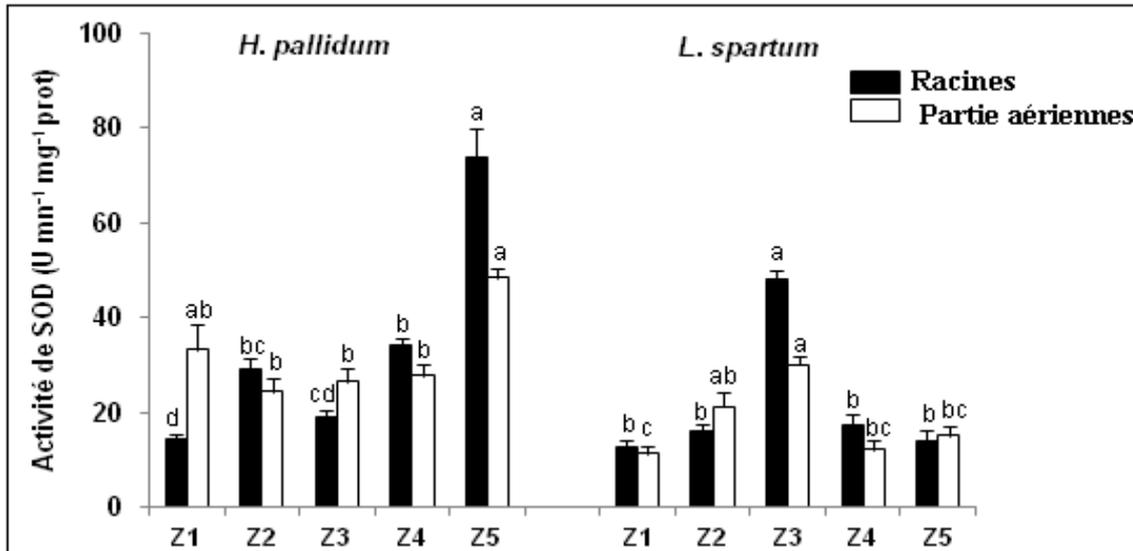


Figure 14 : Activités de la SOD des racines et des parties aériennes de *H. pallidum* et *L. spartum*.

La première enzyme de défense contre les ROS est la SOD. Elle catalyse la dismutation de radicaux superoxydes en H₂O₂ et en O₂ (Khan et al., 2009). L'augmentation de l'activité de la SOD mesurée dans *H. pallidum* est conforme aux résultats de Shri et al., (2009) qui ont montré une augmentation de son activité dans les racines de riz exposées à l'arsenic. Cela se traduit par une augmentation de la concentration des radicaux superoxydes O₂^{•-} et par conséquent, par une forte expression des gènes de la SOD, ce qui montre le rôle de celle-ci en situation de stress oxydatif (Alvarez and Lamb, 1997; Dazy et al., 2009). La diminution d'activité de la SOD dans les deux parties de *L. spartum* observée à de fortes concentrations en Sb et en As est la conséquence d'une sensibilité de l'enzyme à l'excès en H₂O₂ produit dans les cellules (Charles and Halliwell, 1980; Dietz et al., 1999). La baisse de l'activité de la SOD à forte concentration en métal a été rapportée par Hartley-Whitaker et al. (2001) chez *Holcus lanatus* en présence de As, par Dazy et al., (2009) chez *Fontinalis antipyretica* en présence de 10 M de Cu et par Duman and Ozturk, (2010) chez *Nasturtium officinale* R. Br. en présence de 5 mg/l de Ni.

5.2. La catalase (CAT)

Les résultats de l'activité de la CAT montrent une différence entre les deux plantes et même entre les parties de la même plante (voir **figure 15**)

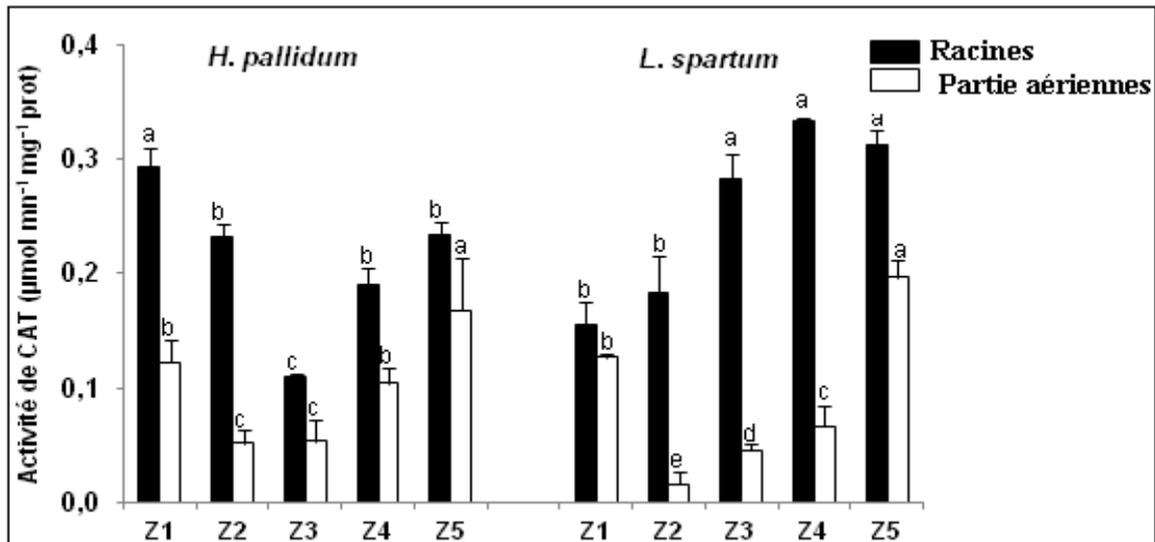


Figure 15 : Activités de la CAT des racines et des parties aériennes de *H. pallidum* et *L. spartum*.

L'activité de la CAT est significativement plus élevée dans les racines que dans les parties aériennes chez les deux espèces dans toutes les zones, sauf dans la zone 1 (contrôle) pour *L. spartum*. Lorsque les niveaux de pollution augmentent, la CAT diminue dans les racines de *H. pallidum* et augmente dans les racines de *L. spartum*. Dans les parties aériennes des deux plantes, l'activité est plus faible dans les zones 2, 3 et 4, par rapport à la zone contrôle, mais elle augmente et dépasse le contrôle dans la zone 5.

La variabilité de la réponse de l'activité de la CAT a été également observée chez plusieurs plantes lors de leur exposition aux métaux. Exemples, en présence de As (III), la CAT augmente dans les feuilles de *Zea mays* et diminue dans les racines (Duquesnoy et al., 2010) ; sous différentes concentrations en Pb^{2+} , Cd^{2+} et Hg^{2+} , l'activité de l'enzyme augmente dans les racines de *B. gymnorhiza* et dans les racines et les feuilles de *K. candel*, mais elle reste stable dans les feuilles de *B. gymnorhiza* (Zhang et al., 2007).

La CAT est une enzyme indispensable pour la détoxification des ROS pendant les conditions de stress. Elle catalyse la conversion de H_2O_2 en H_2O dans le peroxysome des plantes (Noctor and Foyer, 1998; Cherif et al., 2011). Cependant, le changement de ses activités est souvent difficile à interpréter. Cela peut s'expliquer par l'existence de plusieurs isoformes, comme rapporté par certains auteurs ; 2 pour *H. vulgare* (Azevedo et al., 1998), 4

pour *Helianthus annuus cotylédons* (Scandalios, 1997) et 3 chez le maïs (Azpilicueta et al., 2007). Dans ce dernier cas, les isoformes de la CAT ont été trouvés sur des chromosomes différents et exprimés de manière différente et indépendante (Scandalios, 1997).

Les différentes réponses de la CAT dans les parties aériennes et dans les racines de *H. pallidum* et de *L. spartum* peuvent donc s'expliquer par la présence d'isoenzymes qui répondent différemment aux peroxydes d'hydrogènes produits lors de l'exposition des plantes à de fortes concentrations en Sb et en As dans le sol.

5.3. La peroxydase (POD)

Les résultats des activités de la POD sont représentés dans la figure 16. Ils montrent une différence entre les deux espèces. L'activité est significativement plus élevée dans les parties aériennes de *L. spartum* par rapport à ses racines dans toutes les zones. Au contraire, l'enzyme présente en général, une activité plus importante dans les racines de *H. pallidum* que dans ses parties supérieures (en particulier dans la zone 5 où elle est sensiblement plus élevée que dans la zone contrôle). Toutefois, aucune modification significative n'est notée dans l'activité de la POD dans les parties supérieures de *H. pallidum*. Dans les tissus de *L. spartum*, les valeurs les plus élevées sont observées dans la zone 3 pour les deux parties de la plante.

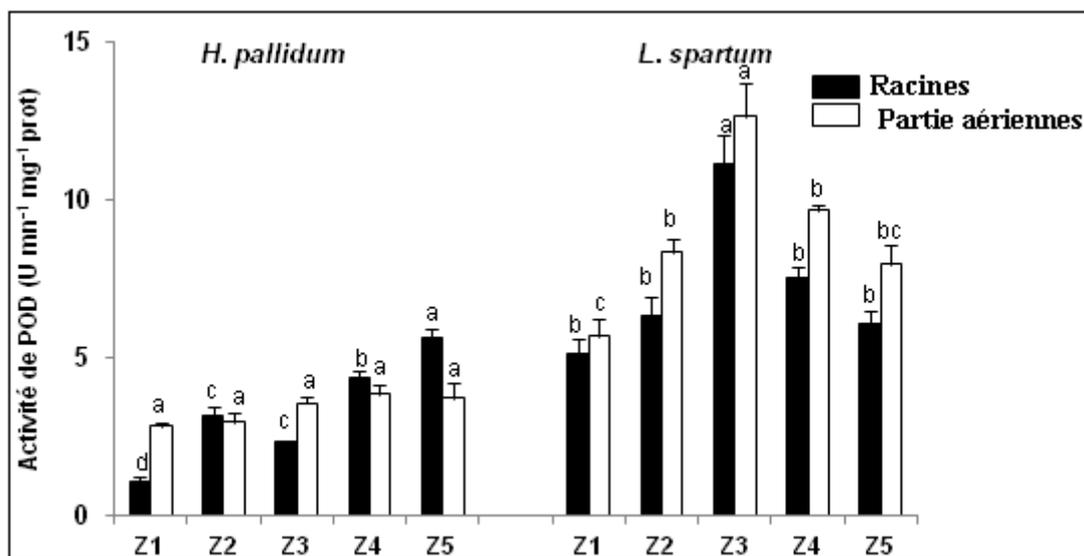


Figure 16: Activités de la POD des racines et des parties aériennes de *H. pallidum* et *L. spartum*.

L'augmentation de l'activité de la POD dans les racines et pas dans les parties aériennes (comme c'est le cas pour *H. pallidum*) a été observée pour d'autres plantes, telles que celles du riz exposés à des concentrations élevées en As (Shri et al., 2009) et celles de pommes de terre douces exposées aux Cd, Cu et Zn.

La POD représente une autre voie de destruction de l'H₂O₂ dans la cellule. Elle a plus d'affinité pour l'H₂O₂ que la CAT (Azcón et al., 2009; Jimenez et al., 1997 ; Lamhamdi et al., 2011). Cette enzyme joue un rôle important dans les mécanismes de défense des plantes en réponse à diverses conditions de stress (Kim et al., 2010). Son activation en cas de stress métallique est la conséquence de l'élimination de H₂O₂ et de la lignification des racines, comme réactions de défense afin d'éviter le flux incontrôlé des métaux (Halušková et al., 2010).

En outre, l'inhibition de l'activité de la POD à de fortes concentrations en Sb et en As (comme c'est le cas pour *L. spartum*) a été observée dans les plantes de maïs (*Zea mays*) en réponse à de fortes concentrations en Sb dans le sol (Pan et al., 2011) et dans les feuilles de cultivars des plantes de maïs (3223) en présence de niveaux élevés en Cd (Ekmekçi et al., 2008). La baisse des activités de la POD pourrait être causée par l'incapacité de la POD à éliminer l'excès du H₂O₂ ou par la formation d'un complexe protéique avec les métaux en provoquant des modifications au niveau de la structure de l'enzyme (Hou et al., 2007).

5.4. L'ascorbate peroxydase (APX)

L'activité de l'ascorbate peroxydase chez les deux plantes *H. pallidum* et *L. spartum*, en réponse aux différentes concentrations en métalloïdes, est résumée dans la **figure 17**.

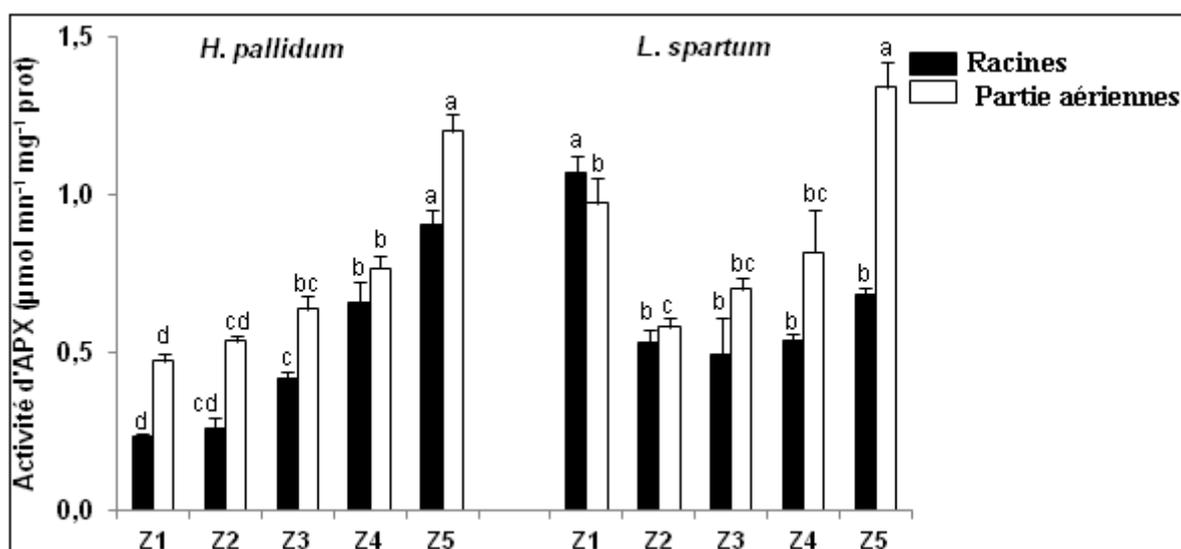


Figure 17 : Activités de l'APX des racines et des parties aériennes de *H. pallidum* et *L. spartum*.

Les résultats montrent que la variation de l'activité de l'APX est plus évidente chez *H. pallidum* et que les différences des activités entre les deux parties de *L. spartum*, sont plus importantes que chez *H. Hedysarum*, en particulier dans les zones les plus polluées (4 et 5).

Dans les deux parties de *H. pallidum*, l'activité de l'APX suit l'augmentation des concentrations du Sb et de l'As dans le sol. Cependant, elle diminue par rapport au contrôle dans les tissus de *L. spartum* récolté des zones 2, 3 et 4 puis, elle augmente dans la zone 5 ; dans ce cas, l'activité de l'APX dans la partie supérieure dépasse le contrôle de manière significative. Quant à celle mesurée dans les racines, elle est en-dessous du contrôle.

H₂O₂ produit lors du stress oxydatif est éliminé par la CAT, la POD et les enzymes du cycle de l'Ascorbate glutathion (Ashraf, 2009; Xu et al., 2011). Dans ce cycle, l'APX catalyse la réduction des peroxydes d'hydrogène en utilisant comme substrat l'ascorbate (Iturbe-Ormaetxe et al., 2001).

L'augmentation de l'activité de l'APX, dans les deux parties de *H. pallidum*, indique son rôle crucial dans l'élimination des ROS durant le stress induit par le Sb et l'As. Plus les quantités en Sb et en As dans le sol augmentent, plus *H. pallidum* devient stressée, ce qui a pour effet l'activation de l'APX pour se protéger contre les dommages oxydatifs. Cela indique la grande affinité de l'APX pour le H₂O₂ par rapport à la CAT et à la POD comme constaté par Gill and Tuteja, (2010). Il a été noté que les métaux lourds induisaient une forte activité de l'APX chez plusieurs plantes. C'est le cas du Pb dans les racines et les feuilles de blé (Lamhamdi et al., 2011), de l'As dans toutes les parties de la moutarde indienne (Khan et al., 2009) et dans les feuilles et les tiges des semis de riz (Shri et al., 2009), du Cd et du Zn dans les tournesols (Nehnevajova et al., 2012) et du Cr dans *Jatropha curcas* (Yadav et al., 2010). L'inhibition de l'activité de l'APX dans les racines de *L. spartum* est probablement due à l'excès des ROS qui affectent la structure de l'enzyme signalée par Luna et al. (1994) chez d'autres plantes. En effet, dans les feuilles d'*A. thaliana*, Drązkiewicz et al., (2004) ont montré que des niveaux élevés de ROS induits par le Cu, sont responsables d'un effet inhibiteur de l'activité de l'APX.

5.5. La glutathion S-transférase

Les activités de la GST mesurées chez *H. pallidum* et *L. spartum*, en réponse à différentes concentrations en métalloïdes, sont présentées dans la **figure 18**.

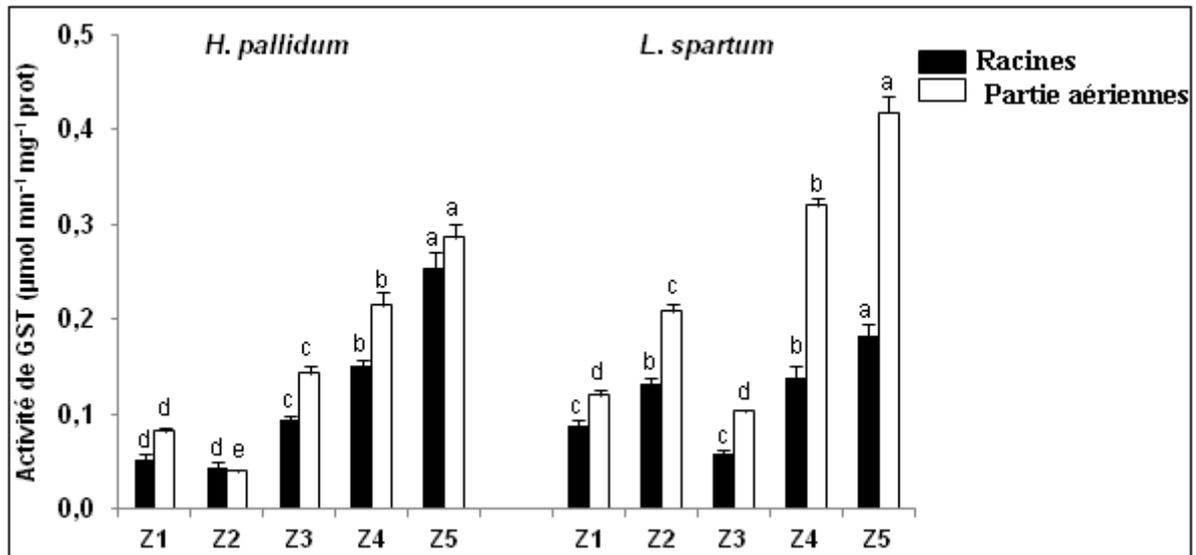


Figure 18 : Activités de la GST des racines et des parties aériennes de *H. pallidum* et *L. spartum*.

D'après la **figure 18**, l'augmentation de l'activité de la GST dans les deux plantes dépend de l'élévation des concentrations en métalloïdes dans le sol. Elle diminue dans les deux parties de la plante de la zone 2 pour *H. pallidum* et de la zone 3 pour *L. spartum*. Elle augmente ensuite à nouveau et dépasse le contrôle de manière très significative pour les deux parties des deux plantes de la zone 5. Cependant, la GST dans les racines de *L. spartum* de la zone 5 reste nettement moins active que dans celles de *H. pallidum*.

Les glutathion S-transférases représentent une famille d'enzymes qui jouent un rôle important dans la détoxification. Plusieurs recherches montrent son importance dans la séquestration des métaux lourds chez les plantes. Zhang and Ge (2008) ont montré l'implication de la GST dans la formation du GSH-Cd et sa séquestration au niveau des vacuoles.

L'augmentation de l'activité de la GST en réponse au stress métallique a été rapportée antérieurement pour les racines de l'orge exposées à plusieurs métaux (Pb, Ni, Hg, Co, Cu et Zn) (Halušková et al., 2009), chez la bactérie *Proteus mirabilis* en présence du Hg²⁺ (Zhang et al., 2013) et chez le maïs en présence de l'As (Requejo and Tena, 2012), dans les feuilles et les racines de *Pisum sativum* (Dixit et al., 2001), dans les racines de *Oryza sativa* et

Phragmites australis exposées au Cd (Iannelli et al., 2002) et dans les plants de peupliers exposés au zinc (Bittsánszky et al., 2005).

L'activité importante de la GST dans les parties supérieures de *L. spartum* pourrait s'expliquer par leurs faibles teneurs en Sb et en As. Au contraire, la faible activité de la GST dans les racines de *L. spartum* pourrait s'expliquer par leurs fortes concentrations en Sb et en particulier en As. Les petites différences entre l'activité de la GST des parties aériennes des plantes et des racines de *H. pallidum* induisent de petites différences entre elles dans l'absorption des métalloïdes. Le même type de réponse a été observé pour l'activité de la CAT dans les parties supérieures des deux plantes.

La faible activité de la GST dans les deux parties de *H. pallidum* et de *L. Spartum* respectivement dans les zones 2 et 3, peut s'expliquer par une régulation positive de la GST ou par une inactivation des isoenzymes à partir de certaines concentrations en métalloïdes. Des observations en faveur de cette dernière hypothèse ont été rapportées par plusieurs auteurs. En effet, l'existence des isoenzymes de la GST, constatée dans les racines du riz, s'explique par l'expression des gènes *osgstu3* et *osgstu4* (Moons 2003) et *OsGSTU6*, codant la classe des GST tau dans le riz, qui est fortement induite par le Cd (Zhang et al., 2013). L'expression du gène *GmGST (GH2/4)* dans le soja est également induite par le Cd et d'autres métaux lourds (Moons, 2003; Ulmasov et al., 1995). Cependant, nos hypothèses sur l'induction de l'expression de certaines isoenzymes et pas d'autres, doivent être confirmées par une étude moléculaire (voir le 2^{ème} chapitre).

6. Interaction entre le MDA et les activités enzymatiques pour les deux parties des espèces par rapport aux zones de récolte

L'évaluation des activités des enzymes antioxydantes montre des différences très nettes entre *H. pallidum* et *L. spartum*, quelle que soit la partie de la plante et de la zone d'échantillonnage. En effet, en dehors de la SOD, les activités des enzymes étudiées sont dans l'ensemble plus élevées dans *L. spartum* que dans *H. pallidum*.

Cependant, ces différences varient selon les parties des plantes. L'APX et la GST sont globalement plus actives dans la partie supérieure que dans les racines pour les deux espèces, alors que c'est l'inverse pour la SOD et la CAT. La POD est plus active dans les parties supérieures que dans les racines de *L. spartum* et l'inverse s'applique à *H. pallidum*. Il apparaît que ces différences varient également selon les zones.

L'analyse de la variance confirme les résultats et met en évidence une interaction très significative entre espèces, parties des plantes et zones pour le MDA et toutes les enzymes antioxydantes (voir **tableau 7**).

Tableau 7: ANOVA à trois facteurs (zones, espèces et parties) pour le MDA et les activités des enzymes antioxydantes.

Source	d.f.	MDA	SOD	CAT	POD	APX	GST
Zone (A)	4	50,2***	30***	59,06***	34,29***	51,13***	336,41***
Espèce (B)	1	75,1***	111,8***	10**	489,12***	37,78***	94,76***
Partis (C)	1	18,9***	4,9*	25,87***	16,04***	72,16***	303,78***
A × B	4	10,21**	61,3***	33***	28,19***	24,46***	39,49***
A × C	4	0,81ns	8,4***	36,56***	1,28ns	6,48***	28,19***
B × C	1	0,51ns	0,04ns	722,94***	13,26***	0,017ns	90,35***
A × B × C	4	0,66ns	16,27***	12,65***	4,49**	5,77***	20,70***

Les parties aériennes et racinaires de *H. pallidum* présentent la plus forte augmentation des activités de la SOD et de l'APX dans la zone la plus polluée (zone 5) et l'APX augmente de manière significative avec l'augmentation de la concentration en métalloïdes, ainsi qu'avec le contenu du MDA ce qui peut efficacement piéger l'H₂O₂. En outre, la SOD et l'APX de la même espèce montrent, en général, des activités simultanées qui peuvent être dues à leur co-régulation, ce qui est en accord avec des études antérieures sur les racines des plantules de riz exposées à l'As (Shri et al., 2009).

Les enzymes qui catalysent la conversion de l'H₂O₂ (POD et CAT) en eau semblaient être régulées différemment dans les deux parties de *H. pallidum*. Dans les racines, l'inhibition de l'activité CAT est concomitante avec l'activation de la POD, mais dans les parties supérieures, l'activité de la POD ne varie pas, alors que celle de la CAT augmente avec la concentration des métalloïdes.

Les enzymes de balayage de l'O₂^{•-} et de l'H₂O₂ (SOD et POD, respectivement) donnent des réponses similaires dans les deux parties de *L. spartum*. Cela est dû au fait que le H₂O₂ généré par la SOD est probablement dégradé par la POD. En effet, en se référant à Khan et al. (2009), la SOD catalyse la dismutation du radical superoxyde en H₂O₂ et la POD consomme ce H₂O₂. Ce qui indique que ces deux enzymes pourraient subir une co-régulation.

Les activités de l'APX et de la CAT montrent des tendances opposées dans les racines de *L. spartum*, ce qui pourrait être dû à une différence dans le mécanisme de protection cellulaire dans ces racines. Cependant, dans les parties aériennes de cette plante, les deux enzymes réagissent de façon similaire ; leurs activités augmentent face à de fortes concentrations de Sb et d'As dans les sols (zone 5) et ce, contrairement à celles de la POD et de la SOD qui baissent dans la même zone. Ainsi, il semble que la voie APX/CAT et la voie SOD/POD sont deux systèmes complémentaires dans le balayage des ROS dans *L. spartum*.

Par ailleurs, notre étude montre que les activités les plus importantes de la GST pour les deux parties des plantes correspondent aux deux zones les plus polluées. Ces activités montrent une variation similaire à celle du MDA. Plus les concentrations de métalloïdes dans le sol augmentent, plus les plantes deviennent stressées et plus la GST est activée pour lutter contre la toxicité induite par les métalloïdes.

Ainsi, pour se protéger contre les ROS et leurs intermédiaires, les cellules végétales et leurs organites, comme les chloroplastes, les mitochondries et les peroxysomes, développent des systèmes de défense antioxydants puissants (Duquesnoy et al., 2010; Yadav et al., 2010). La concentration des ROS dans les tissus de la plante est le résultat d'un équilibre dynamique entre les taux de leur production et de leur élimination (Djébali et al., 2011).

Conclusion

La présente étude a été effectuée sur deux espèces végétales (*H. pallidum* et *L. spartum*) poussant sur le sol d'une ancienne mine d'antimoine. Il ressort que l'augmentation du stress oxydatif, évaluée par les taux de MDA et l'activité de certaines enzymes antioxydantes présentes chez les espèces étudiées, varient en fonction des concentrations de deux métalloïdes présents dans le sol (Sb et As) ce qui montre leur adaptation à un environnement naturel hostile. Il ressort que *L. spartum* a mis au point un meilleur système de défense antioxydant par rapport à *H. pallidum*, en effet le taux du MDA est moins élevé chez cette espèce et les activités des enzymes sont dans l'ensemble plus élevées dans *L. spartum* que dans *H. pallidum*.

Chapitre II :
**Séquençage des gènes de la GST tau et de
l'actine de deux populations d'*H. pallidum*.**

1. Recherche des gènes codant la GST et l'actine à partir de l'ADN génomique des deux populations d'*H. pallidum*

1.1. Détermination des amorces pour l'amplification des gènes de la GST et de l'actine

L'ADN génomique est isolé des feuilles de deux populations d'*H. pallidum* cultivées à partir de leurs graines. La première population provient des déblais de mine et la deuxième d'une zone non contaminée située à proximité du site.

Les amorces de la GST tau sont définies par la recherche des régions consensus entre les GST d'une plante de la famille d'*H. pallidum*, *Caragana korchinski*, et de deux proches de la dite famille, *Medicago truncatula* et *Glycine max*. Ces régions consensus sont déterminées par l'établissement de l'arbre phylogénétique des gènes des trois plantes (**voir figure 19**) et puis l'alignement multiple des séquences.

La même étude est réalisée pour déterminer les amorces des actines.

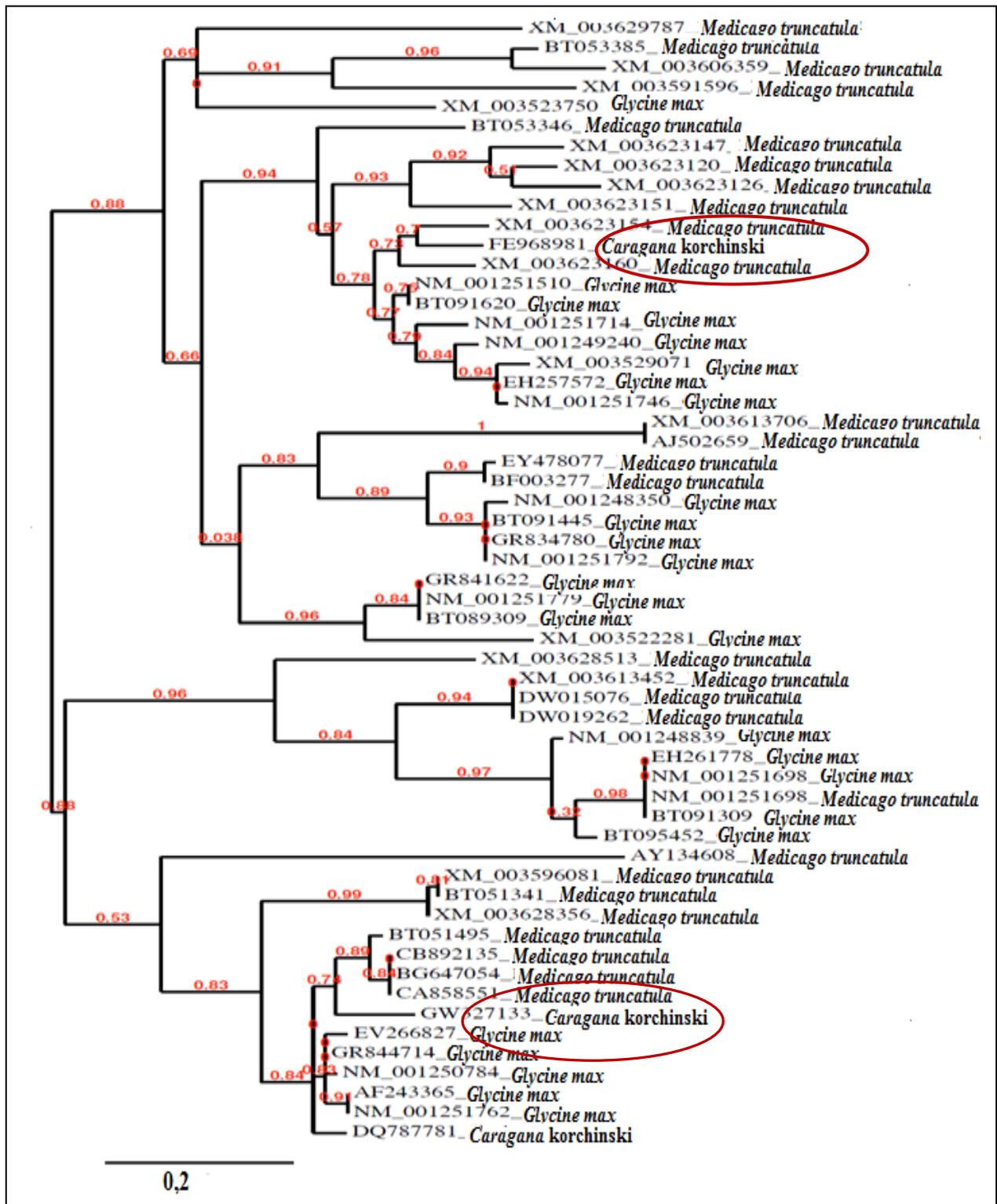


Figure 19 : arbre phylogénétique des séquences de gènes de GST tau de *Caragana korchinski*, *Medicago truncatula* et *Glycine max*. Le couple d'amorce de GSTtau1 est déterminé à partir des séquences de *Medicago truncatula* (CA958551), *Caragana korchinski* (GW327133) et *Glycine max* (EV266527), celui de GSTtau 2 est obtenu à partir des GST de deux *Medicago truncatula* (XM_003623154 et XM_003623160), *Caragana korchinski* (FE968981) et *Glycine max* (NM_001251510). L'alignement des séquences est fait par ClustalW.

La figure 19 et le tableau 3 (voir matériel et méthodes) indiquent comment les amorces sont choisies :

- pour la GST tau 1, deux couples pour amplifier une séquence courte de GST tau1 et une séquence de GSTtau1 longue ;
- pour la GST tau 2, un seul couple d'amorce.

L'établissement de l'arbre phylogénétique entre les actines des trois espèces n'ayant pas abouti à de bons résultats, ses amorces sont choisies directement à partir des séquences de deux plantes de la même famille, *Caragana korshinskii* et de *Hedysarum coronarium* (voir figure 20)

FJ485727.1 *Caragana korshinskii* actin (ACT1) mRNA, complete cds
atggcagaaagtgaagga taattcaacccctcttg tttgtgat aa tggaa ctggaatggt caa g
gctgggat ttgctgg aga t gat gca ccaagggctg t g t t c c c t a g c a t t g t g g g t e g g c c g
c g c c a c a c c g g t g t g a t g g t t g g t a t g g g a c a a a g g a t g c a t a t g t t g g t g a t g a a g c t
c a a t c c a a a a g g g g t a t t t g a c t c t g a a g t a c c c a a t t g a g c a t g g t a t a g t t a g t a a c
t g g g a t g a t a t g g a g a a g a t c t g g c a t c a c a c t t t c t a c a a t g a g c t a c g t g t g c t c c a
g a a g a a c a c c c t g t t c t t c a e g g a a g e a c c a c t e a a c c c t a a g g c t a a t c g t g a g a a
a t g a c t c a g a t t a t g t t t g a g a c c t t c a a c a c t c a g e t a t g t a t g t t g c c a t t c a g g c t
g t c c t t t c c c t t a t g c c a g t g g c e g t a c a a c t g t a t t g t g c t g g a t t c c g g t g a t g g t
g t c a g c c a c a c a g t t c c t a t c t a t g a a g g c t a t g c c c t c c a c a t g c a a t c t g c g t t t g
g a t c t o g c a g g g e g t g a t c t c a c a g a t g c c t a a t g a a a a t c t t g a c c g a g c g t g g a t a c
t c t t t c a c c c a c t a c t g c t g a g c g t g a a a t g t g a g a g a c g t a a a g g a a a a c t a g c t a c
a t a g c t c t t g a t t a t g a a c a a g a g c t a g a a a c a t c a a a g a c a a g c t c a g c t g t t g a g a a g
a g c t a t g a g c t a c c a g a t g g a c a g g t g a t c a c a a t t g g t g c c g a a a g g t t c c g t t g c c c t
g a a g t a c t c t t c a g c c a t c c a t g a t t g g t a t g g a a g e t c c t g g t a t a c a t g a a a c c a c a
t a c a a c t c t a t c a t g a a g t g t g a t g t t g a t a t t a g g a a g g a t c t c t a t g g c a a c a t t g t c
t t g a g t g g t g g t t c c a c t a t g t t c c c t g g c a t t g c t g a c a g g a t g a g c a a g g a g a t t a c t
g c a t t g g c a c c t a g t a g c a t g a a a a t t a a g g t g g t c g c a c c a c c a g a g a g g a a g t a c a g t
g t t t g g a t t g g a g g c t c c a t t t t g c a t c c c t a g e a c c t t c c a a g a g a t g t g g a t t g c a
a a a g c a g a a t a t g a t g a a t c a g g c c c t t e a a t o g t t c a c a g g a a t g e t t e a a

HO710131.1 leaves *Hedysarum coronarium* mRNA similar to beta-actin, mRNA sequence

caatgaa c t t o g t g t g g c a c c t g a g g a g c a c c a g t t e t a c t c a c c g a a g c a c c t e t t a a
c c c a a a g g c t a a t c g t g a g a a a t g a c a c a g a t t a t g t t t g a g a c t t t c a a t a c c c c t g c
c a t g t a t g t t g c a t c c a g g e t g t t e t t t c c c t e t a t g c a g t g t g t e g t a c a a c a g g t a t
t g t

Figure 20 : Séquences d'actine de *Caragana korshinskii* (FJ485727.1) et de *Hedysarum coronarium* (HO710131.1); Les couples d'amorces de l'actine choisis sont ceux qui sont en couleur. Toutes les combinaisons possibles sont faites en vue d'amplifier des séquences courtes et des séquences longues.

1.2. Test des amorces et clonage des fragments amplifiés par PCR

Les amorces définies par l'alignement des séquences nucléiques et protéiques des gènes codant la GST et l'actine ont permis l'amplification des fragments de ces gènes chez les deux populations *d'H. pallidum* (voir figure 21).

La figure 21 montre les fragments de gènes amplifiés chez les deux populations *d'H. pallidum*, ce sont :

- deux GST : le premier (GST1) avec un ADN génomique d'environ 700 pb et le deuxième (GST2) avec un ADN génomique d'environ 1000 pb.

- deux actines : une d'à peu près 1500 pb (avec le couple d'amorce Act1 long (F) et Act1 court (R) et l'autre de 200 pb (avec le couple d'amorce Act2 court (F) et Act2 long (R)).

Après purification et clonage des fragments de GST et de l'actine dans les souches bactériennes *E. coli* Dh5 α et après sélection des colonies blanches de bactéries par le test XGAL, les inserts sont vérifiés par PCR classique en utilisant les amorces universelles M13 Forward - M13 Reverse.

Les plasmides transformés contiennent les fragments de GST et d'actine avec les tailles attendues pour les deux populations *d'H. pallidum*.

Les gènes de GST (GST1 et GST2) et d'actine (Act1, Act2) sont identifiés pour la première fois chez *H. pallidum*. Le profil électrophorétique des gènes clonés n'indique pas de différence de taille entre les populations des déblais de mine et celles de la zone témoin. Les résultats seront confirmés par le séquençage des fragments clonés et le détail des séquences nucléotidiques et protéiques pour les gènes de chaque population.

2. Séquençage des fragments clonés et comparaison de séquences

Les résultats de séquençage indiquent que la stratégie choisie pour la recherche et l'amplification des gènes de l'actine et de la GST tau a conduit à cloner 3 fragments de gènes d'actine et 2 fragments de gènes de GST.

2.1. Fragments des gènes des actines

Les fragments des actines clonées sont :

- 1 fragment avec un ADN génomique de 1573pb et ADNc de 821 (Act 1) pb qui existe chez la population des déblais de mine et chez la population témoin,

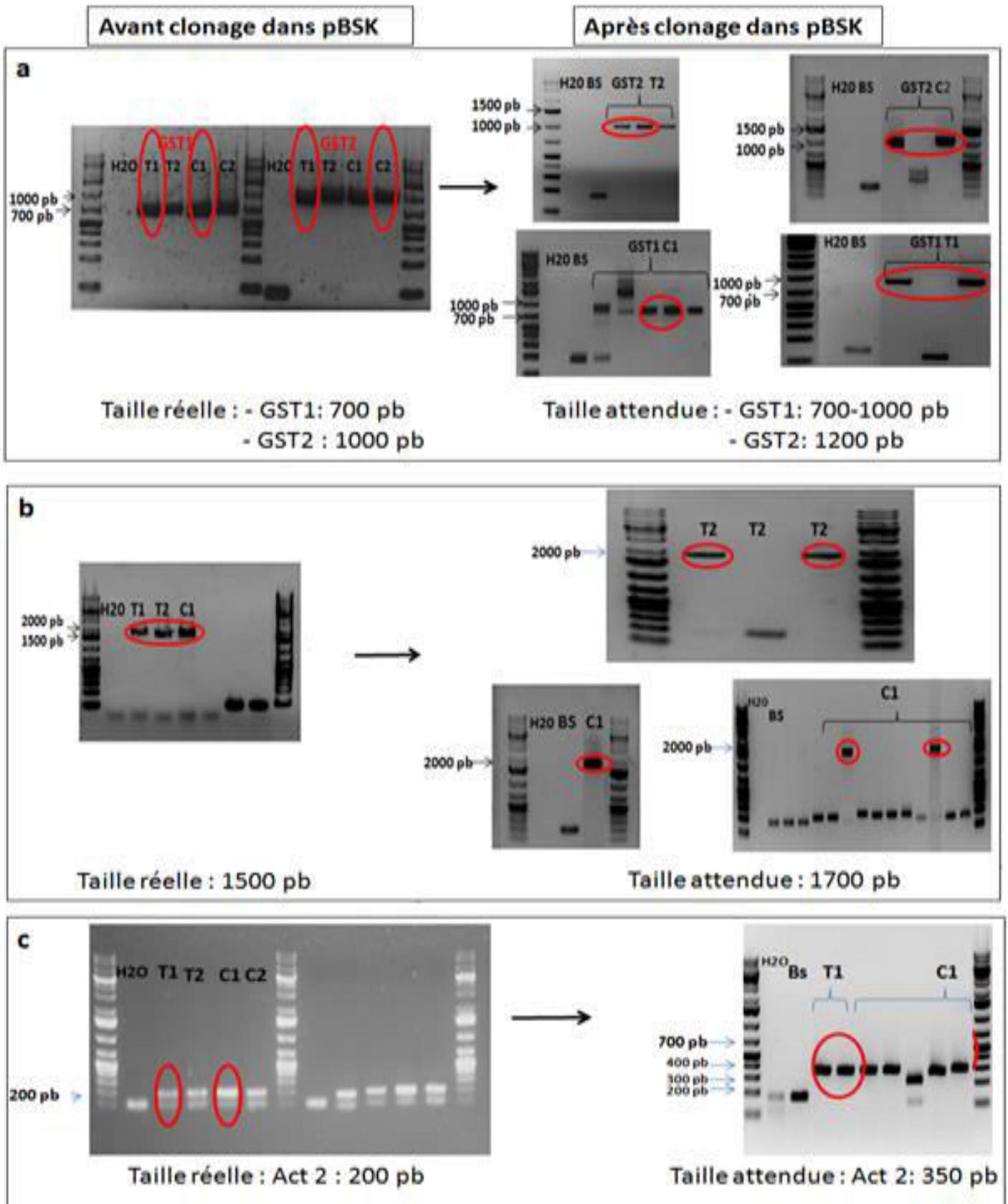


Figure 21: Séparation par électrophorèse des fragments de gènes de GST (a), d'actine 1 (b) et d'actine 2 (c) amplifiés par PCR avant et après clonage dans le plasmide pBS KS+.

A gauche : Electrophorèse des fragments des gènes obtenus par PCR chez les deux populations d'*H. pallidum* (T pour la population de la zone témoin, C pour la population de la zone des déblais de mine).

A droite : électrophorèse de contrôle après clonage dans les plasmides et leur extraction. Les PCR sont réalisées sur les plasmides extraits des colonies bactériennes transformées avec les fragments d'intérêt de GST des deux populations d'*H. pallidum* (le marqueur de taille est *GeneRuler 1 Kb Plus DNA ladder*). Les bandes entourées en rouge sont celles sélectionnées pour le clonage et pour le séquençage.

- 1 fragment avec un ADN génomique de 1312 pb et ADNc de 797 (Act 3) pb. Il ne se trouve que chez la population des déblais de mine et présente une homologie de 80% avec l'actine 1 au niveau de l'ADNc (voir l'alignement des séquences dans **la figure 22**),

- 1 fragment avec ADNc 139 pb (Act 2) qui existe chez les deux populations d'*H pallidum* (voir figure 22).

Ia

```

                10      20      30      40      50      60
Act1_SequenceAct1T  TCTTGTTTGTGATAATGGAAC TGAATGGTCAAGGCTGGATTGCTGGAGATGATGCACC
Act1_SequenceAct1C  TCTTGTTTGTGATAATGGAAC TGAATGGTCAAGGCTGGATTGCTGGAGATGATGCACC
Act3_SequenceAct3C  TCTTGTTTGTGACAATGGAAC TGAATGGTCAAGGCTGGATTGCTGGAGATGATGCACC
                    *****
                70      80      90      100     110     120
Act1_SequenceAct1T  GAGGGCTGTGTTCCCTAGCAT TGTGGGTCGACCGCGCCACACCGGTGTGATGGTTGGTAT
Act1_SequenceAct1C  GAGGGCTGTGTTCCCTAGCAT TGTGGGTCGACCGCGCCACACTGGTGTGATGGTTGGTAT
Act3_SequenceAct3C  ACGTGCTGTGTTTCCCAGCAT TGTAGGTCGTCCTCGTACACTGGTGTGATGGTTGGCAT
                    * ***** ** ***** ***** ** * ***** ***** ***** *
                130     140     150     160     170     180
Act1_SequenceAct1T  GGGACAAAAGGATGCATATG TTTGGTGTGAAGCACAATCCAAAAGGGGTATTTGACTCT
Act1_SequenceAct1C  GGGACAAAAGGATGCATATG TTTGGTGTGAAGCACAATCCAAAAGGGGTATTTGACTCT
Act3_SequenceAct3C  GGGCCAAAAGATGCATATG TTTGGTGTGAGGCTCAATCTAAGAGGGGTATCTTGACTCT
                    *** ***** ***** ***** * ***** ** ***** ***** *****
                190     200     210     220     230     240
Act1_SequenceAct1T  CAAGTACCCAATTGAGCATG GTTATAGTTAGTAAGTGGGATGATGGAGAAGATCTGGCA
Act1_SequenceAct1C  CAAGTACCCAATTGAGCATG GTTATAGTTAGTAAGTGGGATGATGGAGAAGATCTGGCA
Act3_SequenceAct3C  TAAATACCCCATTTGAACA TGGAATGTTGAGCAATGGGATGACATGGAAAGATTTGGCA
                    ** ***** ***** ***** * ***** ** ***** ***** *****
                250     260     270     280     290     300
Act1_SequenceAct1T  TCACACTTTTATAATGAGCT ACGTGTGGCTCCAGAAGAGCATCCTGTTCTTCTCACC GA
Act1_SequenceAct1C  TCACACTTTTATAATGAGCT ACGTGTGGCTCCAGAAGAGCATCCTGTTCTTCTCACC GA
Act3_SequenceAct3C  TCACACTTCTATAATGAGCT CCGTGTGCCCCAGAAGAGCACCCAGTCTGCTAACTGA
                    ***** ** ***** ***** ***** * ***** ** ***** ***** *****
                310     320     330     340     350     360
Act1_SequenceAct1T  AGCACCCTTAACCCTAAGGC TAATCGTGAGAAAATGACTCAGATTATGTTTGAGACCTT
Act1_SequenceAct1C  AGCACCCTTAACCCTAAGGC TAATCGTGAGAAAATGACTCAGATAATGTTTGAGACCTT
Act3_SequenceAct3C  GGCTCCTCTCAACCCTAAG GC TAATCGTGAGAAAGATGACCCAAATCATGTTTGAGACTTT
                    *** ** * ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****
                370     380     390     400     410     420
Act1_SequenceAct1T  CAATACTCCAGCTATGTATG TTGCTATCCAGGCTGTGCTTTCGCTTTATGCTAGTGGCCG
Act1_SequenceAct1C  CAATACTCCAGCTATGTATG TTGCTATCCAGGCTGTGCTTTCGCTTTATGCTAGTGGCCG
Act3_SequenceAct3C  TAATACCCCTGCTATGTATG TCGCCATTCAGGCTGTTCTCTACTATACGCCAGTGGTGG
                    ***** * ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****
                430     440     450     460     470     480
Act1_SequenceAct1T  TACAAC TGGTATTTGTTCTGGATTCTGGAGATGGTGTGAGCCACACAGTTCCTATCTATGA
Act1_SequenceAct1C  TACAAC TGGTATTTGTTCTGGATTCTGGAGATGGTGTGAGCCACACAGTTCCTATCTATGA
Act3_SequenceAct3C  TACAAC TGGTATTTGTTCTGGATTCTGGATGGTGTGAGCCACACAGTCCCCATCTATGA
                    ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****

```

Clonage des gènes de la GST tau et de l'actine

```

          490      500      510      520      530      540
          |        |        |        |        |        |
Act1_SquenceAct1T  AGGCTATGCTCTCCC-CATGCAATCCTGCGATTGGATCTTGCAGGGCGTGATCTAACAGA
Act1_SquenceAct1C  AGGCTATGCTCTCCCACATGCAATCCTGCGATTGGATCTTGCAGGGCGTGATCTAACAGA
Act3_SquenceAct3C  GGGTTATGCTCTGCCACATGCCATCCTTCGTCCTTGATCTTGCCTGGTCGTGACCTCACCGA
                    ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
          550      560      570      580      590      600
          |        |        |        |        |        |
Act1_SquenceAct1T  CGCCCTCATGAAAATCTTGACCGAGCGTGGCTACTCTTTTACCCTACCCTGAGCGGGA
Act1_SquenceAct1C  CGCCCTCATGAAAATCTTGACCGAGCGTGGCTACTCTTTTACCCTACCCTGAGCGGGA
Act3_SquenceAct3C  TTTCTTGATGAAAATTTGACTGAGCGTGGTTATTCATTTACCCTCAGCAGAGCGGGA
                    * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
          610      620      630      640      650      660
          |        |        |        |        |        |
Act1_SquenceAct1T  AATTGTTTCGAGATGTGAAGGAAAACTAGCCTACATTGCTCTTGATTATGAACAAGAGAT
Act1_SquenceAct1C  AATTGTTTCGAGATGTGAAGGAAAACTAGCCTACATTGCTCTTGATTATGAACAAGAGAT
Act3_SquenceAct3C  AATTGTTGAGGATGTGAAGGAAAACTAGCCTACATTGCTCTTGATTATGAACAAGAGAT
                    ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
          670      680      690      700      710      720
          |        |        |        |        |        |
Act1_SquenceAct1T  GGAAACTTCAAAGACAAGTTCAGCTGTGAGAAGAGCTATGAGCTACCTGATGGACAGGT
Act1_SquenceAct1C  GGAAACTTCAAAGACAAGTTCAGCTGTGAGAAGAGCTATGAGCTACCTGATGGACAGGT
Act3_SquenceAct3C  GGAGACAGCCAGGACTAGCTCCTCTGTGGAGAAGAGCTACGAATTGCCTGATGGACAGGT
                    *** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
          730      740      750      760      770      780
          |        |        |        |        |        |
Act1_SquenceAct1T  GATCACAAATAGGCGCTGAAAGGTTCCGCTGTCCCTGAAGTACTCTCCAGCCATCCATGAT
Act1_SquenceAct1C  GATCACAAATAGGCGCTGAAAGGTTCCGCTGTCCCTGAAGTACTCTCCAGCCATCCATGAT
Act3_SquenceAct3C  TATCACTATAGGCGATGAGCGTTTCAGATGTCCAGAGGTCCTGTACCAACCATCCATGAT
                    ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
          790      800      810      820
          |        |        |        |
Act1_SquenceAct1T  TGAATGGAAGCTCCTGGAATACATGAAACCACATACAAC
Act1_SquenceAct1C  TGAATGGAAGCTCCTGGAATACATGAAACCACATACAAC
Act3_SquenceAct3C  AGGAATGGAAGCAGCAG-----
                    ***** * * * * *

```

Ib

```

          10      20      30      40      50      60
          |        |        |        |        |        |
Act1_SquenceAct1T  LVCDNGTGMVKAGFAGDDAPRAVFPFIVGRPRHTGVMVGMGQKDAYVGDDEAQSQRGILTL
Act1_SquenceAct1C  LVCDNGTGMVKAGFAGDDAPRAVFPFIVGRPRHTGVMVGMGQKDAYVGDDEAQSQRGILTL
Act3_SquenceAct1C  LVCDNGTGMVKAGFAGDDAPRAVFPFIVGRPRHTGVMVGMGQKDAYVGDDEAQSQRGILTL
                    ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
          70      80      90      100     110     120
          |        |        |        |        |        |
Act1_SquenceAct1T  KYPIEHGIVSNWDDMEKIWHHTFYNELRVAPPEHPVLLTEAPLNPKANREKMTQIMFETF
Act1_SquenceAct1C  KYPIEHGIVSNWDDMEKIWHHTFYNELRVAPPEHPVLLTEAPLNPKANREKMTQIMFETF
Act3_SquenceAct1C  KYPIEHGIVSNWDDMEKIWHHTFYNELRVAPPEHPVLLTEAPLNPKANREKMTQIMFETF
                    ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
          130     140     150     160     170     180
          |        |        |        |        |        |
Act1_SquenceAct1T  NTPAMYVAIQAVLSLYASGRTTGIVLDSGDGVSHTVPIYEGYALPHAILRDLAGRDLTD
Act1_SquenceAct1C  NTPAMYVAIQAVLSLYASGRTTGIVLDSGDGVSHTVPIYEGYALPHAILRDLAGRDLTD
Act3_SquenceAct1C  NTPAMYVAIQAVLSLYASGRTTGIVLDSGDGVSHTVPIYEGYALPHAILRDLAGRDLTD
                    ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
          190     200     210     220     230     240
          |        |        |        |        |        |
Act1_SquenceAct1T  ALMKILTERGYSFTTTAEREIVRDVKEKLAYIALDYEQEMETSKTSSAVEKSYELPDGQV
Act1_SquenceAct1C  ALMKILTERGYSFTTTAEREIVRDVKEKLAYIALDYEQEMETSKTSSAVEKSYELPDGQV
Act3_SquenceAct1C  FLMKILTERGYSFTTSAEREIVRDVKEKLAYIALDYEQELARTSSVEKSYELPDGQV
                    ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

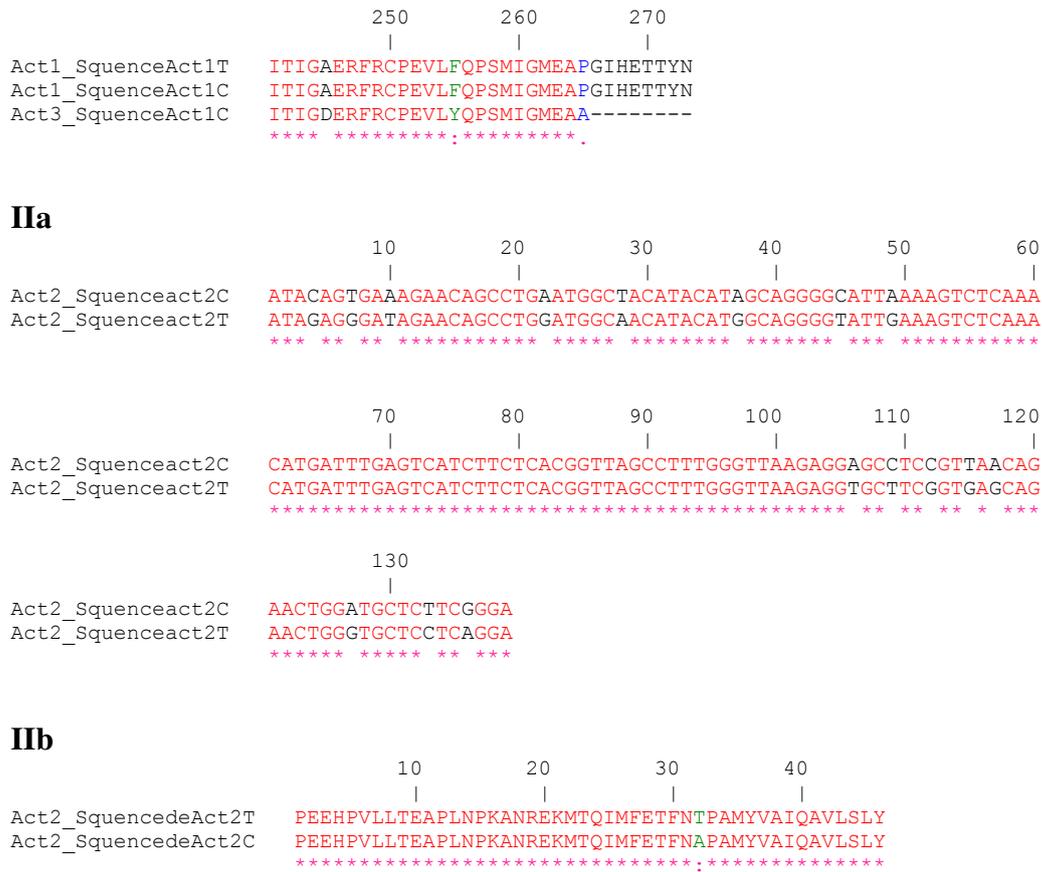


Figure 22 : Alignement des séquences **Ia** : nucléiques, **Ib** : protéiques des fragments de gènes de l'actine 1 et 3 ; **IIa** : nucléiques, **IIb** : protéiques des fragments de gènes de l'actine 2 des feuilles des deux populations d'*H pallidum* (**C** population des déblais de mine ; **T** population de la zone non contaminée ; * acides nucléiques ou aminés identiques dans toutes les séquences ; -insertion ou délétion ; : substitution conservative)

Les clones de l'actine 1 partagent une homologie entre la population témoin (Act1T) et la population des déblais de mine (Act1C) de 89% au niveau des nucléotides et de 100% au niveau des protéines. Quand à l'actine 3, le gène ne se trouve que dans la population des déblais de mine et présente une homologie de 88% avec les actines 1 au niveau nucléotidique et de 93% au niveau des protéines ; les acides aminés qui diffèrent sont : A181F, T196S, M220L, S223A, K224 R, A228S, A245D, F255Y et P265A (voir figure 22).

Pour les actines 2, les deux populations partagent une homologie de 88% au niveau des nucléotides et de 98% au niveau des protéines. La différence au niveau protéique existe par rapport à un seul acide aminé en position 32 dans l'alignement : T dans l'act2T remplacé par A dans l'act2C.

2.2. fragments des gènes de la GST clonés

Pour la GST, les 2 fragments de gènes clonés se retrouvent chez les deux populations.

- 1 fragment avec ADN génomique de 535 pb et ADNc de 336 pb (GST1) qui code pour 112 acides aminés.

- 1 fragment avec ADN génomique de 818 pb et ADNc de 348 pb (GST2) qui code pour 116 acides aminés (voir figure 23).

Ia

```

          10      20      30      40      50      60
          |      |      |      |      |      |
GST1_SquenceGST1T1  TTTGGTATGAGGCTTAGGATAGCCTTAGCTGAAAAGGGTGTCAAGTATGAGTCCAAAGAA
GST1_SquenceGST1C1  TTTGGTATGAGGCTTAGGATAGCCTTAGCTGAAAAGGGTGTCAAGTATGAGTCCAGAGAA
                      *****

          70      80      90      100     110     120
          |      |      |      |      |      |
GST1_SquenceGST1T1  GAAGACTTGTGGAACAAGAGCCCCTTGTACTACAAATGAACCCGGTTCACAAGAAAATC
GST1_SquenceGST1C1  GAAGACTTGTGGAACAAGAGCCCCTTGTACTACAAATGAACCCGGTTCACAAGAAAATC
                      *****

          130     140     150     160     170     180
          |      |      |      |      |      |
GST1_SquenceGST1T1  CCTGTCTCATCCATAATGAAAACCGGTTCTGAATCTCTTATTGCCTTTCAGTATATT
GST1_SquenceGST1C1  CCTGTCTCATCCATAATGAAAACCGGTTCTGAATCTCTTATTGCCTTTCAGTATATT
                      *****

          190     200     210     220     230     240
          |      |      |      |      |      |
GST1_SquenceGST1T1  GATGAGGTTTGAATGATAAATATCCCTTGTGCTTCTGATCCTTATCAAAGATCACAG
GST1_SquenceGST1C1  GATGAGGTTTGAATGATAAATATCCCTTGTGCTTCTGATCCTTATCAAAGATCACAG
                      *****

          250     260     270     280     290     300
          |      |      |      |      |      |
GST1_SquenceGST1T1  GCTAGATTCTGGGCTGATTTTGTGATAAGAAGATATGAAATTGAAAGACCCTTTGG
GST1_SquenceGST1C1  GCTAGATTCTGGGCCGATTTTGTGATAAGAAGATATGAAATTGAAAGACCCTTTGG
                      *****

          310     320     330
          |      |      |
GST1_SquenceGST1T1  ACCAAAAAGGAGAAGAACATGAGGCTGCCAGGAAG
GST1_SquenceGST1C1  ACCAAAAAGGAGAAGAACATGAGGCTGCCAGGAAG
                      *****
    
```

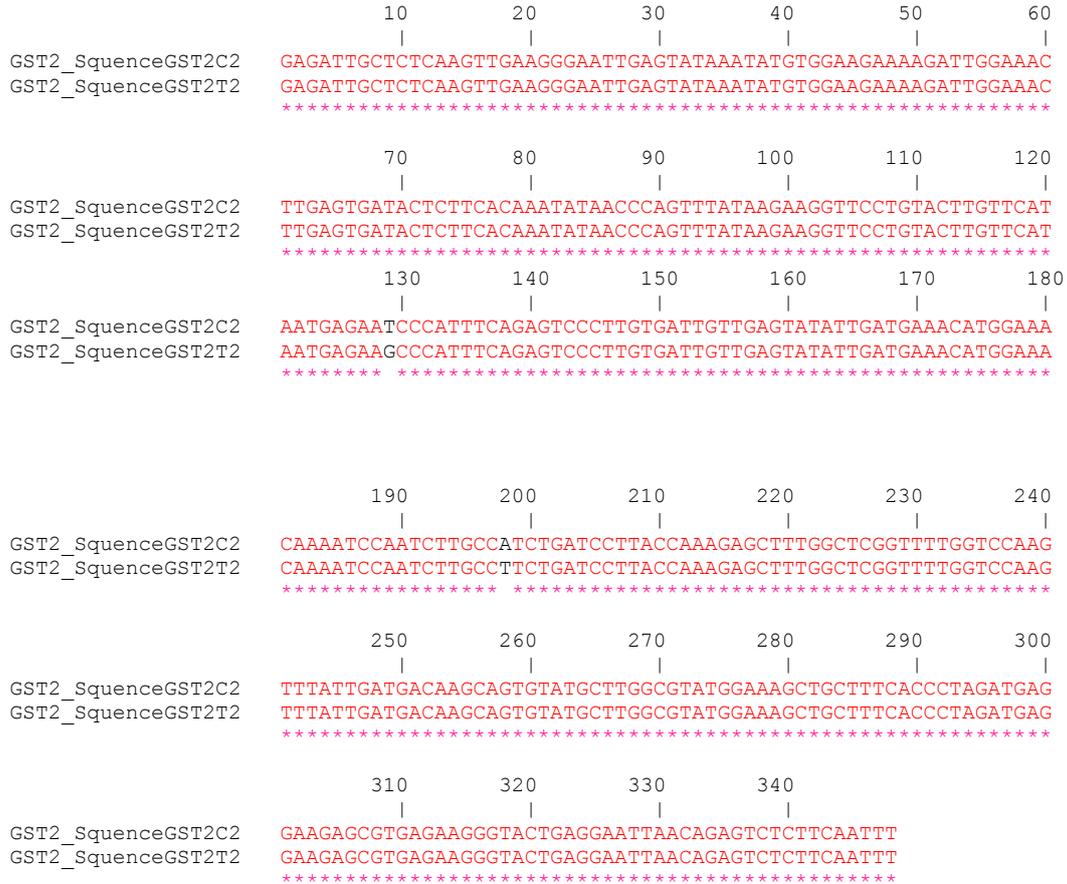
Ib

```

          10      20      30      40      50      60
          |      |      |      |      |      |
GST1_SquenceGST1T1  FGMRLRIALAEKGVKYESKEEDLWNKSPLLLQMNVPVHKKIPVLIHNGKVPESLIALQYI
GST1_SquenceGST1C1  FGMRLRIALAEKGVKYESKEEDLWNKSPLLLQMNVPVHKKIPVLIHNGKVPESLIALQYI
                      *****

          70      80      90      100     110
          |      |      |      |      |
GST1_SquenceGST1T1  DEVWNDKYPLLSPDPYQRSQARFWADFVDKKIYEIGKTLWTKKGEHEAARK
GST1_SquenceGST1C1  DEVWNDKYPLLSPDPYQRSQARFWADFVDKKIYEIGKTLWTKKGEHEAARK
                      *****
    
```

IIa



IIb

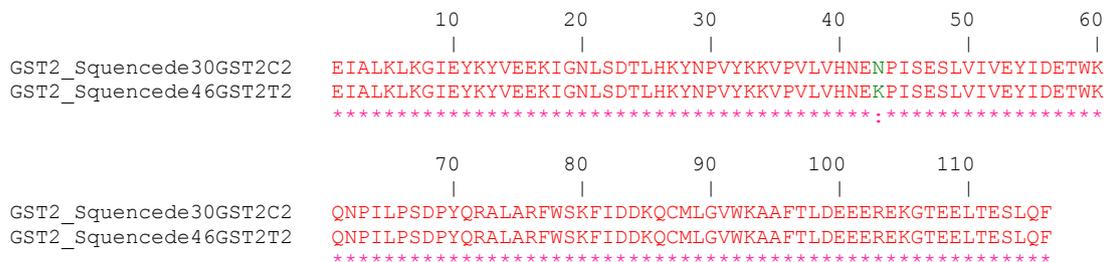


Figure 23 : Alignement des séquences des gènes des GST tau des feuilles des deux populations d'*H pallidum* **Ia** : nucléiques tau1, **Ib** : protéiques tau1; **IIa** : nucléiques tau2 , **IIb** : protéiques tau2 (C population des déblais de mine ; T population de la zone non contaminée ; * acides nucléiques ou aminés identiques dans toutes les séquences ; - insertion ou délétion ; ; substitution conservative)

La figure 23 indique que les deux séquences clonées de la GST ne diffèrent entre les deux populations que par un seul acide nucléique au niveau de l'ADNc et un seul acide aminé pour les protéines. Pour la GST1, il s'agit de K19R et pour la GST2 de N43K. Ces différences, dans les GST, entre les deux populations pourront induire des variations dans leurs activités catalytiques face aux différents types de stress (McGonigle et al., 2000).

3. Comparaison des séquences clonées avec celles des autres Fabaceae

La comparaison des séquences de GST et des actines clonées avec les GSTtau et les actines des autres Fabaceae sont résumées dans le **tableau 8**. Elle révèle une grande identité au niveau des acides nucléiques et des acides aminés. Les pourcentages d'identité les plus élevées sont obtenus avec les espèces suivantes :

- Les GSTtau de *Caragana korshinskii*, *Glycine max*, *Cicer arietinum*, *Trifolium repens*, avec des identités différentes entre GSTtau1 et GSTtau2 (**voir tableau 8**)

- Les actines de *Medicago truncatula*, *Phaseolus vulgaris*, *Cicer arietinum*, *Glycine max*, *Caragana korshinskii* et *Arachis hypogaea*. Les valeurs d'identité sont très élevées mais elles varient d'un gène à l'autre (**voir tableau 8 et figure 24**).

Toutes les plantes suscitées sont des légumineuses et appartiennent à la famille des papilionacées ; elles sont connues pour leur résistance au stress biotique et abiotique, elles sont donc capables de pousser dans les sols pollués et d'accumuler les métaux dans leurs deux parties (Bidar et al., 2007; Conesa et al., 2009; Smeets et al., 2005). Nos résultats montrent que ces espèces sont les plus proches de *H. pallidum* et les alignements multiples des séquences protéiques de *GST tau* de ces espèces renforcent ces résultats

Tableau 8: Pourcentage d'identité entre les séquences protéiques de GST tau et d'actine d'*H. pallidum* et des autres Fabaceae

Gène	% d'identité entre les gènes des deux populations		Ressemblance des séquences avec les gènes des autres Fabacées		
	Nucleotides	protéines	Espèces	% d'identité Pour chaque population	
				T1	C1
Actine 2	88	98	- actin homolog [Phaseolus vulgaris] BAB62532.1 - actin [Arachis hypogaea] ACH81987.1 - actin [Phaseolus acutifolius] AAQ16310.1 - Actin [Medicago truncatula] AFK41203.1 - Actin [Glycine max] XP_003593122.1	100 98 100 100 98	99 100 98 98 98
Actine 1	99	100	- actin [Caragana korshinskii] ACK87035.1 - PREDICTED: actin-like [Cicer arietinum] XP_004497894.1 - Actin [Medicago truncatula] XP_003622019.1 - actin-11-like [Glycine max] NP_001276160.1 - actin-3-like protein [Phaseolus vulgaris] AGV54465.1	100 100 99 99 98	99 99 97 98 97
Actine 3			- Actin [Medicago truncatula] XP_003622019.1 - actin [Phaseolus acutifolius] AAQ16310.1 - PREDICTED: actin-like [Cicer arietinum] XP_004489182.1 - actin [Glycine max] AAB40082.1 - actin 7 [Caragana korshinskii] AGI78241.1		99 99 97 97 96
GST1	99	99	- glutathione S-transferase [Caragana korshinskii] ABG90381.2 - glutathione S-transferase 2 [Glycine max] AAR26529.1 - PREDICTED: probable glutathione S-transferase-like [Cicer arietinum] XP_004488707.1 - glutathion-S-transferase a [Trifolium repens] AFV96162.1	86 80 81 87	85 79 82 86
GST 2	99	99	- Glutathione S-transferase GST [Medicago truncatula] XP_003623195.1 - glutathione S-transferase GST 11 Glycine max - NP_001237670.1 - PREDICTED: probable glutathione S-transferase-like [Cicer arietinum] XP_004492380.1 - glutathione transferase [Phaseolus vulgaris] AGV54744.1	84 78 81 75	82 77 80 73

4. Structure des gènes de GST

Les gènes codant la GST tau ont été identifiés et largement étudiés chez d'autres végétaux, comme le maïs et *Glycine max* (McGonigle et al., 2000), *Citrus sinensis* L. (Lo Piero et al., 2009), *Oryza sativa* (Yang et al., 2009) et le riz (Zhang et al., 2013).

La plupart des GST cytosoliques sont actives sous forme de dimères, soit homo-ou hétérodimères avec des sous-unités allant de 23 à 30 kDa. Les études par cristallographie aux rayons X ont montré l'existence d'une topologie en trois dimensions similaires dans toutes les isoenzymes de GST malgré une identité globale de séquence faible (Edwards et al., 2000). Chaque sous-unité de l'ensemble des structures connues de la GST présente un pli à deux

domaines consistant en un domaine N-terminal conservé qui contient le site de liaison au GSH (site G) et un domaine C-terminal plus divergent qui est censé répondre à une diversité de composés hydrophobes (*the co-substrate binding domain* ou bien H-site) (Edwards et al., 2000; Zeng and Wang, 2006) (voir **figure 25**).

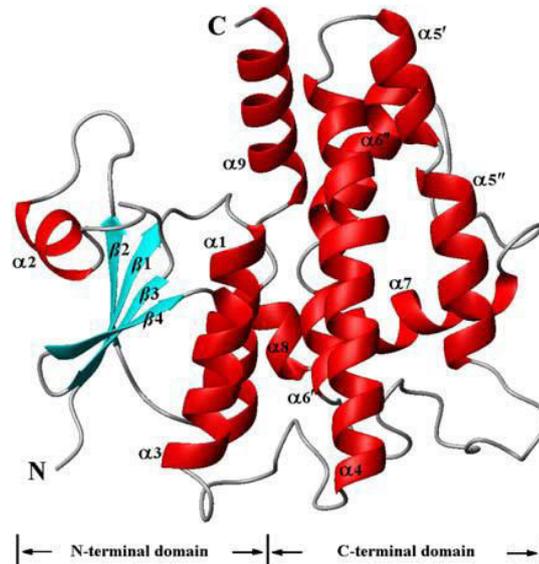


Figure 25 : Structure tridimensionnelle de PtGSTU2. Les hélices alpha et les brins sont représentés comme des hélices rouges et des flèches bleues, respectivement. N: N-terminale; C: C-terminale (Zeng and Wang, 2006).

4.1. Domaine N-terminal (site G)

Les isoenzymes, ou les différentes classes de GST, se distinguent entre elles par leurs régions conservées surtout au niveau de leur domaine G. Pour distinguer les GST appartenant à la classe tau de celles des autres classes, l'étude de McGonigle et al., (2000) faite sur toutes les séquences de GST tau connues pour *Glycine max* et le maïs a révélé la présence de 4 acides aminés consensus qui doivent être impérativement présents dans toutes les GST tau. Effectivement, les 4 acides aminés S16, R21, E69 et S70 sont présents chez les GST tau de *H. pallidum*. Ces acides aminés contribuent à l'activité catalytique de l'enzyme car le remplacement du résidu Ser16 dans la GSTU1 par la glycine montre une très faible activité de réaction de conjugaison du glutathion avec le CDNB (Kilili et al., 2004).

Des acides aminés conservés se retrouvent également chez d'autres plantes. Ainsi, l'alignement multiple de 35 GST tau chez *Triticum aestivum*, *Zea mays*, *Cucurbita maxima*, *Glycine max*, ... a montré la présence de trois acides aminés, N51, P52 et P58 (Zeng and Wang, 2006). La modélisation des structures des GST tau a montré que N51, P58 et les deux résidus suivants forment une structure en boucle qui joue un rôle important dans la

reconnaissance et l'orientation de GSH au site G. La P58 contribue au repliement des structures du G-site (Dirr et al., 1994; Zeng and Wang, 2006).

Cependant la comparaison entre la GST1 et GST2 a fait ressortir des différences au niveau des régions considérées comme conservées selon l'étude de Droog (1997). Ce sont les deux triplets d'acides aminés HKK et HNG. Nos résultats indiquent qu'ils sont présents dans la GST tau1 seulement. Dans la GST tau 2, H du triplet HKK est remplacé par Y et G du triplet HNG est remplacé par E. Ce résultat est observé pour la GST tau de *Glycine max* (**figure 24**) comme chez le soja (*Gm-HSP26A*) pour le triplet HNG où G est remplacé par E (Droog, 1997).

4.2. Domaine C-terminal (site H)

Le domaine C-terminal est beaucoup plus variable par rapport au domaine N. La diversité dans la séquence (et donc dans la structure) contribue à une grande variété dans la reconnaissance du substrat entre les GST tau mais aussi à une large protection des plantes face au stress (Armstrong, 1997; Thom et al., 2002).

Cependant il existe des acides aminés conservés entre les domaines C-terminaux de la plupart des GST tau analysées. Citons par exemple Y93, Q94, R95, A98, R99, F100, W101, D106, K108, E125 et E127 (Thom et al., 2002; Zeng and Wang, 2006). A partir de ce dernier acide aminé, les séquences présentent une variabilité entre leurs acides aminés (voir **figure 22 et 24**). Selon les études précédentes, FW (en position 100 et 101 respectivement) forme des interactions hydrophobiques avec V54 et le K56 du domaine N terminal. K108, E125 et E127 ont également un rôle important dans le maintien de la structure du dimère (Thom et al., 2002; Zeng and Wang, 2006).

Conclusion

Cette partie a permis le clonage et le séquençage de trois fragments d'actine et de deux fragments de GST tau pour la première fois chez deux populations d'*H. pallidum*. Les gènes de l'actine 1 et 2 et GST tau1 et GST tau2 existent chez les deux populations, alors que l'actine 3 n'existe que chez la population des déblais de mine. Les fragments de l'Actine 1, Actine 3 et GST1, GST2 sont publiés dans GenBank (JX840486.1, JX840487.1, JX840484.1, JX840485)

L'alignement des deux GST indique un pourcentage d'identité de 53% au niveau nucléotidique et 46% au niveau protéique. Les régions clonées pour les deux GST sont la majeure partie du domaine G ainsi que la partie reliant le domaine G et H et enfin une partie

du domaine H. Cependant, pour la même GST, les deux populations ont une identité de 99% au niveau des nucléotides et des protéines.

CONCLUSION

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

Les mines d'antimoine sont l'une des sources de ces contaminations. Elles sont responsables des niveaux très élevés en Sb et en As dans les sols qui entourent les déblais, ce qui aboutit à des modifications de la végétation spontanée et à la survie d'un certain nombre d'espèces de plantes résistantes, exemples : *H. pallidum* et *L. spartum*. L'hypothèse qui explique cette résistance est que des concentrations élevées en Sb et en As induisent le stress oxydatif ainsi qu'une réponse antioxydante. Dans cette optique, l'étude de l'effet de ces deux métalloïdes a été réalisée dans une mine d'antimoine abandonnée afin de comprendre les mécanismes de résistance de ces plantes.

Les expériences ont montré une grande tolérance des deux plantes *H. pallidum* et *L. spartum* à Sb et As ; ces espèces arrivent à survivre à la présence de fortes concentrations de Sb et As présents dans le sol. L'accumulation de ces deux métalloïdes dans les différentes parties des plantes indiquent une tendance à exclure Sb et As des parties aériennes de *L. spartum* et à les accumuler par celles de *H. pallidum*.

A l'origine de cette tolérance élevée, les deux plantes prennent en charge les ROS produits en présence de Sb et d'As par activation de leur système de défense antioxydant. Cela permet de diminuer leur stress oxydatif. L'étude de la peroxydation lipidique et des activités enzymatiques met en évidence des différences significatives dans la réponse au stress oxydatif induit par l'antimoine et l'arsenic dans le sol entre les deux espèces, *H. pallidum* et *L. spartum*. Le niveau élevé du MDA constaté dans les deux parties de *H. pallidum* indique un degré élevé de stress oxydatif dans cette plante par rapport à *L. spartum*. Cela peut être dû au fait que *L. spartum* accumule moins de Sb et d'As dans ses tissus que *H. pallidum* et produit plusieurs enzymes antioxydantes pour réduire le stress oxydatif. En effet, hormis la SOD, les activités de la CAT, l'APX et la GST sont dans l'ensemble plus fortes dans *L. spartum* que dans *H. pallidum*. C'est particulièrement le cas pour la POD, l'enzyme responsable de la dégradation des peroxydes lipidiques. Cela permet de déduire que *L. spartum* a mis au point un meilleur système de défense antioxydant par rapport à *H. pallidum*.

Les résultats des activités enzymatiques sont comparables avec ceux trouvés sur milieu expérimental en présence d'autres métaux et avec d'autres espèces mais il reste que chaque

plante et chaque partie de la plante ont leur système de défense. Pour les deux espèces, l'APX et la GST sont globalement plus actives dans les parties supérieures que dans les racines, alors que c'est l'inverse pour la SOD et la CAT. La POD est plus active dans les parties supérieures que dans les racines de *L. spartum* et l'inverse s'applique à la *H. pallidum*. Cependant, ces différences varient selon les zones.

Il ressort que les deux espèces s'adaptent bien à des concentrations élevées en métalloïdes mais de manière différente. Leur système antioxydant est activé différemment, quantitativement et qualitativement, dans leurs deux parties. Dans les racines et les parties aériennes de *H pallidum*, les activités de la SOD, l'APX et la GST sont maximales dans la zone la plus polluée. L'inhibition de l'activité de la catalase dans les racines de *H pallidum* est concomitante avec l'induction de l'activité de la POD dans le même tissu, ce qui montre que ces deux enzymes sont régulées différemment. En outre, la SOD et l'APX de la même espèce, montrent, en général, des activités simultanées qui peuvent être dues à leur co-régulation.

Dans *L. spartum*, la CAT et la GST sont à leur maximum d'activité dans la zone 5. Cependant la SOD et la POD répondent de la même manière et s'inhibent à de fortes concentrations en métalloïdes dans le sol. Dans les parties aériennes de cette plante, l'APX et la CAT réagissent de façon similaire ; leurs activités augmentent face à de fortes concentrations de Sb et d'As dans les sols (zone 5) et ce, contrairement à celles de la POD et de la SOD qui baissent dans la même zone. Ainsi, il semble que les voies APX/CAT et SOD/POD sont deux systèmes complémentaires dans le balayage des ROS dans *L. spartum*.

La concentration de MDA dans les deux plantes présente une relation linéaire avec les concentrations en métalloïdes dans le sol, ce qui permet d'affirmer qu'il peut être utilisé en tant que biomarqueur de la pollution du sol par l'antimoine et l'arsenic chez les deux espèces.

Les variations des activités de la GST et de la CAT sont dues soit à leur régulation, soit à une surexpression de certains isoformes de ces enzymes en réponse à de concentrations élevées en métalloïdes. Ces hypothèses sont vérifiées par l'analyse moléculaire des gènes de deux populations d'*H pallidum*, l'une issue des déblais de mine et l'autre d'une zone non contaminée. Celui-ci a permis, pour la première fois, le clonage de deux gènes d'une classe d'isoenzymes de la GST (tau) et de trois gènes de l'actine.

Les 2 fragments de GST tau contiennent la majeure partie du domaine N-terminal ainsi que la partie reliant le domaine G et H et enfin une partie du domaine C-terminal. Le domaine N-terminal (ou site G) est le domaine de liaison au glutathion. Il est plus conservé que le

domaine C-terminal (ou site H) qui varie entre les différentes GST. La grande diversité au niveau du domaine C-terminal détermine la spécificité et la sélectivité de substrats pour chaque GST tau.

Chez les deux populations d'*H pallidum*, les deux gènes de GST ont une identité de séquences de 43% au niveau nucléotidique et de 53% au niveau protéique. Par contre, il n'y a pas de grande différence entre les deux populations pour la même séquence de GST. Pour la GST tau1, les deux populations présentent une identité de séquences de 99% au niveau nucléotidique et protéique, même cas pour la GST tau2. Cependant, ces différences peuvent induire des variations dans les activités catalytiques chez les deux populations, face à différents types de stress. Par exemple, l'arginine qui est connue pour son rôle dans le bon repliement des protéines et dans la solubilisation des protéines en agrégation, est remplacée par la lysine dans la population témoin.

Dans le but de comprendre la spécificité des GST aux substrats, il est nécessaire de poursuivre l'étude par un séquençage complet des gènes de la GST puis par l'utilisation des techniques spécifiques de la biologie moléculaire, telles que la mutagenèse dirigée. Cela permettra d'analyser les effets des mutations sur l'expression des gènes et sur le fonctionnement de la protéine qui en résulte, en présence du stress métallique.

**RÉFÉRENCES
BIBLIOGRAPHIQUES**

- Adamis, P.D., Gomes, D.S., Pinto, M.L.C., Panek, A.D., Eleutherio, E.C., 2004. The role of glutathione transferases in cadmium stress. *Toxicol. Lett.* 154, 81–88.
- Adriano, D.C., 2001. Trace elements in terrestrial environments: biogeochemistry, bioavailability, and risks of metals. Springer.
- AIEA, I.A.E., 1994. Handbook of Parameter Values for the Prediction of Radionuclide Transfer in Temperate Environments. International Atomic Energy Agency.
- Alkorta, I., Hernández-Allica, J., Becerril, J.M., Amezaga, I., Albizu, I., Garbisu, C., 2004. Recent findings on the phytoremediation of soils contaminated with environmentally toxic heavy metals and metalloids such as zinc, cadmium, lead, and arsenic. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 3, 71–90.
- Alloway, B.J., Alloway, B.J., 1995. Heavy metals in soils.
- Alscher, R.G., Erturk, N., Heath, L.S., 2002. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *J. Exp. Bot.* 53, 1331–1341.
- Alvarez, M.E., Lamb, C., 1997. Oxidative burst-mediated defense responses in plant disease resistance. *Cold Spring Harb. Monogr. Arch.* 34, 815–839.
- Alvarez Rogel, J., Ortiz Silla, R., Alcaraz Ariza, F., 2001. Edaphic characterization and soil ionic composition influencing plant zonation in a semiarid Mediterranean salt marsh. *Geoderma* 99, 81–98.
- Anjum, N.A., Ahmad, I., Mohmood, I., Pacheco, M., Duarte, A.C., Pereira, E., Umar, S., Ahmad, A., Khan, N.A., Iqbal, M., 2012. Modulation of glutathione and its related enzymes in plants' responses to toxic metals and metalloids—a review. *Environ. Exp. Bot.* 75, 307–324.
- Araya, M.T., Siah, A., Mateo, D., Markham, F., McKenna, P., Johnson, G., Berthe, F.C.J., 2008. Selection and evaluation of housekeeping genes for haemocytes of soft-shell clams (*Mya arenaria*) challenged with *Vibrio splendidus*. *J. Invertebr. Pathol.* 99, 326–331.
- Arora, A., Sairam, R.K., Srivastava, G.C., 2002. Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Curr. Sci.-Bangalore-* 82, 1227–1238.
- Asada, K., 1992. Ascorbate peroxidase—a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. *Physiol. Plant.* 85, 235–241.
- Asher, C.J., Reay, P.F., 1979. Arsenic uptake by barley seedlings. *Funct. Plant Biol.* 6, 459–466.
- Ashraf, M., 2009. Biotechnological approach of improving plant salt tolerance using antioxidants as markers. *Biotechnol. Adv.* 27, 84–93.
- Assche, F.V., Clijsters, H., 1990. Effects of metals on enzyme activity in plants. *Plant Cell Environ.* 13, 195–206.
- Axarli, I., Rigden, D., Labrou, N., 2004. Characterization of the ligandin site of maize glutathione S-transferase I. *Biochem J* 382, 885–893.
- Azcón, R., Perálvarez, M. del C., Biró, B., Roldán, A., Ruíz-Lozano, J.M., 2009. Antioxidant activities and metal acquisition in mycorrhizal plants growing in a heavy-metal multicontaminated soil amended with treated lignocellulosic agrowaste. *Appl. Soil Ecol.* 41, 168–177.
- Azevedo, R.A., Alas, R.M., Smith, R.J., Lea, P.J., 1998. Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild-type and a catalase-deficient mutant of barley. *Physiol. Plant.* 104, 280–292.
- Azpilicueta, C.E., Benavides, M.P., Tomaro, M.L., Gallego, S.M., 2007. Mechanism of CATA3 induction by cadmium in sunflower leaves. *Plant Physiol. Biochem.* 45, 589–595.

- Baker, A.J.M., 1981. Accumulators and excluders-strategies in the response of plants to heavy metals. *J. Plant Nutr.* 3, 643–654.
- Ballatori, N., Krance, S.M., Notenboom, S., Shi, S., Tieu, K., Hammond, C.L., 2009. Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases. *Biol. Chem.* 390, 191–214.
- Baroni, F., Boscagli, A., Protano, G., Riccobono, F., 2000. Antimony accumulation in *Achillea ageratum* *Plantago lanceolata* and *Silene vulgaris* growing in an old Sb-mining area. *Environ. Pollut.* 109, 347–352.
- Bashan, N., Kovsky, J., Kachko, I., Ovidia, H., Rudich, A., 2009. Positive and negative regulation of insulin signaling by reactive oxygen and nitrogen species. *Physiol. Rev.* 89, 27–71.
- Benhamdi, A., Bentellis, A., Rached, O., Du Laing, G., Mechakra, A., 2014. Effects of Antimony and Arsenic on Antioxidant Enzyme Activities of Two Steppic Plant Species in an Old Antimony Mining Area. *Biol. Trace Elem. Res.* 158, 96–104.
- Bergendi, L., Beneš, L., Ďuračková, Z., Ferenčík, M., 1999. Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life Sci.* 65, 1865–1874.
- Bittsánszky, A., Kömives, T., Gullner, G., Gyulai, G., Kiss, J., Heszky, L., Radimsky, L., Rennenberg, H., 2005. Ability of transgenic poplars with elevated glutathione content to tolerate zinc (2+) stress. *Environ. Int.* 31, 251–254.
- Boisson, J., Mench, M., Vangronsveld, J., Ruttens, A., Kopponen, P., De Koe, T., 1999. Immobilization of trace metals and arsenic by different soil additives: evaluation by means of chemical extractions. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 30, 365–387.
- Bothe, J.V., Brown, P.W., 1999. Arsenic immobilization by calcium arsenate formation. *Environ. Sci. Technol.* 33, 3806–3811.
- Bowen, H.J.M., 1979. Environmental chemistry of the elements. Academic Press.
- Brochu, C., Wang, J., Roy, G., Messier, N., Wang, X.-Y., Saravia, N.G., Ouellette, M., 2003. Antimony uptake systems in the protozoan parasite *Leishmania* and accumulation differences in antimony-resistant parasites. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 3073–3079.
- Cabrera, G., Pérez, R., Gomez, J.M., Abalos, A., Cantero, D., 2006. Toxic effects of dissolved heavy metals on *Desulfovibrio vulgaris* and *Desulfovibrio* sp. strains. *J. Hazard. Mater.* 135, 40–46.
- Cadenas, E., Davies, K.J., 2000. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic. Biol. Med.* 29, 222–230.
- Caille, N., Zhao, F.J., McGrath, S.P., 2005. Comparison of root absorption, translocation and tolerance of arsenic in the hyperaccumulator *Pteris vittata* and the nonhyperaccumulator *Pteris tremula*. *New Phytol.* 165, 755–761.
- Chance, B., Machly, A., 1967. Methods of biochemical analysis, in: Interscience Publishers Inc. Glick D, New York.
- Chance, B., Maehly, A.C., 1955. [136] Assay of catalases and peroxidases. *Methods Enzymol.* 2, 764–775.
- Charles, S.A., Halliwell, B., 1980. Effect of hydrogen peroxide on spinach (*Spinacia oleracea*) chloroplast fructose biphosphatase. *Biochem. J.* 189, 373.
- Chen, T., Wei, C., Huang, Z., Huang, Q., Lu, Q., Fan, Z., 2002. Arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata* L. and its arsenic accumulation. *Chin. Sci. Bull.* 47, 902–905.
- Chen, Z., Gallie, D.R., 2004. The ascorbic acid redox state controls guard cell signaling and stomatal movement. *Plant Cell Online* 16, 1143–1162.
- Cheng, S., 2003. Effects of heavy metals on plants and resistance mechanisms. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 10, 256–264.

- Cherif, J., Mediouni, C., Ammar, W.B., Jemal, F., 2011. Interactions of zinc and cadmium toxicity in their effects on growth and in antioxidative systems in tomato plants (*Solanum lycopersicum*). *J. Environ. Sci.* 23, 837–844.
- Chew, O., Whelan, J., Millar, A.H., 2003. Molecular definition of the ascorbate-glutathione cycle in Arabidopsis mitochondria reveals dual targeting of antioxidant defenses in plants. *J. Biol. Chem.* 278, 46869–46877.
- Chiffolleau, J.-F., Claisse, D., 2001. La contamination métallique. Ifremer.
- Clemens, S., 2001. Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. *Planta* 212, 475–486.
- Clemens, S., Palmgren, M.G., Krämer, U., 2002. A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation. *Trends Plant Sci.* 7, 309–315.
- Cobbett, C., Goldsbrough, P., 2002a. Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annu. Rev. Plant Biol.* 53, 159–182.
- Cobbett, C., Goldsbrough, P., 2002b. Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annu. Rev. Plant Biol.* 53, 159–182.
- Cobbett, C.S., 2000. Phytochelatin biosynthesis and function in heavy-metal detoxification. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3, 211–216.
- Collins, A.R., 2001. Carotenoids and genomic stability. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* 475, 21–28.
- Conesa, H.M., Robinson, B.H., Schulin, R., Nowack, B., 2007. Growth of *Lygeum spartum* in acid mine tailings: response of plants developed from seedlings, rhizomes and at field conditions. *Environ. Pollut.* 145, 700–707.
- Cooke, M.S., Evans, M.D., Dizdaroglu, M., Lunec, J., 2003. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J.* 17, 1195–1214.
- Cornejo, J.J., Munoz, F.G., Ma, C.Y., Stewart, A.J., 1999. Studies on the decontamination of air by plants. *Ecotoxicology* 8, 311–320.
- Cox, M.S., Bell, P.F., Kovar, J.L., 1996. Arsenic supply characteristics of four cotton-producing soils. *Plant Soil* 180, 11–17.
- Crommentuijn, T., Sijm, D., De Bruijn, J., Van den Hoop, M., Van Leeuwen, K., Van de Plassche, E., 2000. Maximum permissible and negligible concentrations for metals and metalloids in the Netherlands, taking into account background concentrations. *J. Environ. Manage.* 60, 121–143.
- Dalton, D.A., Boniface, C., Turner, Z., Lindahl, A., Kim, H.J., Jelinek, L., Govindarajulu, M., Finger, R.E., Taylor, C.G., 2009. Physiological roles of glutathione S-transferases in soybean root nodules. *Plant Physiol.* 150, 521–530.
- Davies, K.J., 2000. Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. *IUBMB Life* 50, 279–289.
- Dazy, M., Masfarau, J.-F., Féraud, J.-F., 2009. Induction of oxidative stress biomarkers associated with heavy metal stress in *Fontinalis antipyretica* Hedw. *Chemosphere* 75, 297–302.
- Deby, C., Deby-Dupont, G., n.d. L'oxygène et la vie: tome 1-Initiation au métabolisme de l'oxygène.
- Del Buono, D., Scarponi, L., Espen, L., 2007. Glutathione S-transferases in *Festuca arundinacea*: Identification, characterization and inducibility by safener benoxacor. *Phytochemistry* 68, 2614–2624.
- Deneux-Mustin, S., Roussel-Debet, S., Mustin, C., Henner, P., Munier-Lamy, C., Colle, C., Berthelin, J., Garnier-Laplace, J., Leyval, C., 2003. Mobilité et transfert racinaire des éléments en traces (influence des micro-organismes du sol).

- DeRidder, B.P., Dixon, D.P., Beussman, D.J., Edwards, R., Goldsbrough, P.B., 2002. Induction of glutathione S-transferases in Arabidopsis by herbicide safeners. *Plant Physiol.* 130, 1497–1505.
- Desel, C., Hubbermann, E.M., Schwarz, K., Krupinska, K., 2007. Nitration of gamma-tocopherol in plant tissues. *Planta* 226, 1311–1322.
- Díaz-Flores, M., Angeles-Mejia, S., Baiza-Gutman, L.A., Medina-Navarro, R., Hernández-Saavedra, D., Ortega-Camarillo, C., Roman-Ramos, R., Cruz, M., Alarcon-Aguilar, F.J., 2012. Effect of an aqueous extract of *Cucurbita ficifolia* Bouché on the glutathione redox cycle in mice with STZ-induced diabetes. *J. Ethnopharmacol.* 144, 101–108.
- Dietz, K.-J., Baier, M., Krämer, U., 1999. Free radicals and reactive oxygen species as mediators of heavy metal toxicity in plants, in: *Heavy Metal Stress in Plants*. Springer, pp. 73–97.
- Dixit, V., Pandey, V., Shyam, R., 2001. Differential antioxidative responses to cadmium in roots and leaves of pea (*Pisum sativum* L. cv. Azad). *J. Exp. Bot.* 52, 1101–1109.
- Dixon, D.P., Cummins, I., Cole, D.J., Edwards, R., 1998. Glutathione-mediated detoxification systems in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1, 258–266.
- Dixon, D.P., Skipsey, M., Edwards, R., 2010. Roles for glutathione transferases in plant secondary metabolism. *Phytochemistry* 71, 338–350.
- Djéballi, N., Mhadhbi, H., Lafitte, C., Dumas, B., Esquerré-Tugayé, M.-T., Aouani, M.E., Jacquet, C., 2011a. Hydrogen peroxide scavenging mechanisms are components of *Medicago truncatula* partial resistance to *Aphanomyces euteiches*. *Eur. J. Plant Pathol.* 131, 559–571.
- Djéballi, N., Mhadhbi, H., Lafitte, C., Dumas, B., Esquerré-Tugayé, M.-T., Aouani, M.E., Jacquet, C., 2011b. Hydrogen peroxide scavenging mechanisms are components of *Medicago truncatula* partial resistance to *Aphanomyces euteiches*. *Eur. J. Plant Pathol.* 131, 559–571.
- Drażkiewicz, M., Skórzyńska-Polit, E., Krupa, Z., 2004. Copper-induced oxidative stress and antioxidant defence in *Arabidopsis thaliana*. *Biometals* 17, 379–387.
- Du, Y., Zhang, L., Xu, F., Huang, B., Zhang, G., Li, L., 2013. Validation of housekeeping genes as internal controls for studying gene expression during Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) development by quantitative real-time PCR. *Fish Shellfish Immunol.* 34, 939–945.
- Duman, F., Ozturk, F., 2010. Nickel accumulation and its effect on biomass, protein content and antioxidative enzymes in roots and leaves of watercress (*Nasturtium officinale* R. Br.). *J. Environ. Sci.* 22, 526–532.
- Duquesnoy, I., Champeau, G.M., Evray, G., Ledoigt, G., Piquet-Pissaloux, A., 2010. Enzymatic adaptations to arsenic-induced oxidative stress in *Zea mays* and genotoxic effect of arsenic in root tips of *Vicia faba* and *Zea mays*. *C. R. Biol.* 333, 814–824.
- Ebbs, S.D., Kochian, L.V., 1997. Toxicity of zinc and copper to Brassica species: implications for phytoremediation. *J. Environ. Qual.* 26, 776–781.
- Edwards, R., Dixon, D.P., Walbot, V., 2000. Plant glutathione S-transferases: enzymes with multiple functions in sickness and in health. *Trends Plant Sci.* 5, 193–198.
- Ekmekçi, Y., Tanyolac, D., Ayhan, B., 2008. Effects of cadmium on antioxidant enzyme and photosynthetic activities in leaves of two maize cultivars. *J. Plant Physiol.* 165, 600–611.
- EU consul, C. of the E.C., 1976. Council Directive 76/ 464/EEC of 4 May 1976 on pollution caused by certain dangerous substances discharged into the aquatic environment of the community.

- Fam, S.S., Morrow, J.D., 2003. The isoprostanes: unique products of arachidonic acid oxidation—a review. *Curr. Med. Chem.* 10, 1723–1740.
- Farineau, J., Morot-Gaudry, J.-F., 2006. La photosynthèse: processus physiques, moléculaires et physiologiques. Editions Quae.
- Feng, R., Wei, C., Tu, S., Wu, F., Yang, L., 2009. Antimony accumulation and antioxidative responses in four fern plants. *Plant Soil* 317, 93–101.
- Filella, M., Belzile, N., Chen, Y.-W., 2002. Antimony in the environment: a review focused on natural waters: I. Occurrence. *Earth-Sci. Rev.* 57, 125–176.
- Foyer, C.H., Harbinson, J., Mullineaux, P.M., 1994. Oxygen metabolism and the regulation of photosynthetic electron transport. *Causes Photooxidative Stress Amelior. Def. Syst. Plants* 1–42.
- Foyer, C.H., Noctor, G., 2005a. Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *Plant Cell Online* 17, 1866–1875.
- Foyer, C.H., Noctor, G., 2005b. Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant Cell Environ.* 28, 1056–1071.
- Freeman, J.L., Persans, M.W., Nieman, K., Albrecht, C., Peer, W., Pickering, I.J., Salt, D.E., 2004. Increased glutathione biosynthesis plays a role in nickel tolerance in *Thlaspi* nickel hyperaccumulators. *Plant Cell Online* 16, 2176–2191.
- Frova, C., 2003. The plant glutathione transferase gene family: genomic structure, functions, expression and evolution. *Physiol. Plant.* 119, 469–479.
- Gadapati, W.R., Macfie, S.M., 2006. Phytochelatins are only partially correlated with Cd-stress in two species of *Brassica*. *Plant Sci.* 170, 471–480.
- Gajewska, E., Skłodowska, M., 2005. Antioxidative responses and proline level in leaves and roots of pea plants subjected to nickel stress. *Acta Physiol. Plant.* 27, 329–340.
- Gajewska, E., Skłodowska, M., Słaba, M., Mazur, J., 2006. Effect of nickel on antioxidative enzyme activities, proline and chlorophyll contents in wheat shoots. *Biol. Plant.* 50, 653–659.
- Garg, N., Manchanda, G., 2009. ROS generation in plants: Boon or bane? *Plant Biosyst.* 143, 81–96.
- Gebel, T., 1997. Arsenic and antimony: comparative approach on mechanistic toxicology. *Chem. Biol. Interact.* 107, 131–144.
- Ghareeb, H., Bozsó, Z., Ott, P.G., Wydra, K., 2011. Silicon and *Ralstonia solanacearum* modulate expression stability of housekeeping genes in tomato. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 75, 176–179.
- Ghedira, K., 2005. Les flavonoïdes: structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie* 3, 162–169.
- Ghezzi, P., Bonetto, V., 2003. Redox proteomics: identification of oxidatively modified proteins. *Proteomics* 3, 1145–1153.
- Giacomelli, L., Masi, A., Ripoll, D.R., Lee, M.J., van Wijk, K.J., 2007. *Arabidopsis thaliana* deficient in two chloroplast ascorbate peroxidases shows accelerated light-induced necrosis when levels of cellular ascorbate are low. *Plant Mol. Biol.* 65, 627–644.
- Gill, S.S., Anjum, N.A., Hasanuzzaman, M., Gill, R., Trivedi, D.K., Ahmad, I., Pereira, E., Tuteja, N., 2013. Glutathione and glutathione reductase: a boon in disguise for plant abiotic stress defense operations. *Plant Physiol. Biochem.* 70, 204–212.
- Gill, S.S., Tuteja, N., 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol. Biochem.* 48, 909–930.

- Giulietti, A., Overbergh, L., Valckx, D., Decallonne, B., Bouillon, R., Mathieu, C., 2001. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods* 25, 386–401.
- Greenwood, N.N., Earnshaw, A., Earnshaw, A., 1984. *Chemistry of the Elements*. Pergamon press Oxford etc.
- Grispen, V.M., Hakvoort, H.W., Blik, T., Verkleij, J.A., Schat, H., 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. *Environ. Exp. Bot.* 72, 71–76.
- Habig, W.H., Jakoby, W.B., 1981. Assays for differentiation of glutathione S-transferases. *Methods Enzymol.* 77, 398.
- Halliwell, B., Gutteridge, J., 1986. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Arch. Biochem. Biophys.* 246, 501–514.
- Halušková, L., Valentovičová, K., Huttová, J., Mistrík, I., Tamás, L., 2009a. Effect of abiotic stresses on glutathione peroxidase and glutathione S-transferase activity in barley root tips. *Plant Physiol. Biochem.* 47, 1069–1074.
- Halušková, L., Valentovičová, K., Huttová, J., Mistrík, I., Tamás, L., 2009b. Effect of abiotic stresses on glutathione peroxidase and glutathione S-transferase activity in barley root tips. *Plant Physiol. Biochem.* 47, 1069–1074.
- Halušková, L., Valentovičová, K., Huttová, J., Mistrík, I., Tamás, L., 2010. Effect of heavy metals on root growth and peroxidase activity in barley root tip. *Acta Physiol. Plant.* 32, 59–65.
- Hammel, W., Debus, R., Steubing, L., 2000. Mobility of antimony in soil and its availability to plants. *Chemosphere* 41, 1791–1798.
- Hancock, J., Desikan, R., Harrison, J., Bright, J., Hooley, R., Neill, S., 2006. Doing the unexpected: proteins involved in hydrogen peroxide perception. *J. Exp. Bot.* 57, 1711–1718.
- Hannachi-Salhi, A., Combes, D., Baatout, H., Figier, J., Boussaid, M., Marrakchi, M., Trififarah, N., 2004. Evaluation des ressources génétiques des espèces du genre *Hedysarum* dans le bassin méditerranéen. *IPGRI – FAO* 130, 65 – 72.
- Hartley-Whitaker, J., Ainsworth, G., Meharg, A.A., 2001. Copper-and arsenate-induced oxidative stress in *Holcus lanatus* L. clones with differential sensitivity. *Plant Cell Environ.* 24, 713–722.
- Hooper, D.U., Vitousek, P.M., 1997. The effects of plant composition and diversity on ecosystem processes. *Science* 277, 1302–1305.
- Hou, W., Chen, X., Song, G., Wang, Q., Chi Chang, C., 2007. Effects of copper and cadmium on heavy metal polluted waterbody restoration by duckweed (*Lemna minor*). *Plant Physiol. Biochem.* 45, 62–69.
- Hu, J., 2007. Toward Understanding Plant Peroxisome Proliferation. *Plant Signal. Behav.* 2, 308–310.
- Iannelli, M.A., Pietrini, F., Fiore, L., Petrilli, L., Massacci, A., 2002. Antioxidant response to cadmium in *Phragmites australis* plants. *Plant Physiol. Biochem.* 40, 977–982.
- Israr, M., Sahi, S., Datta, R., Sarkar, D., 2006. Bioaccumulation and physiological effects of mercury in *Sesbania drummondii*. *Chemosphere* 65, 591–598.
- Iturbe-Ormaetxe, I., Matamoros, M.A., Rubio, M.C., Dalton, D.A., Becana, M., 2001. The antioxidants of legume nodule mitochondria. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 14, 1189–1196.
- Jain, A., Raven, K.P., Loeppert, R.H., 1999. Arsenite and arsenate adsorption on ferrihydrite: surface charge reduction and net OH⁻ release stoichiometry. *Environ. Sci. Technol.* 33, 1179–1184.

- Jimenez, A., Hernandez, J.A., del Rio, L.A., Sevilla, F., 1997. Evidence for the presence of the ascorbate-glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea leaves. *Plant Physiol.* 114, 275–284.
- Kabata-Pendias, A., 1985. *Pendias. 1985. Trace elements in soils and plants.* CRC Press, Boca Raton.
- Kabata-Pendias, A., Mukherjee, A.B., 2007. *Trace elements from soil to human.* Springer. 550 p
- Kamal, M., Ghaly, A.E., Mahmoud, N., Cote, R., 2004. Phytoaccumulation of heavy metals by aquatic plants. *Environ. Int.* 29, 1029–1039.
- Khan, A.G., 2005. Role of soil microbes in the rhizospheres of plants growing on trace metal contaminated soils in phytoremediation. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 18, 355–364.
- Khan, I., Ahmad, A., Iqbal, M., 2009. Modulation of antioxidant defence system for arsenic detoxification in Indian mustard. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72, 626–634.
- Khan, S., Cao, Q., Zheng, Y.M., Huang, Y.Z., Zhu, Y.G., 2008. Health risks of heavy metals in contaminated soils and food crops irrigated with wastewater in Beijing, China. *Environ. Pollut.* 152, 686–692.
- Kim, Y.-H., Lee, H.-S., Kwak, S.-S., 2010. Differential responses of sweetpotato peroxidases to heavy metals. *Chemosphere* 81, 79–85.
- Koivula, M.J., Eeva, T., 2010. Metal-related oxidative stress in birds. *Environ. Pollut.* 158, 2359–2370.
- Kosugi, H., Kikugawa, K., 1985. Thiobarbituric acid reaction of aldehydes and oxidized lipids in glacial acetic acid. *Lipids* 20, 915–921.
- Krieger-Liszskay, A., 2005. Singlet oxygen production in photosynthesis. *J. Exp. Bot.* 56, 337–346.
- Kunieda, T., Fujiwara, T., Amano, T., Shioi, Y., 2005. Molecular cloning and characterization of a senescence-induced tau-class glutathione S-transferase from barley leaves. *Plant Cell Physiol.* 46, 1540–1548.
- Lamhamdi, M., Bakrim, A., Aarab, A., Lafont, R., Sayah, F., 2011. Lead phytotoxicity on wheat (*Triticum aestivum* L.) seed germination and seedlings growth. *C. R. Biol.* 334, 118–126.
- León, A.M., Palma, J.M., Corpas, F.J., Gómez, M., Romero-Puertas, M.C., Chatterjee, D., Mateos, R.M., del Río, L.A., Sandalio, L.M., 2002. Antioxidative enzymes in cultivars of pepper plants with different sensitivity to cadmium. *Plant Physiol. Biochem.* 40, 813–820.
- Levine, R.L., 2002. Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease. *Free Radic. Biol. Med.* 32, 790–796.
- Levresse, G., Lopez, G., Tritlla, J., López, E.C., Chavez, A.C., Salvador, E.M., Soler, A., Corbella, M., Sandoval, L.G., Corona-Esquivel, R., 2012. Phytoavailability of antimony and heavy metals in arid regions: The case of the Wadley Sb district (San Luis, Potosí, Mexico). *Sci. Total Environ.* 427, 115–125.
- Lewis, S., Donkin, M.E., Depledge, M.H., 2001. Hsp70 expression in *Enteromorpha intestinalis* (Chlorophyta) exposed to environmental stressors. *Aquat. Toxicol.* 51, 277–291.
- Licciardello, C., Nunzio, D., Traini, A., Recupero, G.R., Frusciante, L., Chiusano, M.L., 2014. Characterization of the glutathione S-transferase gene family through ESTs and expression analyses within common and pigmented cultivars of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck. *BMC Plant Biol.* 14, 39.
- Lintschinger, J., Michalke, B., Schulte-Hostede, S., Schramel, P., 1998. Studies on speciation of antimony in soil contaminated by industrial activity. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 72, 11–25.

- Liu, X., Hua, X., Guo, J., Qi, D., Wang, L., Liu, Z., Jin, Z., Chen, S., Liu, G., 2008. Enhanced tolerance to drought stress in transgenic tobacco plants overexpressing VTE1 for increased tocopherol production from *Arabidopsis thaliana*. *Biotechnol. Lett.* 30, 1275–1280.
- Loeffler, S., Hochberger, A., Grill, E., Winnacker, E.-L., Zenk, M.H., 1989. Termination of the phytochelatin synthase reaction through sequestration of heavy metals by the reaction product. *FEBS Lett.* 258, 42–46.
- Lombi, E., Tearall, K.L., Howarth, J.R., Zhao, F.-J., Hawkesford, M.J., McGrath, S.P., 2002. Influence of iron status on cadmium and zinc uptake by different ecotypes of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Plant Physiol.* 128, 1359–1367.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 265–275.
- Luis, A., Sandalio, L.M., Altomare, D.A., Zilinskas, B.A., 2003. Mitochondrial and peroxisomal manganese superoxide dismutase: differential expression during leaf senescence. *J. Exp. Bot.* 54, 923–933.
- Luna, C.M., González, C.A., Trippi, V.S., 1994. Oxidative damage caused by an excess of copper in oat leaves. *Plant Cell Physiol.* 35, 11–15.
- Lyubenova, L., Nehnevajova, E., Herzig, R., Schröder, P., 2009. Response of antioxidant enzymes in *Nicotiana tabacum* clones during phytoextraction of heavy metals. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 16, 573–581.
- Lyubenova, L., Schröder, P., 2010. Uptake and effect of heavy metals on the plant detoxification cascade in the presence and absence of organic pollutants, in: *Soil Heavy Metals*. Springer, pp. 65–85.
- Maestri, E., Marmiroli, M., Visioli, G., Marmiroli, N., 2010. Metal tolerance and hyperaccumulation: costs and trade-offs between traits and environment. *Environ. Exp. Bot.* 68, 1–13.
- Markert, B., 1992. Presence and significance of naturally occurring chemical elements of the periodic system in the plant organism and consequences for future investigations on inorganic environmental chemistry in ecosystems. *Vegetatio* 103, 1–30.
- Markert, B.A., Haderlie, B., 1996. Instrumental element and multi-element analysis of plant samples: methods and applications. John Wiley New York, NY.
- Marklund, S., Marklund, G., 1974. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.* 47, 469–474.
- Marrs, K.A., 1996. The functions and regulation of glutathione S-transferases in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 47, 127–158.
- Martinoia, E., Massonneau, A., Frangne, N., 2000. Transport processes of solutes across the vacuolar membrane of higher plants. *Plant Cell Physiol.* 41, 1175–1186.
- Matschullat, J., 2000. Arsenic in the geosphere—a review. *Sci. Total Environ.* 249, 297–312.
- McGrath, S.P., Zhao, J., Lombi, E., 2002. Phytoremediation of metals, metalloids, and radionuclides. *Adv. Agron.* 75, 1–56.
- Meharg, A.A., Jardine, L., 2003. Arsenite transport into paddy rice (*Oryza sativa*) roots. *New Phytol.* 157, 39–44.
- Mendoza-Cózatl, D., Loza-Tavera, H., Hernández-Navarro, A., Moreno-Sánchez, R., 2005. Sulfur assimilation and glutathione metabolism under cadmium stress in yeast, protists and plants. *FEMS Microbiol. Rev.* 29, 653–671.
- Meyer, A.J., Hell, R., 2005. Glutathione homeostasis and redox-regulation by sulfhydryl groups. *Photosynth. Res.* 86, 435–457.

- Millar, A.H., Mittova, V., Kiddle, G., Heazlewood, J.L., Bartoli, C.G., Theodoulou, F.L., Foyer, C.H., 2003. Control of ascorbate synthesis by respiration and its implications for stress responses. *Plant Physiol.* 133, 443–447.
- Mittler, R., 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 7, 405–410.
- Mocquot, B., Vangronsveld, J., Clijsters, H., Mench, M., 1996. Copper toxicity in young maize (*Zea mays* L.) plants: effects on growth, mineral and chlorophyll contents, and enzyme activities. *Plant Soil* 182, 287–300.
- Mohanpuria, P., Rana, N.K., Yadav, S.K., 2007. Cadmium induced oxidative stress influence on glutathione metabolic genes of *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze. *Environ. Toxicol.* 22, 368–374.
- Møller, I.M., 2001. Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. *Annu. Rev. Plant Biol.* 52, 561–591.
- Møller, I.M., Jensen, P.E., Hansson, A., 2007. Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annu Rev Plant Biol* 58, 459–481.
- Moons, A., 2003a. *Osgtu3* and *osgtu4*, encoding tau class glutathione S-transferases, are heavy metal- and hypoxic stress-induced and differentially salt stress-responsive in rice roots. *Febs Lett.* 553, 427–432.
- Moons, A., 2003b. *Osgtu3* and *osgtu4*, encoding tau class glutathione S-transferases, are heavy metal- and hypoxic stress-induced and differentially salt stress-responsive in rice roots. *Febs Lett.* 553, 427–432.
- Mourón, S.A., Grillo, C.A., Dulout, F.N., Golijow, C.D., 2005. DNA–protein cross-links and sister chromatid exchanges induced by dimethylarsinic acid in human fibroblasts cells. *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* 581, 83–90.
- Mullineaux, P.M., Rausch, T., 2005. Glutathione, photosynthesis and the redox regulation of stress-responsive gene expression. *Photosynth. Res.* 86, 459–474.
- Munne-Bosch, S., 2005. The role of α -tocopherol in plant stress tolerance. *J. Plant Physiol.* 162, 743–748.
- Murashige, T., Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15, 473–497.
- Murciego, A.M., Sanchez, A.G., Gonzalez, M.A., Gil, E.P., Gordillo, C.T., Fernández, J.C., Triguero, T.B., 2007a. Antimony distribution and mobility in topsoils and plants (*Cytisus striatus*, *Cistus ladanifer* and *Dittrichia viscosa*) from polluted Sb-mining areas in Extremadura (Spain). *Environ. Pollut.* 145, 15–21.
- Murciego, A.M., Sanchez, A.G., Gonzalez, M.A., Gil, E.P., Gordillo, C.T., Fernández, J.C., Triguero, T.B., 2007b. Antimony distribution and mobility in topsoils and plants (*Cytisus striatus*, *Cistus ladanifer* and *Dittrichia viscosa*) from polluted Sb-mining areas in Extremadura (Spain). *Environ. Pollut.* 145, 15–21.
- Nakano, Y., Asada, K., 1980. Spinach chloroplasts scavenge hydrogen peroxide on illumination. *Plant Cell Physiol.* 21, 1295–1307.
- Naquet, A., Hanriot, M., 1890. *Principes de chimie fondée sur les théories modernes*. F. Savy.
- Nedjimi, B., 2009. Salt tolerance strategies of *Lygeum spartum* L.: A new fodder crop for Algerian saline steppes. *Flora-Morphol. Distrib. Funct. Ecol. Plants* 204, 747–754.
- Nehnevajova, E., Lyubenova, L., Herzig, R., Schröder, P., Schwitzguébel, J.-P., Schmölling, T., 2012. Metal accumulation and response of antioxidant enzymes in seedlings and adult sunflower mutants with improved metal removal traits on a metal-contaminated soil. *Environ. Exp. Bot.* 76, 39–48.

- Noctor, G., Foyer, C.H., 1998. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu. Rev. Plant Biol.* 49, 249–279.
- Noctor, G., Gomez, L., Vanacker, H., Foyer, C.H., 2002. Interactions between biosynthesis, compartmentation and transport in the control of glutathione homeostasis and signalling. *J. Exp. Bot.* 53, 1283–1304.
- Noguchi, T., 2002. Dual role of triplet localization on the accessory chlorophyll in the photosystem II reaction center: photoprotection and photodamage of the D1 protein. *Plant Cell Physiol.* 43, 1112–1116.
- Ogawa, K., Hatano-Iwasaki, A., Yanagida, M., Iwabuchi, M., 2004. Level of glutathione is regulated by ATP-dependent ligation of glutamate and cysteine through photosynthesis in *Arabidopsis thaliana*: mechanism of strong interaction of light intensity with flowering. *Plant Cell Physiol.* 45, 1–8.
- Okkenhaug, G., Zhu, Y.-G., Luo, L., Lei, M., Li, X., Mulder, J., 2011. Distribution, speciation and availability of antimony (Sb) in soils and terrestrial plants from an active Sb mining area. *Environ. Pollut.* 159, 2427–2434.
- Olsen, K.M., Hehn, A., Jugdé, H., Slimestad, R., Larbat, R., Bourgaud, F., Lillo, C., 2010. Identification and characterisation of CYP75A31, a new flavonoid 3'5'-hydroxylase, isolated from *Solanum lycopersicum*. *BMC Plant Biol.* 10, 21.
- Oñate-Sánchez, L., Vicente-Carbajosa, J., 2008. DNA-free RNA isolation protocols for *Arabidopsis thaliana*, including seeds and siliques. *BMC Res. Notes* 1–93.
- Otones, V., Álvarez-Ayuso, E., García-Sánchez, A., Santa Regina, I., Murciego, A., 2011. Arsenic distribution in soils and plants of an arsenic impacted former mining area. *Environ. Pollut.* 159, 2637–2647.
- Pan, X., Zhang, D., Chen, X., Bao, A., Li, L., 2011a. Antimony accumulation, growth performance, antioxidant defense system and photosynthesis of *Zea mays* in response to antimony pollution in soil. *Water. Air. Soil Pollut.* 215, 517–523.
- Pan, X., Zhang, D., Chen, X., Bao, A., Li, L., 2011b. Antimony accumulation, growth performance, antioxidant defense system and photosynthesis of *Zea mays* in response to antimony pollution in soil. *Water. Air. Soil Pollut.* 215, 517–523.
- Pandey, N., Sharma, C.P., 2002. Effect of heavy metals Co²⁺, Ni²⁺ and Cd²⁺ on growth and metabolism of cabbage. *Plant Sci.* 163, 753–758.
- Parent, C., Capelli, N., Dat, J., 2008. Formes réactives de l'oxygène, stress et mort cellulaire chez les plantes. *C. R. Biol.* 331, 255–261.
- Pätsikkä, E., Kairavuo, M., Šeršen, F., Aro, E.-M., Tyystjärvi, E., 2002. Excess copper predisposes photosystem II to photoinhibition in vivo by outcompeting iron and causing decrease in leaf chlorophyll. *Plant Physiol.* 129, 1359–1367.
- Peltier, J.-B., Ytterberg, A.J., Sun, Q., van Wijk, K.J., 2004. New functions of the thylakoid membrane proteome of *Arabidopsis thaliana* revealed by a simple, fast, and versatile fractionation strategy. *J. Biol. Chem.* 279, 49367–49383.
- Peñuelas, J., Munné-Bosch, S., 2005. Isoprenoids: an evolutionary pool for photoprotection. *Trends Plant Sci.* 10, 166–169.
- Peralta-Videoa, J.R., Lopez, M.L., Narayan, M., Saupe, G., Gardea-Torresdey, J., 2009. The biochemistry of environmental heavy metal uptake by plants: implications for the food chain. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41, 1665–1677.
- Pérez-Sirvent, C., Martínez-Sánchez, M.J., Martínez-López, S., Bech, J., Bolan, N., 2012. Distribution and bioaccumulation of arsenic and antimony in *Dittrichia viscosa* growing in mining-affected semiarid soils in southeast Spain. *J. Geochem. Explor.* 123, 128–135.

- Polidoros, A.N., Scandalios, J.G., 1999. Role of hydrogen peroxide and different classes of antioxidants in the regulation of catalase and glutathione S-transferase gene expression in maize (*Zea mays* L.). *Physiol. Plant.* 106, 112–120.
- Pratas, J., Prasad, M.N.V., Freitas, H., Conde, L., 2005. Plants growing in abandoned mines of Portugal are useful for biogeochemical exploration of arsenic, antimony, tungsten and mine reclamation. *J. Geochem. Explor.* 85, 99–107.
- Pulford, I.D., Watson, C., 2003. Phytoremediation of heavy metal-contaminated land by trees—a review. *Environ. Int.* 29, 529–540.
- Qi, C., Wu, F., Deng, Q., Liu, G., Mo, C., Liu, B., Zhu, J., 2011. Distribution and accumulation of antimony in plants in the super-large Sb deposit areas, China. *Microchem. J.* 97, 44–51.
- Quan, L.-J., Zhang, B., Shi, W.-W., Li, H.-Y., 2008. Hydrogen peroxide in plants: a versatile molecule of the reactive oxygen species network. *J. Integr. Plant Biol.* 50, 2–18.
- Quézel, P., Santa, S., 1962. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales.
- Rached-Mosbah, Gardou, C., 1988. Relation sols-plantes dans des zones pastorales à substrat riche en antimoine : exemple du Djebel Hamimat (Algérie). *Colloq. Phytosociol. XVI Phytosociologie Pastor.* 307–320.
- Rached-Mosbah, O., Gardou, C., Pauwels, J., 1992. Accumulation d'antimoine par les végétaux sur sol contaminé, en zone steppique. *Bull Soc Bot Fr Actual Bot* 133–139.
- Rahman, H., Sabreen, S., Alam, S., Kawai, S., 2005. Effects of nickel on growth and composition of metal micronutrients in barley plants grown in nutrient solution. *J. Plant Nutr.* 28, 393–404.
- Rao, A.C., Reddy, A.R., 2008. Glutathione reductase: a putative redox regulatory system in plant cells, in: *Sulfur Assimilation and Abiotic Stress in Plants*. Springer, pp. 111–147.
- Rascio, N., Navari-Izzo, F., 2011. Heavy metal hyperaccumulating plants: how and why do they do it? And what makes them so interesting? *Plant Sci.* 180, 169–181.
- Reddy, A.M., Kumar, S.G., Jyothsnakumari, G., Thimmanaik, S., Sudhakar, C., 2005. Lead induced changes in antioxidant metabolism of horsegram (*Macrotyloma uniflorum* (Lam.) Verdc.) and bengalgram (*Cicer arietinum* L.). *Chemosphere* 60, 97–104.
- Reid, T.J., Murthy, M.R., Sicignano, A., Tanaka, N., Musick, W.D., Rossmann, M.G., 1981. Structure and heme environment of beef liver catalase at 2.5 Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78, 4767–4771.
- Rejeb, K.B., Abdelly, C., Savouré, A., 2012. La proline, un acide aminé multifonctionnel impliqué dans l'adaptation des plantes aux contraintes environnementales. *Biol. Aujourd'hui* 206, 291–299.
- Renwei Feng, C.W., 2013. The uptake and detoxification of antimony by plants: A review. *Environ. Exp. Bot.* 96, 28–34.
- Requejo, R., Tena, M., 2012. Influence of glutathione chemical effectors in the response of maize to arsenic exposure. *J. Plant Physiol.* 169, 649–656.
- Rhoads, D.M., Umbach, A.L., Subbaiah, C.C., Siedow, J.N., 2006. Mitochondrial reactive oxygen species. Contribution to oxidative stress and interorganellar signaling. *Plant Physiol.* 141, 357–366.
- Robinson, B., Fernández, J.-E., Madejón, P., Marañón, T., Murillo, J.M., Green, S., Clothier, B., 2003. Phytoextraction: an assessment of biogeochemical and economic viability. *Plant Soil* 249, 117–125.
- Romero-Puertas, M.C., Corpas, F.J., Sandalio, L.M., Leterrier, M., Rodríguez-Serrano, M., Del Río, L.A., Palma, J.M., 2006. Glutathione reductase from pea leaves: response to abiotic stress and characterization of the peroxisomal isozyme. *New Phytol.* 170, 43–52.

- ROS, R., COOK, D.T., MARTINEZ-CORTINA, C., PICAZO, I., 1992. Nickel and cadmium-related changes in growth, plasma membrane lipid composition, ATPase hydrolytic activity and proton-pumping of rice (*Oryza sativa* L. cv. Bahia) shoots. *J. Exp. Bot.* 43, 1475–1481.
- Scandalios, J.G., 1997. Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schiferl, D., Barrett, C.S., 1969. The crystal structure of arsenic at 4.2, 78 and 299 Degrees K. *J. Appl. Crystallogr.* 2, 30–36.
- Schröder, P., Lyubenova, L., Huber, C., 2009. Do heavy metals and metalloids influence the detoxification of organic xenobiotics in plants? *Environ. Sci. Pollut. Res.* 16, 795–804.
- Schützendübel, A., Polle, A., 2002. Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *J. Exp. Bot.* 53, 1351–1365.
- Shaibur, M.R., Kitajima, N., Sugawara, R., Kondo, T., Alam, S., Huq, S.I., Kawai, S., 2008. Critical toxicity level of arsenic and elemental composition of arsenic-induced chlorosis in hydroponic sorghum. *Water. Air. Soil Pollut.* 191, 279–292.
- Shanker, A.K., Cervantes, C., Loza-Tavera, H., Avudainayagam, S., 2005. Chromium toxicity in plants. *Environ. Int.* 31, 739–753.
- Sharma, P., Dubey, R.S., 2005. Lead toxicity in plants. *Braz. J. Plant Physiol.* 17, 35–52.
- Sheoran, V., Sheoran, A.S., Poonia, P., 2009. Phytomining: A review. *Miner. Eng.* 22, 1007–1019.
- Shi, H., Hudson, L.G., Ding, W., Wang, S., Cooper, K.L., Liu, S., Chen, Y., Shi, X., Liu, K.J., 2004. Arsenite causes DNA damage in keratinocytes via generation of hydroxyl radicals. *Chem. Res. Toxicol.* 17, 871–878.
- Shri, M., Kumar, S., Chakrabarty, D., Trivedi, P.K., Mallick, S., Misra, P., Shukla, D., Mishra, S., Srivastava, S., Tripathi, R.D., 2009. Effect of arsenic on growth, oxidative stress, and antioxidant system in rice seedlings. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72, 1102–1110.
- Shringarpure, R., Davies, K.J., 2002. Protein turnover by the proteasome in aging and disease 1, 2. *Free Radic. Biol. Med.* 32, 1084–1089.
- Shtangeeva, I., Bali, R., Harris, A., 2011. Bioavailability and toxicity of antimony. *J. Geochem. Explor.* 110, 40–45.
- Siripornadulsil, S., Traina, S., Verma, D.P.S., Sayre, R.T., 2002. Molecular mechanisms of proline-mediated tolerance to toxic heavy metals in transgenic microalgae. *Plant Cell Online* 14, 2837–2847.
- Somashekaraiah, B.V., Padmaja, K., Prasad, A.R.K., 1992. Phytotoxicity of cadmium ions on germinating seedlings of mung bean (*Phaseolus vulgaris*): Involvement of lipid peroxides in chlorophyll degradation. *Physiol. Plant.* 85, 85–89.
- Srivastava, A.K., Bhargava, P., Rai, L.C., 2005. Salinity and copper-induced oxidative damage and changes in the antioxidative defence systems of *Anabaena doliolum*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 21, 1291–1298.
- Sun, H., Yan, S.C., Cheng, W.S., 2000. Interaction of antimony tartrate with the tripeptide glutathione. *Eur. J. Biochem.* 267, 5450–5457.
- Susarla, S., Medina, V.F., McCutcheon, S.C., 2002. Phytoremediation: an ecological solution to organic chemical contamination. *Ecol. Eng.* 18, 647–658.
- Takahashi, M., Asada, K., 1988. Superoxide production in aprotic interior of chloroplast thylakoids. *Arch. Biochem. Biophys.* 267, 714–722.
- Thomas, J.C., Malick, F.K., Endreszl, C., Davies, E.C., Murray, K.S., 1998. Distinct responses to copper stress in the halophyte *Mesembryanthemum crystallinum*. *Physiol. Plant.* 102, 360–368.

- Tschan, M., Robinson, B., Schulin, R., 2008. Antimony uptake by *Zea mays* (L.) and *Helianthus annuus* (L.) from nutrient solution. *Environ. Geochem. Health* 30, 187–191.
- Tschan, M., Robinson, B.H., Nodari, M., Schulin, R., 2009. Antimony uptake by different plant species from nutrient solution, agar and soil. *Environ. Chem.* 6, 144–152.
- Tsuji, N., Hirayanagi, N., Iwabe, O., Namba, T., Tagawa, M., Miyamoto, S., Miyasaka, H., Takagi, M., Hirata, K., Miyamoto, K., 2003. Regulation of phytochelatin synthesis by zinc and cadmium in marine green alga, *Dunaliella tertiolecta*. *Phytochemistry* 62, 453–459.
- Tuteja, N., Ahmad, P., Panda, B.B., Tuteja, R., 2009. Genotoxic stress in plants: shedding light on DNA damage, repair and DNA repair helicases. *Mutat. Res. Mutat. Res.* 681, 134–149.
- Tuteja, N., Tuteja, R., 2001. Unraveling DNA repair in human: molecular mechanisms and consequences of repair defect. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 36, 261–290.
- Ulmasov, T., Ohmiya, A., Hagen, G., Guilfoyle, T., 1995. The soybean GH2/4 gene that encodes a glutathione S-transferase has a promoter that is activated by a wide range of chemical agents. *Plant Physiol.* 108, 919–927.
- USEPA, (United States Environmental Protection Agency), 1998. Integrated risk information system (IRIS): arsenic, inorganic, Cincinnati 7440–38–2.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T., Mazur, M., Telser, J., 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39, 44–84.
- Verbruggen, N., Hermans, C., 2008. Proline accumulation in plants: a review. *Amino Acids* 35, 753–759.
- Vernoux, T., Wilson, R.C., Seeley, K.A., Reichheld, J.-P., Muroy, S., Brown, S., Maughan, S.C., Cobbett, C.S., Van Montagu, M., Inzé, D., 2000. The root meristemless1/cadmium sensitive2 gene defines a glutathione-dependent pathway involved in initiation and maintenance of cell division during postembryonic root development. *Plant Cell Online* 12, 97–109.
- Vranová, E., Atichartpongkul, S., Villarroel, R., Van Montagu, M., Inzé, D., Van Camp, W., 2002. Comprehensive analysis of gene expression in *Nicotiana tabacum* leaves acclimated to oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 10870–10875.
- Wachter, A., Rausch, T., 2005. Regulation of glutathione (GSH) synthesis in plants: Novel insight from *Arabidopsis*. *FAL Agric Res* 283, 149–55.
- Wang, H.B., Wong, M.H., Lan, C.Y., Baker, A.J.M., Qin, Y.R., Shu, W.S., Chen, G.Z., Ye, Z.H., 2007. Uptake and accumulation of arsenic by 11 *Pteris* taxa from southern China. *Environ. Pollut.* 145, 225–233.
- Wang, Y., Greger, M., 2004. Clonal differences in mercury tolerance, accumulation, and distribution in willow. *J. Environ. Qual.* 33, 1779–1785.
- Weber, M., Trampczynska, A., Clemens, S., 2006. Comparative transcriptome analysis of toxic metal responses in *Arabidopsis thaliana* and the Cd²⁺-hypertolerant facultative metallophyte *Arabidopsis halleri*. *Plant Cell Environ.* 29, 950–963.
- Weckx, J.E.J., Clijsters, H.M.M., 1997. Zn phytotoxicity induces oxidative stress in primary leaves of *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiol. Biochem.* 35, 405–410.
- Wilson, S.C., Lockwood, P.V., Ashley, P.M., Tighe, M., 2010. The chemistry and behaviour of antimony in the soil environment with comparisons to arsenic: a critical review. *Environ. Pollut.* 158, 1169–1181.
- Winkel-Shirley, B., 2002. Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5, 218–223.

- Wiseman, H., Halliwell, B., 1996. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem J* 313, 17–29.
- Wójcik, M., Tukiendorf, A., 2004. Phytochelatin synthesis and cadmium localization in wild type of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Growth Regul.* 44, 71–80.
- Wünschmann, J., Beck, A., Meyer, L., Letzel, T., Grill, E., Lenzian, K.J., 2007. Phytochelatins are synthesized by two vacuolar serine carboxypeptidases in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 581, 1681–1687.
- Wysocki, R., Chéry, C.C., Wawrzycka, D., Van Hulle, M., Cornelis, R., Thevelein, J.M., Tamás, M.J., 2001. The glycerol channel Fps1p mediates the uptake of arsenite and antimonite in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* 40, 1391–1401.
- Xu, S., Hu, J., Li, Y., Ma, W., Zheng, Y., Zhu, S., 2011. Chilling tolerance in *Nicotiana tabacum* induced by seed priming with putrescine. *Plant Growth Regul.* 63, 279–290.
- Yadav, S.K., 2010. Heavy metals toxicity in plants: an overview on the role of glutathione and phytochelatins in heavy metal stress tolerance of plants. *South Afr. J. Bot.* 76, 167–179.
- Yadav, S.K., Dhote, M., Kumar, P., Sharma, J., Chakrabarti, T., Juwarkar, A.A., 2010. Differential antioxidative enzyme responses of *Jatropha curcas* L. to chromium stress. *J. Hazard. Mater.* 180, 609–615.
- Yang, X., Feng, Y., He, Z., Stoffella, P.J., 2005. Molecular mechanisms of heavy metal hyperaccumulation and phytoremediation. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 18, 339–353.
- Young, E.D., Galy, A., Nagahara, H., 2002. Kinetic and equilibrium mass-dependent isotope fractionation laws in nature and their geochemical and cosmochemical significance. *Geochim. Cosmochim. Acta* 66, 1095–1104.
- Zangi, R., Filella, M., 2012. Transport routes of metalloids into and out of the cell: a review of the current knowledge. *Chem. Biol. Interact.* 197, 47–57.
- ZHANG, C., WU, Z., JU, T., GE, Y., 2013. Purification and Identification of Glutathione S-transferase in Rice Root under Cadmium Stress. *Rice Sci.* 20, 173–178.
- Zhang, C.G., Leung, K.K., Wong, Y.S., Tam, N.F.Y., 2007. Germination, growth and physiological responses of mangrove plant *Bruguiera gymnorhiza* to lubricating oil pollution. *Environ. Exp. Bot.* 60, 127–136.
- Zhang, C.-H., Ge, Y., 2008. Response of glutathione and glutathione S-transferase in rice seedlings exposed to cadmium stress. *Rice Sci.* 15, 73–76.
- Zhang, F.-Q., Wang, Y.-S., Lou, Z.-P., Dong, J.-D., 2007. Effect of heavy metal stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of two mangrove plant seedlings (*Kandelia candel* and *Bruguiera gymnorhiza*). *Chemosphere* 67, 44–50.
- Zhang, M., Cui, L., Sheng, L., Wang, Y., 2009. Distribution and enrichment of heavy metals among sediments, water body and plants in Hengshuihu Wetland of Northern China. *Ecol. Eng.* 35, 563–569.
- Zhang, W., Yin, K., Li, B., Chen, L., 2013. A glutathione S-transferase from *Proteus mirabilis* involved in heavy metal resistance and its potential application in removal of Hg²⁺. *J. Hazard. Mater.* 261, 646–652.
- Zhang, W.-H., Tyerman, S.D., 1999. Inhibition of water channels by HgCl₂ in intact wheat root cells. *Plant Physiol.* 120, 849–858.
- Zhao, F.-J., McGrath, S.P., 2009. Biofortification and phytoremediation. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12, 373–380.
- Zheng, J., Ohata, M., Furuta, N., 2000. Antimony speciation in environmental samples by using high-performance liquid chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry. *Anal. Sci.* 16, 75–80.

- Zhou, Z.S., Huang, S.Q., Guo, K., Mehta, S.K., Zhang, P.C., Yang, Z.M., 2007. Metabolic adaptations to mercury-induced oxidative stress in roots of *Medicago sativa* L. *J. Inorg. Biochem.* 101, 1–9.
- Zornoza, P., Robles, S., Martin, N., 1999. Alleviation of nickel toxicity by ammonium supply to sunflower plants. *Plant Soil* 208, 221–226.

ANNEXES

Annexe 1 : Composition du milieu MS M5519 de sigma

Composants	Quantité pour un litre
KNO ₃	1,9 g
NH ₄ NO ₃	1,65 g
CaCl ₂ anhydre	0,33 g
KH ₃ PO ₄	0,17 g
MgSO ₄	0,18 g
FeNaEDTA	37,26 mg
MnSO ₄	16,9 mg
ZnSO ₄ H ₂ O 7	8,6 mg
Acide borique	6,2 mg
KI	0,83 mg
MoO ₄ Na ₂ H ₂ O 2	0,25 mg
COCl ₂ H ₂ O 6	0,025 mg
CuSO ₄ H ₂ O 5	0,025 mg
Myo-Inositol	100 mg
Glycine	2 mg
Acide nicotinique	0,5 mg
Pyridoxine	0,5 mg
Thiamine (HCL)	0,1 mg
Agar	7,8 g

Annexe 2: Extraction des fragments d'ADN produits par PCR selon *le Kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System*

A. Dissolving the Gel Slice

1. Following electrophoresis, excise DNA band from gel and place gel slice in a 1.5ml microcentrifuge tube.
2. Add 10µl Membrane Binding Solution per 10mg of gel slice. Vortex and incubate at 50–65°C until gel slice is completely dissolved.

B. Processing PCR Amplifications

1. Add an equal volume of Membrane Binding Solution to the PCR amplification.

Binding of DNA

1. Insert SV Minicolumn into Collection Tube.
2. Transfer dissolved gel mixture or prepared PCR product to the Minicolumn assembly. Incubate at room temperature for 1 minute.
3. Centrifuge at 16,000 × g for 1 minute. Discard flowthrough and reinsert Minicolumn into Collection Tube.

Washing

4. Add 700µl Membrane Wash Solution (ethanol added). Centrifuge at 16,000 × g for 1 minute. Discard flowthrough and reinsert Minicolumn into Collection Tube.
5. Repeat Step 4 with 500µl Membrane Wash Solution. Centrifuge at 16,000 × g for 5 minutes.
6. Empty the Collection Tube and recentrifuge the column assembly for 1 minute with the microcentrifuge lid open (or off) to allow evaporation of any residual ethanol.

Elution

7. Carefully transfer Minicolumn to a clean 1.5ml microcentrifuge tube.
8. Add 50µl of Nuclease-Free Water to the Minicolumn. Incubate at room temperature for 1 minute. Centrifuge at 16,000 × g for 1 minute.
9. Discard Minicolumn and store DNA at 4°C or –20°C.

Annexe 3: Extraction des plasmides selon le Kit Wizard®Plus SV Minipreps DNA Purification System

Production of Cleared Lysate

1. Pellet 1–10ml of overnight culture for 5 minutes.
2. Thoroughly resuspend pellet with 250µl of Cell Resuspension Solution.
3. Add 250µl of Cell Lysis Solution to each sample; invert 4 times to mix.
4. Add 10µl of Alkaline Protease Solution; invert 4 times to mix. Incubate 5 minutes at room temperature.
5. Add 350µl of Neutralization Solution; invert 4 times to mix.
6. Centrifuge at top speed for 10 minutes at room temperature.

Binding of Plasmid DNA

7. Insert Spin Column into Collection Tube.
8. Decant cleared lysate into Spin Column.
9. Centrifuge at top speed for 1 minute at room temperature. Discard flowthrough, and reinsert Column into Collection Tube.

Washing

10. Add 750µl of Wash Solution (ethanol added). Centrifuge at top speed for 1 minute. Discard flowthrough and reinsert column into Collection Tube.
11. Repeat Step 10 with 250µl of Wash Solution.
12. Centrifuge at top speed for 2 minutes at room temperature.

Elution

13. Transfer Spin Column to a sterile 1.5ml microcentrifuge tube, being careful not to transfer any of the Column Wash Solution with the Spin Column. If the Spin Column has Column Wash Solution associated with it, centrifuge again for 1 minute at top speed, then transfer the Spin Column to a new, sterile 1.5ml microcentrifuge tube.
14. Add 100µl of Nuclease-Free Water to the Spin Column. Centrifuge at top speed for 1 minute at room temperature.
15. Discard column, and store DNA at –20°C or below.

RÉSUMÉS

ملخص:

الغرض من هذه الدراسة هو تقييم مستوى الأوكسدة و أنظمة الدفاع المضادة للأوكسدة عند النباتات التي تنمو في المناطق الملوثة بالمعادن الثقيلة وتحليل التعبير الجيني لأنزيم الـ GST. لهذا الغرض جمعنا نوعين من النباتات *Lygeum spartum* L. و *Hedysarum pallidum* Desf (الجزائر) و هذا وفقا لتدرج تركيز الأنتيمون في تربة المنطقة من أجل دراسة علامات الأوكسدة و أنشطة الإنزيمات المضادة للأوكسدة (فوق أكسدة الليبيدات (MDA) سوبر أكسيد ديسميوتاز (SOD)، كاتالاز (CAT)، البيروكسيداز (POD)، البيروكسيداز أسكورات (APX) و الجلوتاثيون-S-ترانسفيراز (GST). في كلا النوعين يتراكم بشكل مختلف الأنتيمون والزرنيخ في كل من الجذور و الأجزاء الهوائية للنبات.

مؤشر الأوكسدة في كلا النباتين يزيد بشكل ملحوظ مع زيادة تركيز الأنتيمون والزرنيخ في التربة ولكن يكون أعلى بكثير في *H. pallidum*. تختلف أنشطة الإنزيمات من نبتة إلى نبتة و من منطقة إلى أخرى. تكون أنشطة SOD، APX، GST قصوى في المنطقة الأكثر تلوثا وهذا في كلتا أجزاء *H. pallidum*. إن تثبيط نشاط أنزيم CAT على مستوى جذور *H. pallidum* في جميع المناطق الملوثة يتزامن مع نشاط أنزيم POD و ذلك على مستوى نفس النسيج. في *L. spartum* الـ APX في المناطق العلوية، كذلك الـ CAT و الـ GST في المناطق العلوية وفي الجذور ترتفع إلى أقصاها في المنطقة 5 (الأقرب إلى المنجم) بينما تم ملاحظة هبوط أنشطة الـ SOD و الـ POD في الأنسجة نتيجة للتركيز العالية للأنتيمون و الزرنيخ في التربة. من هذه النتائج نقترح إمكانية استعمال MDA كمؤشر بيولوجي لتلوث تربة كلتا النباتين بالأنتيمون و الزرنيخ.

سمح زرع نوعين من *H. pallidum* في المخبر من استنساخ ثلاثة أجزاء من مورثة الأكتين واثنان من GST tau. نسبة التعريف بين مورثتي GST tau تقدر بـ 53% على المستوى النيكلوتيدي و نسبة 46% على المستوى البروتيني. أشار تحليل تعبير كلتا مورثتي GST tau1 و GST tau2 عن طريق سلسلة تفاعل البلورة نصف الكمي بعد ارتفاع تركيز الأنتيمون في وسط الزرع إلى أن تعبير GST tau 1 يكون في أقصاه في وجود تراكيز صغيرة للأنتيمون في كلتي النوعين. أما GST tau2 يكون أكثر تعبيراً في نوع المناجم و يزيد تعبيره كلما زاد تركيز الأنتيمون. هذا ما يسمح بأن نستخلص أن كل GST tau خاص بمفاعل و GST tau 2 يقدم موقعا نشطا H خاصا بالارتباط بالأنتيمون. هذا الأخير يشارك أيضا في تنشيط تعبير المورثة الذي يتكاثف بارتفاع تركيز الأنتيمون.

سمحت نتائج أنشطة GST و تحليل تعبير مورثتي الـ GST tau لـ *H. pallidum* باستنتاج أنه في غياب الإجهاد المعدني تكون جميع GST نشطة لكن بكميات قليلة. أما في وجود الإجهاد المعدني فإن فقط الـ GST tau التي تحمل موقعا نشطا للارتباط بالمعدن تكون نشطة.

الكلمات المفتاحية: أنزيمات، الإجهاد المعدني، *Hedysarum pallidum*، *Lygeum spartum* L، أنتيمون، الزرنيخ، تعبير المورثات.

Abstract:

The aim of this study is to evaluate the oxidative stress' level and antioxidant defense systems of plants growing in antimony (Sb) and arsenic (As) contaminated soil, and to analyze the expression of GST genes. For this, two species *Hedysarum pallidum* Desf. and *Lygeum spartum* L. were collected from different areas around an old mine of antimony located in Jebel Hamimat (Algeria), according to a concentration gradient of Sb and As in soil, and act as the subject of analysis related to the oxidative stress markers (malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase (POD), ascorbate peroxidase (APX) and glutathione-S-transferase (GST)). Both species accumulate differently Sb and As in their aerial and underground parts.

The results show that the oxidative stress level indicator, the MDA, in both plants, increases significantly with increasing concentrations of Sb and As in the soil, although it is significantly higher in *H. pallidum*. The activities of antioxidant enzymes vary from plant to plant and also from one zone to another. The activities of SOD, APX and GST are the highest in the most polluted zone in the two parts of *H. pallidum*. The inhibition of CAT activity in *H. pallidum* roots, in all the contaminated zones, is concomitant with the induction of POD activity in the same tissue. In *L. spartum* the APX of the upper parts, the CAT and the GST of the upper parts and the roots are increased to the maximum at zone 5 (the most polluted zone). However, the activities' decline of SOD and POD in the tissues due to the high concentrations of Sb and As on the soil, was also observed.. These results suggest that MDA can be used as a potential soil pollution biomarker by Sb and As for both plants.

Seeds In-vitro culture of two populations of *H. pallidum* has allowed the cloning and sequencing of three fragments of actin gene and two of GST tau. The percent identity between the two genes of GST (tau1 et tau2) is 53% at the nucleotide level and 46% at the protein level. The analysis of the expression of the two genes by semi-quantitative PCR, in response to increasing concentrations of Sb in the breeding ground, shows that the expression of GST tau1 is at its maximum with low concentrations of Sb for the two populations. GST tau2 concentration is more expressed in the population of spoil mine and its expression becomes more important when the concentration of Sb increases. This allows to deduce that every GST tau is specific to a substrate and also that GST tau2 has a specific H domain linked to antimony. This metalloid participates in activation of gene expression that intensifies with increasing concentration.

The results of the GST and the analysis of the expression of both genes of GST tau in *H. pallidum* show that all GST are expressed at low quantities in the absence of the metal stress. In the metal stress moment, only the GST tau having a specific domain for binding to the metal are overexpressed.

Key words: Enzymes, oxydatif stress, *Hedysarum pallidum* Desf, *Lygeum spartum* L, antimony, arsenic, GST, genes expression.

Résumé :

Le but de cette étude est d'évaluer le niveau du stress oxydatif et les systèmes de défense antioxydants des plantes poussant sur des sols contaminés par l'antimoine (Sb) et l'arsenic (As) ainsi que d'analyser l'expression des gènes de la GST. Pour cela, deux espèces, *Hedysarum pallidum* Desf. et *Lygeum spartum* L. ont été prélevées à partir de différentes zones des alentours d'une ancienne mine d'antimoine sise à Djebel Hamimat (Algérie), selon un gradient de concentration en Sb et en As dans le sol, et fait l'objet de l'analyse des marqueurs de stress oxydatif (le malondialdéhyde (MDA), la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT), la peroxydase (POD), l'ascorbate peroxydase (APX) et de la glutathion-S-transférase (GST)). Les deux espèces accumulent différemment le Sb et l'As dans leurs parties aériennes et souterraines.

Les résultats montrent que l'indicateur du niveau de stress oxydant, le MDA, augmente chez les deux plantes de manière significative avec l'augmentation des concentrations du Sb et de l'As dans le sol, mais, il est nettement supérieur chez *H. pallidum*. Les activités des enzymes antioxydantes varient d'une plante à l'autre et d'une zone à une autre. Les activités de SOD, APX et GST sont maximales dans la zone la plus polluée dans les deux parties de *H. pallidum*. L'inhibition de l'activité de la CAT dans les racines de *H. pallidum*, dans toutes les zones contaminées, est concomitante avec l'induction de l'activité de la POD dans le même tissu. Chez *L. spartum*, l'APX des parties supérieures, la CAT et la GST des parties supérieures et des racines, sont maximales dans la zone 5 (la plus polluée). Cependant, le déclin des activités des SOD et POD dans les tissus, suite à de fortes concentrations des sols en Sb et en As, a également été observé. Ces résultats suggèrent que le MDA peut être utilisé en tant que biomarqueur potentiel de la pollution des sols par le Sb et l'As pour les deux plantes.

La culture *in-vitro* de graines de deux populations d'*H. pallidum* a permis de réaliser le séquençage et le clonage de trois fragments de gènes d'actine et deux de la GST tau. Le pourcentage d'identité entre les deux gènes de la GST (tau1 et tau2) est de 53% au niveau nucléotidique et de 46% au niveau protéique. L'analyse de l'expression des deux gènes par la PCR semi quantitative, suite à des concentrations croissantes en Sb dans le milieu de culture, indique que l'expression de la GST tau1 est maximale en présence de faibles concentrations en Sb pour les deux populations. Celle de la GST tau2 est plus exprimée dans la population des déblais de mine et son expression devient plus importante lorsque la concentration en Sb augmente. Cela permet de déduire que chaque GST tau est spécifique à un substrat et que la GST tau2 présente un domaine H spécifique de liaison à l'antimoine. Ce métalloïde participe à l'activation de l'expression du gène qui s'intensifie avec l'augmentation de sa concentration.

Les résultats des activités de la GST ainsi que l'analyse de l'expression des deux gènes de GST tau chez *H. pallidum* permettent de déduire qu'en l'absence de stress métallique les GST sont toutes exprimées mais à de faibles quantités. Au moment du stress métallique seules les GST tau présentant un domaine spécifique pour la liaison au métal seront surexprimées.

Mots clés : Enzymes, stress oxydatif, *Hedysarum pallidum* Desf, *Lygeum spartum* L, antimoine, arsenic, GST, expression des gènes.

PUBLICATIONS

Effects of Antimony and Arsenic on Antioxidant Enzyme Activities of Two Steppic Plant Species in an Old Antimony Mining Area

Asma Benhamdi · Alima Bentellis · Oualida Rached ·
Gijs Du Laing · Aicha Mechakra

Received: 13 December 2013 / Accepted: 6 February 2014 / Published online: 22 February 2014
© Springer Science+Business Media New York 2014

Abstract The present work was undertaken to determine strategies and antioxidant enzyme activities involved in the adaptation of two wild steppic plants (*Hedysarum pallidum* Desf. and *Lygeum spartum* L.) to the toxic environment of the abandoned antimony mining area of Djebel Hamimat (Algeria). For this purpose, soils and plants were collected in different zones coinciding with a Sb and As concentrations gradient in the soil. Antimony (Sb) and arsenic (As) were analyzed by ICP-OES in the soils and the aboveground parts and roots of the plants. Malondialdehyde (MDA) and antioxidant enzyme activities were measured by spectrometry. Results show levels of Sb and As exceptionally high in most soil and plant samples. The two species accumulate differently Sb and As in their above and belowground parts. MDA levels, in the two parts of both species, increase significantly with increasing soil Sb and As concentrations, but they are significantly higher in *H. pallidum* than in *L. spartum*. The activities of antioxidant enzymes differ significantly according to the soil metalloid concentrations, the plant species considered and the plant part. Apart from superoxide dismutase (SOD) whose activity is, overall, higher in *H. pallidum* than in *L. spartum*, the activities of all the other enzymes studied (glutathione S-transferase (GST), catalase (CAT), peroxidase (POD), and

ascorbate peroxidase (APX)) are generally higher in *L. spartum* than in *H. pallidum*. For both species, APX and GST are overall more active in the upper parts than in the roots, while it is the reverse for SOD and CAT. POD is more active in the upper parts than in the roots of *L. spartum* and the reverse applies to *H. pallidum*. It appears that the two studied plant species use different tolerance strategies to protect themselves against elevated As and Sb concentrations.

Keywords *Hedysarum pallidum* Desf. · *Lygeum spartum* L. · Metalloids accumulation · Lipid peroxidation · Semiarid climate · Calcareous soil · ANOVA

Introduction

Environmental pollution by heavy metals and metalloids is an increasing problem. The main sources of this pollution are human activities such as mining and smelting of mineral ores [1, 2]. According to [1], among the metalloid pollutants, antimony (Sb) and arsenic (As) are of major concern.

The European Union and the US Environmental Protection Agency have considered that antimony, like arsenic, is one of the pollutants that should deserve a priority interest because it is considered to be hazardous to human health and even carcinogenic [3, 4].

When plants are exposed to high levels of heavy metals, oxidative stress is induced causing a cascade of reactions which damage cell membranes, nucleic acids, and chloroplast pigments. To protect themselves against this stress, plants produce enzymatic antioxidants as well as non-enzymatic compounds [5]. The maintenance of a high antioxidant capacity in cells increases tolerance against different types of environmental stress. Some experimental studies have described the role of cell antioxidant defense mechanism against Sb or As in higher plants [6, 7]. However, there are no reports of

A. Benhamdi · O. Rached (✉) · A. Mechakra
Biology and Environment Laboratory, Faculty of Nature and Life
Sciences, University Constantine 1, Road Ain El Bey, Constantine,
Algeria
e-mail: oualida.rached@hotmail.fr

A. Bentellis
Biotechnology High National School, Nouvelle ville Ali Mendjelli,
Constantine, Algeria

G. Du Laing
Laboratory of Analytical Chemistry and Applied Ecochemistry,
Faculty of Bioscience Engineering, Ghent University, Coupure Links
653, 9000 Ghent, Belgium

studies performed under natural conditions, in field, on the effects of both antimony and arsenic on plant antioxidant responses.

A study previously performed on plant communities [8] in an abandoned antimony mine (north-east of Algerian), highlighted very high Sb levels (from 9 to 22, 650 mg/kg) in soils surrounding mine spoils which had resulted in modifications into the spontaneous vegetation. It appeared that a number of plant species were able to grow and survive on the most polluted soils by antimony. Analysis of aboveground parts of a few of these plant species showed that some of them were able to grow on the most polluted soils by restricting Sb uptake, while others were not able to prevent its accumulation in their upper parts [9]. Among these species, *Hedysarum pallidum* Desf., a Fabaceae, concentrated up to 53 mg/kg of Sb in its upper parts, and *Lygeum spartum* L., a Poaceae, did not exceed 17.5 mg/kg of Sb. When the study was performed, mine spoils, being almost free of vegetation, were avoided and the plant species were sampled mainly on soils surrounding them. In the present study, at first, arsenic being known to be often associated to antimony [1], As and Sb were analyzed in many soil samples covering a wider area than in the previous study. Then, to determine the Sb and As accumulation levels reached by the plants targeted and their toxics translocation mode, the plant aboveground parts and roots were sampled in the most polluted zones, particularly on the mine spoils. Finally, to analyze the antioxidant enzyme activities, the plant species were sampled in different soil pollution classes. It is hypothesized that both species are able to accumulate not only arsenic but also larger amounts of antimony than those previously determined and that they would have developed differently strategies in their Sb and As uptake mode and in their antioxidant defense system, to adapt to the toxic environment. Another Hypotheses is that the high soil Sb and As concentrations would play a dominant role, in comparison to the other environment variables, in the induction of plant oxidative stress and antioxidant responses. Their action would be comparable to that obtained for other plants, with the same metalloids or other trace elements, by other researchers, in experimental conditions.

Materials and Methods

Site Description

The study area, a 60-year-old abandoned open-sky antimony mine, is located in the north-east of Algeria (35° 58' 37, 64"N–7° 11' 22, 80" E to 36° 01' 09, 78" N–7° 14' 38, 38" E). The mine is on the slope of a mountain (Djebel Hamimat) with an average altitude of 865 m. The climate is semiarid Mediterranean with a fresh winter. The average annual air temperature is 14.3 °C, and the annual total precipitation is

on average of 435 mm, with the rainfall season from November to April. Soils are of xerochrept type. They are sparsely covered with a steppe.

Soil Sampling and Analyses

In the studied area, lodes and spoils are located on the Djebel Hamimat slopes where the Dahimine River source is located. This river is the principal cause of the pollution [9, 10]. Five sampling zones were selected on and around the mine spoils and away from the mine along the river banks. During sampling, a gradient of As and Sb pollution levels was targeted, taking data from previous samplings into account. In each zone, seven soil samples were randomly collected within a depth of 15–20 cm from the surface.

Soils were air-dried and sieved to <2 mm prior to analysis. Organic matter (OM) was analyzed by dichromate oxidation and titration with ferrous ammonium sulfate [11]. Total CaCO₃ was determined using a Bernard calcimeter. Soil pH (H₂O) was determined in a 1:2.5 soil water to suspension (w/v) [12]. Particle size analyses were conducted following oxidation of organic matter with hydrogen peroxide, dispersion with sodium hexametaphosphate, and stirring for 16 h. Silt and clay fractions were determined using the Robinson pipette method [13], and sand was separated by sieving (>50 μ).

To determine the soil total Sb and As concentrations, 0.5 g of each sample was digested in 10 ml of aqua regia using a MWS-Berghof microwave. The digests were analyzed by inductively coupled plasma optical emission spectrometer (ICP-OES Vista MPX CCD, Varian, Palo Alto, CA, USA) in the laboratory of Analytical Chemistry and Applied Ecochemistry, Ghent University (Belgium). The accuracy of the method was checked by analyzing six replicates of standard reference material CRM052-050 (trace metals—loamy clay 1) (RTC, USA).

Plant Sampling and Metalloid Analyses

Twenty specimens of *H. pallidum* and *L. spartum* were randomly sampled in the three most polluted zones on and nearby the mining spoils. Plants were washed, roots and aboveground plant parts were separated, oven-dried at 80 °C for 24 h, and crushed in a marble ceramic mill. Sb and As were extracted by digesting 0.2 g of dried plant material in 5 ml of pure nitric acid using a MWS-Berghof microwave. The digests were analyzed by inductively coupled plasma optical emission spectrometer (ICP-OES Vista MPX CCD, Varian, Palo Alto, CA, USA) in the laboratory of Analytical Chemistry and Applied Ecochemistry, Ghent University (Belgium). The accuracy of the method was checked by analyzing three replicates of standard reference material INCT-OBTL-5 (oriental basma tobacco leaves) (Institut Chemii I Techniki Jadrowej, Poland).

Biochemical Analyses

According to the results of soil analysis, zones (Z1, Z2, Z3, Z4, and Z5) were arranged according to the concentration gradient of Sb and As in the soil (Table 1). In each studied zone (Table 1), roots and aboveground plant parts of six specimens of *H. pallidum* and *L. spartum* were randomly and separately collected for biochemical analysis.

MDA Contents

The level of lipid peroxidation was determined using the method of Kosugi and Kikugawa [14]. Of the fresh plant sample, 0.2 g was homogenized with 5 mL of solution containing 20 % trichloroacetic acid (TCA) and 0.5 % thiobarbituric acid (TBA). The mixture was incubated at 95 °C for 30 min, and the reaction was stopped by immersing the tubes in ice. The non-specific absorbance at 600 nm was subtracted from the absorbance at 532 nm, and the malondialdehyde (MDA) concentration was determined using its molar extinction coefficient $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Antioxidant Enzyme Activities

Plant tissues (0.5 g) were ground to a fine powder with a mortar and crushed under nitrogen liquid. The proteins were then extracted at 4 °C with 3 ml of cold 50 mM potassium phosphate (pH 7.6) buffer containing 0.1 % triton X-100 (v/v) and 1 % polyvinylpyrrolidone (PVPP) (w/v). The homogenate was centrifuged at 4 °C for 15 min at $12,000 \times g$, and the supernatant was used for the enzymatic assays. Proteins concentrations were quantified according to the Lowry method

[15] using BSA as a standard protein. Total superoxide dismutase (SOD) activity (EC.1.15.1.1) was measured according to its ability to inhibit the autoxidation of pyrogallol at 420 nm [16]. One unit of SOD is described as the amount of enzyme required to cause 50 % inhibition of pyrogallol autoxidation. Catalase (CAT) activity (EC.1.11.1.6) was assayed according to Chance and Maehly [17]; the decomposition of hydrogen peroxide was determined by its absorbance decrease at 240 nm ($\epsilon=39.4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) [18]. Peroxidase (POD) activity (EC.1.11.1.7) was quantified by the method of Chance and Maehly [19]; the purpurogalline formed between H_2O_2 and pyrogallol was measured at 420 nm, and the enzyme activity was expressed with $0.1 \text{ absorbance min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ protein}$ as unit. Ascorbate peroxidase (APX) activity (EC.1.11.1.11) was determined according to Nakano and Asada [20] by measuring the decrease in absorbance of oxidized ascorbate at 290 nm ($\epsilon=2.8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Glutathione S-transferase (GST) activity (EC.2.5.1.18) was assayed according to Habig and Jakoby [21] by monitoring the increase in absorbance due to the formation of the conjugate S-2,4-dinitrophenylglutathione at 340 nm ($\epsilon=9.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Statistical Analysis

Data of each zone ($n \geq 6$) are presented as means \pm SEM. Normality was tested using the Kolmogorov–Smirnov test at $p < 0.05$ level [22]. Three-way analysis of variance (ANOVA) was employed to determine the differences between the pollution zones (zone effect), the two species (species effect), and the two plant parts (part effect) in terms of plant antioxidative enzymes. It was also used to check the interaction between these three effects. One-way ANOVA was performed in order

Table 1 Physico-chemical properties of soils in the studied zones

	Zone (Z1)	Zone 2 (Z2)	Zone 3 (Z3)	Zone 4 (Z4)	Zone 5 (Z5)
Sb (mg/kg)	2.0 \pm 0.2c [1.0–3.2]	344 \pm 41c [200–530]	2,800 \pm 417c [1,099–4,104]	12,600 \pm 1970b [6,220–18,991]	62,000 \pm 4924a [41,590–81,446]
As (mg/kg)	14 \pm 2c [8–22]	170 \pm 15c [120–240]	350 \pm 27bc [249–450]	670 \pm 72b [432–949]	2,300 \pm 186a [1,556–3,080]
OM (%)	0.9 \pm 0.15a [0.32–1.64]	0.7 \pm 0.08a [0.33–1.08]	0.9 \pm 0.15a [0.45–1.8]	0.8 \pm 0.04a [0.55–0.86]	0.9 \pm 0.04a [0.69–1.1]
pH	7.81 \pm 0.03c [7.7–7.9]	7.80 \pm 0.07c [7.6–8.1]	8.17 \pm 0.08ab [7.8–8.4]	8.37 \pm 0.05a [8.2–8.6]	8.01 \pm 0.09bc [7.8–8.5]
Ca CO ₃ (%)	13.0 \pm 0.49c [6.75–14.59]	18.2 \pm 0.34bc [16.69–19.46]	19.6 \pm 1.67b [15.7–28.41]	39.7 \pm 1.70a [33.27–44.11]	38.7 \pm 1.82a [33.5–48.22]
Clay (%)	22.0 \pm 1.52b [15.6–27.04]	16.3 \pm 0.98b [11.79–19.41]	23.7 \pm 2.65b [14.21–31.88]	41.9 \pm 5.1a [33.42–49.22]	23.0 \pm 4.9b [16.88–30.5]
Silt (%)	42.1 \pm 1.55a [37.57–49.54]	30.4 \pm 1.63b [23.17–35.22]	26.9 \pm 2.80b [15.75–36.9]	30.6 \pm 4.90b [23.75–39.03]	16.3 \pm 1.02c [13.73–20.3]
Sand (%)	32.3 \pm 1.97b [25.6–38.73]	51.0 \pm 2.12a [45.27–62.00]	44.9 \pm 1.78a [39.51–51.14]	22 \pm 3.67b [10.42–36.43]	53.7 \pm 3.22a [45.31–63.67]

Values are presented as means \pm SEM of seven replicates. For each variable, different letters denote statistical differences between the corresponding zones (using ANOVA followed by Tukey test. $p < 0.05$)

to compare the different pollution zones in terms of their physico-chemical properties and the plant parts in term of their metalloid concentrations. Statistical analysis was carried out using the STATISTICA (version 6.0) software package.

Results

Soil Physico-Chemical Properties and Pollutant Concentrations

High disparities of Sb and As levels are observed (Table 1), with concentrations varying from 1 to 81,500 mg/kg for Sb and from 10 to 3,000 mg/kg for As. Organic matter (OM) levels are low and homogenous throughout the five zones with mean values comprised between 0.7 and 1.0. Some variations are observed for CaCO₃, clay, silt, and sand contents, but no general trends could be delineated. The clay content of zone 4 is significantly higher than that of the other zones, while soils in these ones (zone 5 included) have similar amounts of clay. Soil CaCO₃ quantities are very high and characterize highly calcareous soils, especially in zones 4 and 5. Mean values of soil pH, comprised between 7.8 and 8.37, indicate slightly alkaline to mildly alkaline soils and overall, follow soil metalloid contents.

While in zone 1 total contents of As and Sb are below the thresholds imposed by the majority of countries for agricultural soils, the total contents of antimony and arsenic in the soil samples of zones 2, 3, 4, and 5 (Table 1) are all above the maximum allowable concentrations in agricultural soils imposed by various countries (10 mg/kg for Sb and from 2 to 50 mg/kg for As) [23]. Thus zone 1 can be considered as a control. In the other zones, Sb levels are generally above those recorded for any other antimony mining areas by Wilson et al. [24]. The ratio of total Sb in zones 2, 3, 4, and 5 to that in zone 1 is in average 170, 1,400, 6,300, and 31,000, respectively.

Plant Sb and As Accumulation

Sb concentrations determined in both plant parts of both species (Table 2) are above the normal range (0.1–200 µg/kg) of plant Sb contents given by Markert [25]. Arsenic concentrations are higher than the normal range (0.01–1.5 mg/kg) in the majority of specimens of both species. The Sb maximums are largely higher than those found in the same species and in the same area reported by Rached-Mosbah et al. [9]. They are above those determined by Pratas et al. [26] and Qi et al. [27] in mine areas of Portugal and China, respectively.

It appears (Table 2) that *H. pallidum* accumulates Sb more than *L. spartum* in the aboveground plant parts as well as in the roots. This is also the case for As in the aboveground parts. *L. spartum* accumulates more As in the roots. However, while *H. pallidum* accumulates Sb slightly, but not significantly,

more in its upper parts than in its roots and As significantly more in its roots than in its aboveground parts, *L. spartum* accumulates the two metalloids significantly more in its roots than in its upper parts. The transfer factor (Table 2) shows that Sb and As transfer from the roots to the upper parts is significantly ($p < 0.0001$) higher in *H. pallidum* than in *L. spartum*.

MDA Contents

In both plant species, MDA contents increase very significantly with increasing soil Sb and As concentrations in the different sampling zones (Table 3, Fig. 1a). MDA contents are significantly higher in *H. pallidum* than in *L. spartum*, especially in the zones 3, 4, and 5, whatever the plant part. Overall, both species produce significantly more MDA in their upper parts than in their underground parts (Fig. 1a).

Antioxidant Enzyme Activities

The activities of all studied antioxidant enzymes differ very significantly between *H. pallidum* and *L. spartum*, whatever the plant part and sampling zone considered (Fig. 1, Table 3). Indeed, apart from the SOD whose activity is, overall, higher in *H. pallidum* than in *L. spartum*, the activities of all other enzymes are generally higher in *L. spartum* than in *H. pallidum*. Very significant variations of all antioxidant enzyme activities can be observed between the different zones and plant parts for both plant species. However, the extent of variation is different between both species. This is corroborated by the ANOVA, which highlights a very significant species \times zones interaction for all enzymes activities (Table 3).

The activities of POD, APX, and GST in *H. pallidum* increase steadily with increasing soil Sb and As concentrations. This is not the case for activities of these enzymes in *L. spartum* and for SOD and CAT in both species, which increase very irregularly with increasing soil metalloid concentrations. Indeed, the maximum increase of SOD and POD activities, in both plant parts, is recorded in zone 5 for *H. pallidum* and in zone 3 for *L. spartum* (Fig. 1).

Figure 1 also highlights that all enzyme activities in both plant parts differ distinctly between the species. The ANOVA (Table 3) confirmed a very significant interaction between species and plant parts for all the enzymes.

For both species, the APX and the GST are overall more active in the upper parts than in the roots, while it is the reverse for SOD and CAT. POD is more active in the upper parts than in the roots of *L. spartum* and the reverse applies to *H. pallidum*. However, these differences change according to the species and the zones. The ANOVA (Table 3) confirmed a very significant interaction between species, plant parts, and zones for all enzymes.

Indeed, the SOD activity is significantly higher in the roots than in the upper parts of *H. pallidum*, in zone 5, and of

Table 2 Antimony (Sb) and As bioconcentration (mg.kg⁻¹) in *H. pallidum* and *L. spartum* parts

Plants	Sb			As		
	Roots	Upper parts	TF	Roots	Upper parts	TF
<i>H. pallidum</i>	90.02±11.48 [20.86–182.94]	72.20±16.80 [4.05–263.04]	1.21±0.31a [0.053–4.94]	27.00±7.37 [1.95–116.74]	10.75±2.67b [1.02–46.28]	0.86±0.24a [0.195–4.42]
<i>L. spartum</i>	61.04±8.10 [11.06–126.18]	18.58±3.53b [1.79–54.49]	0.34±0.055 [0.077–0.94]	71.66±29.36 [4–611.01]	5.58±2.39b [0.11–49.78]	0.15±0.04 [0.002–0.84]

Results are the mean±SEM of 20 specimens. In brackets are the minimum and maximum

TF transfer factor: the ratio between the As or Sb concentration of the upper parts to that of the roots

^a Statistically different compared to *L. spartum*

^b Statistically different compared to the roots for each plant

L. spartum in zone 3. It does not differ a lot between both parts of both species in the other zones. The CAT activity is also significantly higher in the roots than in the upper parts of both species in all zones, except in zone 1 (control) for *L. spartum*. However, it decreases in *H. pallidum* roots with the increase of pollution levels, while it increases in the roots of *L. spartum*. In the aboveground parts of both plants, the CAT activity is lower in zones 2, 3, and 4, compared to the control, but it increases and exceeds the control in zone 5.

The POD activity is significantly higher in the aboveground parts of *L. spartum* compared to its roots in all zones, except in zone 3, where it is alike. On the contrary, this enzyme exhibits a more important activity in *H. pallidum*'s roots than in its upper parts, especially in zone 5 where it is significantly higher than the control (Fig. 1). However, no significant changes are noted in the POD activity in the *H. pallidum*'s upper parts. In *L. spartum* tissues, the highest values are observed in zone 3 for both plant parts.

With respect to the APX and GST activities, the differences between the two parts of *L. spartum* are significantly more important than between those of *H. Hedysarum*, especially in the most polluted zones (4 and 5). The variation of APX activity was more obvious in *H. pallidum*. It increased with increasing Sb and As soil concentrations in both parts of *H. pallidum*. However, in *L. spartum*, the APX activities in both parts decrease in zones 2, 3, and 4, compared to the

control, afterward increasing in zone 5, where APX activity in the upper part significantly exceeds the control while that of the roots remains below the control. GST activity is induced at high level of soil metalloid concentrations in both plants (Fig. 1). It decreases in both plant parts in zone 2 for *H. pallidum* and in zone 3 for *L. spartum*, and it afterward increases again to exceed the control significantly in zone 5 for both plant parts of both species. However, GST of *L. spartum* roots at zone 5 remains significantly less active than that of *H. pallidum*.

Discussion

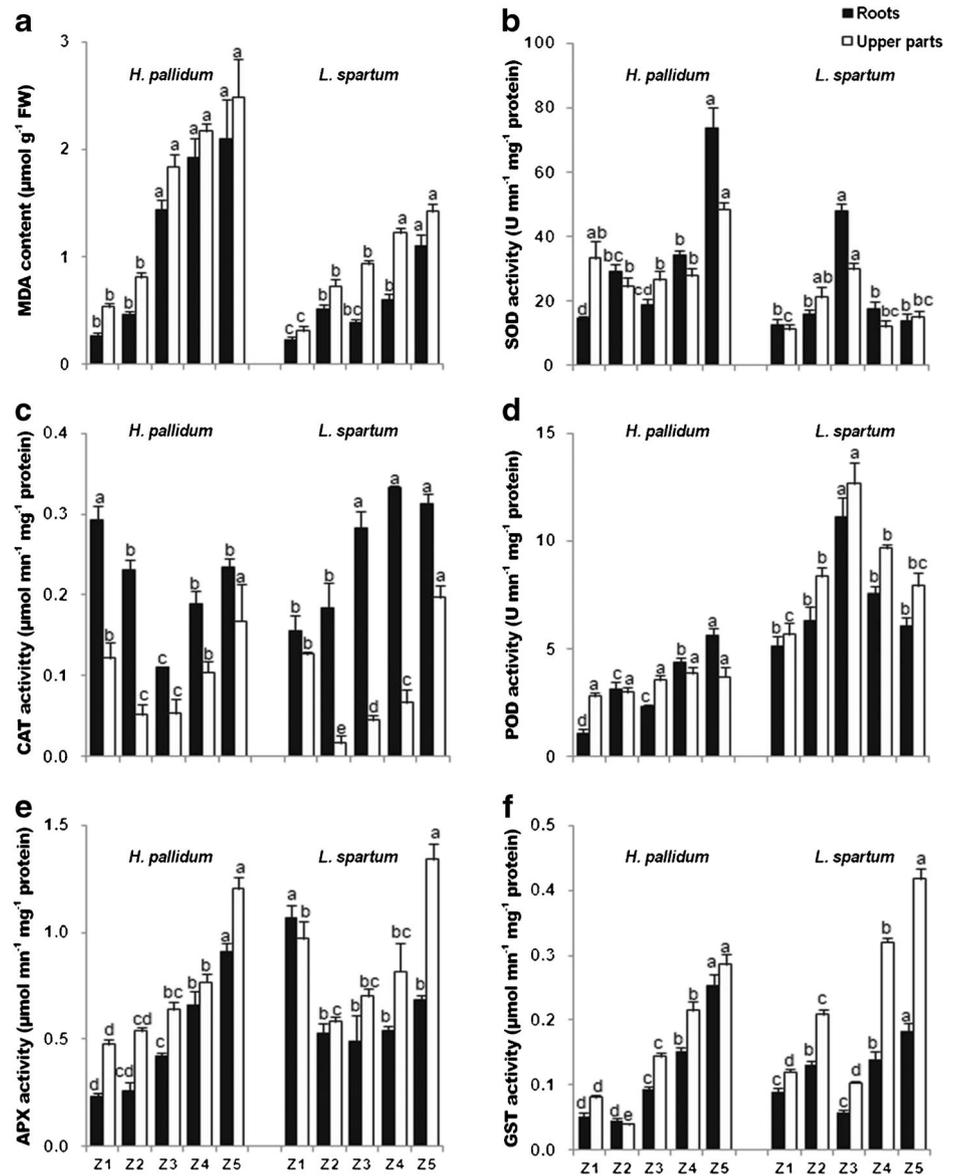
Clay, OM, and pH play an important role in determining the Sb and As solubility in soils [24]. The more clay and OM a soil contains, the lower the mobility and bioavailability of Sb and As will be. Both metalloids are more soluble in alkaline and oxidizing environments than in acid and reducing environments [24]. In the studied soils, the pH is alkaline and the environment is supposed to be oxidizing due to the fact that soils in a semiarid area are usually well aerated, resulting in high redox potentials of approximately 700 mV [28]. Shi et al. [29] and Ali et al. [30] previously demonstrated that variation in soil pH may lead to variation in plant metal uptake, inducing variation in oxidative stress, via lipid peroxidation, thus

Table 3 Three-way ANOVA (factors: zones, species, and parts) for MDA and antioxidant enzyme activities

Source	d.f.	MDA	SOD	CAT	POD	APX	GST
Zone (A)	4	50.2***	30***	59.06***	34.29***	51.13***	336.41***
Specie (B)	1	75.1***	111.8***	10**	489.12***	37.78***	94.76***
Parts (C)	1	18.9***	4.9*	25.87***	16.04***	72.16***	303.78***
A×B	4	10.21**	61.3***	33***	28.19***	24.46***	39.49***
A×C	4	0.81 ns	8.4***	36.56***	1.28 ns	6.48***	28.19***
B×C	1	0.51 ns	0.04 ns	722.94***	13.26***	0.017 ns	90.35***
A×B×C	4	0.66 ns	16.27***	12.65***	4.49**	5.77***	20.70***

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

Fig. 1 Biochemical responses in the upper parts and the roots of two plants species (*H. pallidum* and *L. spartum*) collected in the old antimony mining area of Djebel Hamimat. Zones (Z1, Z2, Z3, Z4, and Z5) are ranked according to increasing Sb and As concentrations in the soils. Zone 1 is considered as control. The MDA levels (a) and the activities of SOD (b), CAT (c), POD (d), APX (e), and GST (f) were measured, respectively. Values represent means \pm SEM ($N=6$). Different letters discriminate statistical differences between the corresponding zones for the same plant part (using ANOVA followed by HSD test from Tukey, $p<0.05$)



variation in antioxidant enzyme activities. In the case of the studied zones, the pH increase, at the same time as the metalloid total concentrations, suggests that there will be an increase in the metalloid solubility and therefore in their uptake by the plants. In the studied soils, the OM amounts do not differ significantly between the zones. Accordingly, it can be assumed that this soil property would not induce any differences in enzyme activities and lipid peroxidation levels between the different sampling zones. The higher clay content in zone 4 does not seem to have induced a lower solubility, availability, and toxicity of soil Sb and As, compared to zones 3 and 2. The discrepancies observed for CaCO_3 amounts is not supposed to have a high impact since the levels are high in all zones. Moreover, since the variation of MDA contents in both species follows exactly that of the soil Sb and As concentrations between the different zones, observed differences in the

biochemical parameters can be assigned mainly to the variation of Sb and As soil concentrations in the different zones and not to the other environmental variables.

The increase in MDA contents of the two plants (*H. pallidum* and *L. spartum*), as a function of the soil Sb and As contents, shows that there was an increase of the lipid peroxidation and thus of the oxidative stress induced by the two metalloids, through the generation of reactive oxygen species like H_2O_2 , O_2^- , OH^- . These findings are in agreement with previous results reported for other heavy metals [31].

The high level of MDA was expected because the Sb and As contents of the two plant specimens collected in the most polluted zones are very high.

MDA contents higher in both parts of *H. pallidum* than in those of *L. spartum* indicate a higher degree of oxidative stress and cellular damage in *H. pallidum* than in *L. spartum*. This

may be due to the fact that the latter accumulates less Sb and As in its tissues than *H. pallidum* and produces more antioxidant enzymes to reduce the oxidative stress. Indeed, the activities of the studied enzymes are, apart from SOD, overall higher in *L. spartum* than in *H. pallidum*. This is especially the case for POD, the enzyme responsible for the degradation of lipid peroxides.

The aboveground parts and roots of *H. pallidum* exhibit the highest increase in SOD and APX activities in the most polluted zone (zone 5). APX activity increases significantly with the increase of the metalloid concentrations as well as with the MDA contents. Consequently, it appears that the more the amounts of soil Sb and As increase, the more *H. pallidum* becomes stressed and activates APX to protect itself against oxidative damage. Enhanced activity of APX may efficiently scavenge H_2O_2 which is a strong oxidant. Moreover, SOD and APX of the same species show, in general, simultaneous activities which may be due to their coregulation. Our findings on SOD and APX activities are in agreement with the findings of earlier studies focused on other plant species, like those focused on rice seedling roots exposed to As stress [32].

In both parts of *L. spartum*, the similar responses of the O_2^- and H_2O_2 -scavenging enzymes (SOD and POD, respectively) are possibly due to the fact that the H_2O_2 generated by SOD is probably degraded by POD. Indeed, according to Khan et al. [33], the SOD catalyzes the dismutation of the superoxide radical to H_2O_2 while POD consumes H_2O_2 .

Therefore, these two enzymes could undergo a coregulation. However, the decrease observed in the SOD and POD levels in the highly contaminated zones (zones 4 and 5) compared to the zone 3 might be attributed to the cytotoxic effects and enzyme damages caused by excessive cellular H_2O_2 and excessive superoxide radical, induced by excess presence of the metalloids in this species. Indeed, it is demonstrated that the excess of superoxide radical disturbed the signal transduction and triggered the genes responsible for antioxidant enzymes like SOD [34] or lead to the formation of protein complexes with metals causing structure or integrity changes of proteins like POD [35].

The highest levels of GST activity for both plant parts found in the two most polluted zones and whose variation is similar to that of the MDA, could be explained by the fact that the higher the soil metalloid concentrations, the more both plants become stressed and the more GST is activated to fight against toxicity induced by the metalloids. Indeed, glutathione S-transferase (GST) is an enzyme that aids in detoxification. GSTs act by catalyzing the conjugation of reduced glutathione (GSH) with electrophilic, often hydrophobic toxic compounds, to form derivatives that can be secreted from the cell, sequestered in the vacuole, or catabolized [36].

The lower GST activity in both parts of *H. pallidum* and *L. spartum* in zones 2 and 3, respectively, may be due to

upregulation of GST or inactivation of some GST isoenzymes different from those involved in the other zones. This may also be the case for CAT in the aboveground plant parts, since it have the same kind of response that of the GST. Other authors have reported observations in favor of this hypothesis. Indeed, the existence of some GST isozymes in rice seedlings not exposed to Cd (cadmium) has been reported. Some of these GST isozymes were found to be inactivated by Cd exposure [37]. However, our assumptions about the existence of GST and CAT isozymes need to be verified by further studies.

Translocation of Sb from the roots to the aboveground parts of *L. spartum* may be limited by its precipitation on the root membrane barriers that control transport of metals to the leaves, suggesting existence of an exclusion mechanism pronounced in *L. spartum*, as it has been demonstrated for other plants [38, 39].

Nevertheless, the two species produce more MDA in their aboveground parts than in their roots, but the difference between the MDA of both plant parts is not more pronounced in *H. pallidum* than in *L. spartum*. Therefore, for both species, the uptake of the metalloids seems to lead to a greater toxicity in the upper parts than in the roots. Our results are in agreement with those reported by [40] who found that MDA is more important in the leaf than in the root of wheat seedlings under lead treatment. Shri et al. [32] concluded that the difference in translocation pathways between the upper parts and roots might involve differences in the transporters, antioxidant systems, and sequestration mechanisms.

Enzymes such as POD and CAT that catalyze the conversion of H_2O_2 into water appeared to be differentially regulated in the two parts of *H. pallidum*. In its roots, the inhibition of CAT activity is concomitant with the activation of POD, but in its upper parts, the POD activity does not vary while that of CAT increased with increasing concentration of metalloids.

In the *L. spartum* roots, APX and CAT show opposite trends which might be due to differential protective mechanisms operating in these roots. However, in the aboveground parts of the same species, they exhibit similar response curves. Their activities increase at high concentrations of Sb and As in soils (zone 5) contrary to those of POD and SOD who decline in zone 5. Consequently, it seems that the APX/CAT pathway and SOD/POD pathway are two complementary ROS-scavenging systems in *L. spartum*.

Higher GST activity in the upper parts of *L. spartum* compared to that of its roots could explain the lower Sb and As levels in the upper parts compared to roots. Indeed, it has been pointed out above that GST plays a role in the xenobiotic secretion or catabolism. Thus, the more the GST is active, the less Sb and As the upper parts of *L. spartum* will contain. The low GST activity in the roots of this species could explain their high Sb concentrations and especially those of As. The small discrepancies between the GST activity of the aboveground

plants parts and the roots of *H. pallidum* induce little differences between them in the metalloid uptake.

In conclusion, the study shows significant differences between the two studied species, *H. pallidum* (a Fabacea) and *L. spartum* (a Poacea), not only in their ability to take up Sb and As but also in their response to the oxidative stress induced by the two metalloids. *L. spartum* seems to have adapted to the toxicity by restricting translocation of both metalloids toward its upper parts, while *H. pallidum* has adapted by tolerating them in high concentrations. Moreover, *L. spartum* contains higher levels of the majority of the antioxidant enzymes, suggesting that it has developed a better antioxidant defense system compared to *H. pallidum*. The antioxidant enzymes are activated differently, quantitatively and qualitatively, in the different species and their different plant parts. It appears that pollution, generated by high Sb and As concentrations, has a dominant impact, compared to the other environment variables, on the induction of the plants oxidative stress and antioxidant responses. The study, performed in natural environment, highlights also that plant lipid peroxidation and antioxidant responses to the metalloid stress occur, in general, in the same way as in experimental conditions.

Acknowledgement This work was supported by the the Algerian Ministry of Higher Education and Scientific Research. The authors are grateful to Ria Van Hulle, from the Laboratory of Analytical Chemistry and Applied Ecochemistry, Ghent University, for the technical assistance provided in performing the metalloids analysis and to Prof. Pierre Berthomieu (Biochimie et Physiologie Moléculaire des Plantes, Montpellier, SupAgro, France), for his valuable assistance in preparing of our article.

Conflict of Interest No potential conflict of interest or financial disclosure for all authors. All persons gave their informed consent prior to their inclusion in the study.

References

- Clemente R (2013) Antimony. In: Alloway BJ (ed) Heavy metals in soils, trace metals and metalloids in soils and their bioavailability, 3rd edn. Springer, Dordrecht, pp 494–506
- Damian F, Damian G, Lacatusu R, Macovei G, Iepure G, Naprdean I, Chira R, Kollar L, Rata L, Zaharia DC (2008) Soils from the Baia mare zone and the heavy metals pollution. Carpath J Earth Env 3: 85–98
- USEPA (United States Environmental Protection Agency) (1998) Integrated risk information system (IRIS): arsenic, inorganic, Cincinnati, CASRN 7440-38-2
- Council of the European Communities (1976) Council Directive 76/464/EEC of 4 May 1976 on pollution caused by certain dangerous substances discharged into the aquatic environment of the community. Official Journal L 129:23–29
- Somashekaraiah BV, Padmaja K, Prasad ARK (1992) Phytotoxicity of cadmium ions on germinated seedlings of mung bean (*Phaseolus vulgaris*): involvement of lipid peroxide in chlorophyll degradation. Plant Physiol 85:85–89
- Pan X, Zhang D, Chen X, Bao A, Li L (2011) Antimony accumulation, growth performance, antioxidant defence system and photosynthesis of *Zea mays* in response to antimony pollution in soil. Water Air Soil Pollut 215:517–523
- Feng R, Wei C, Tu S, Wu F, Wang L (2009) antimony accumulation and antioxidative responses in four fern plants. Plant Soil 317:93–101
- Rached-Mosbah O, Gardou C (1988) Relation sols-plantes dans des zones pastorales à substrat riche en antimoine :exemple du Djebel Hamimat (Algérie). Colloque Phytosociologique XVI : Phytosociologie et pastoralisme. Paris 307–320
- Rached-Mosbah O, Gardou C, Pauwels JM (1992) Accumulation d'antimoine par les végétaux sur sol contaminé, en zone steppique. Bull Soc Bot Fr Actual Bot 139:133–139
- Sondag G (1980) Géochimie de surface des gîtes d'antimoine du Djebel Hamimat (sud-est du Constantinois, Algérie). Paris: C R Acad Sc 292(sér. II):65–68
- Walkley A, Black A (1974) A critical examination of rapid methods for determining organic carbon in soils. Soil Sci 63:251–254
- NF X31-103 (1988) Détermination du pH dans l'eau - Méthode électrométrique. In AFNOR (1998) Qualité des sols
- NF X31-107 (1983) Analyse granulométrique par sédimentation. Méthode de la pipette. In AFNOR (1998) Qualité des sols
- Kosugi H, Kikugawa K (1985) Thiobarbituric acid reaction of aldehydes and oxidized lipids in glacial acetic acid. Lipids 20:915–920
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem 193: 265–275
- Marklund S, Marklund G (1974) Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. Eur J Biochem 47:469–474
- Chance B, Machly AC (1955) Assay of catalases and peroxidases. Methods Enzymol 2:764–775
- Cakmak I, Marschner H (1992) Magnesium deficiency and high light intensity enhance activities of superoxide dismutase, ascorbate peroxidase, and glutathione reductase in bean leaves. Plant Physiol 98:1222–1227
- Chance B, Machly AC (1967) Methods of biochemical analysis In: Glick D (ed) Interscience Publishers Inc., New York
- Nakano Y, Asada K (1980) Spinach chloroplasts scavenge hydrogen peroxide on illumination. Plant Cell Physiol 21:1295–1307
- Habig WH, Jakoby WB (1981) Assays for differentiation of glutathione S-transferases. Methods Enzymol 77:398–405
- Lilliefors HW (1967) On the Kolmogorov–Smirnov test for normality with mean and variance unknown. J Am Stat Assoc 62:399–402
- Kabata-Pendias A, Pendias H (1985) Traces elements in soils and plants. CRC Press, Boca Raton
- Wilson SC, Lockwood PV, Ashley PM, Tighe M (2010) The chemistry and behaviour of antimony in the soil environment with comparisons to arsenic: a critical review. Environ Pollut 158:1169–1181
- Markert B (1992) Presence and significance of naturally occurring chemical elements of the periodic system in the plant organism and consequences for future investigations on inorganic environmental chemistry in ecosystems. Vegetatio 103:1–30
- Pratas J, Prasad MNV, Freitas H, Conde L (2005) Plants growing in abandoned mines of Portugal are useful for biogeochemical exploration of arsenic, antimony, tungsten and mine reclamation. J Geochem Explor 85:99–107
- Qi C, Wu F, Deng Q, Liu G, Mo C, Liu B, Zhu J (2011) Distribution and accumulation of antimony in plants in the super-large Sb deposit areas, China. Microchem J 97:44–51
- Lévy G, Toutain F (1979) Aération et phénomènes d'oxydo-réduction dans le sol. In: Duchaufour P, Souchier B (eds) Constituants et propriétés du sol. Pédologie, tome II. Masson, Paris
- Shi QH, Zhu ZJ, Li J, Qian QQ (2006) Combined effects of excess Mn and low pH on oxidative stress and antioxidant enzymes in cucumber roots. Agric Sci China 5:767–772

30. Ali S, Baib P, Zenga T, Caia S, Shamsia IH, Qiua B, Wua F, Zhanga G (2011) The ecotoxicological and interactive effects of chromium and aluminum on growth, oxidative damage and antioxidant enzymes on two barley genotypes differing in Al tolerance. *Environ Exp Bot* 70:185–191
31. Wahsha M, Bini C, Fontana S, Wahsha A, Zilioli D (2012) Toxicity assessment of contaminated soils from a mining area in Northeast Italy by using lipid peroxidation assay. *J Geochem Explor* 113:112–117
32. Shri M, Kumar S, Chakrabarty D, Trivedi PK, Mallick S, Misra P, Shukla D, Mishra S, Srivastava S, Tripathi RD, Tuli R (2009) Effect of arsenic on growth, oxidative stress, and antioxidant system in rice seedlings. *Ecotoxicol Environ Safe* 72:1102–1110
33. Khan I, Ahmad A, Iqbal M (2009) Modulation of antioxidant defense system for arsenic detoxification in Indian mustard. *Ecotoxicol Environ Safe* 72:626–634
34. Alvarez ME, Lamb C (1997) Oxidative burst-mediated defense responses in plant disease resistance. In: Scandalios JG (ed) *Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses*. Cold Spring Harbor Laboratory, Plainview
35. Hou W, Chen X, Song G, Wang Q, Chang CC (2007) Effects of copper and cadmium on heavy metal polluted waterbody restoration by duckweed (*Lemna minor*). *Plant Physiol Biochem* 45:62–69
36. Dalton DA, Boniface C, Turner Z, Lindahl A, Jeong Kim H, Jelinek L, Govindarajulu M, Finger RE, Taylor CG (2009) Physiological roles of glutathione S-transferases in soybean root nodules. *Plant Physiol* 150:521–530
37. Chun-hua Z, Ying G (2008) Response of glutathione and glutathione S-transferase in rice seedlings exposed to cadmium stress. *Rice Sci* 15:73–76
38. Shtangeeva I, Bali R, Harris A (2011) Bioavailability and toxicity of antimony. *J Geochem Explor* 110:40–45
39. Pérez-Sirvent C, Martínez-Sánchez MJ, Martínez-López S, Bech J, Bolan N (2012) Distribution and bioaccumulation of arsenic and antimony in *Dittrichia viscosa* growing in mining-affected semiarid soils in southeast Spain. *J Geochem Explor* 123:128–135
40. Lamhamdi M, Bakrim A, Aarab A, Lafont R, Sayah F (2011) Lead phytotoxicity on wheat (*Triticum aestivum* L.) seed germination and seedlings growth. *C R Biol* 334:118–126

Hedysarum pallidum actin 1 gene, partial cds

GenBank: JX840486.1

[FASTA Graphics](#)

The following popper user interface control may not be accessible. Tab to the next button to revert the control to an accessible version.

[Destroy user interface control](#)Go to:

LOCUS JX840486 1573 bp DNA linear PLN 13-NOV-2012

DEFINITION Hedysarum pallidum actin 1 gene, partial cds.

ACCESSION JX840486

VERSION JX840486.1 GI:411107177

KEYWORDS .

SOURCE Hedysarum pallidum

ORGANISM [Hedysarum pallidum](#)

Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta; Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; core eudicotyledons; rosids; fabids; Fabales; Fabaceae; Papilionoideae; Hedysareae; Hedysarum.

REFERENCE 1 (bases 1 to 1573)

AUTHORS Benhamdi,A., Rached,O., Mechakra,A., Castillo,T., Bentellis,A., Mith,O. and Berthomieu,P.

TITLE Effect of antimony stress on the expression of glutathion-S-transferas genes in two populations of Hedysarum pallidum

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 1573)

AUTHORS Benhamdi,A., Rached,O., Mechakra,A., Castillo,T., Bentellis,A., Mith,O. and Berthomieu,P.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (05-SEP-2012) Biochimie et Physiologie Moleculaire des Plantes, Montpellier SupAgro - INRA - CNRS - Universite Montpellier 2, Place Viala, Montpellier, Languedoc-Roussillon 34060, France

COMMENT ##Assembly-Data-START##

Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing

##Assembly-Data-END##

FEATURES Location/Qualifiers

source

1..1573

/organism="Hedysarum pallidum"

/mol_type="genomic DNA"

/isolation_source="old antimony mine"

/db_xref="taxon:299725"

/ecotype="Djebel Hamimat"

/country="Algeria: Djebel"

/lat_lon="[35.98 N 7.18 E](#)"

/collection_date="20-Jun-2011"

/note="metallicolous"

[mRNA](#)

join(<1..34,114..507,1181..>1573)

/product="actin 1"

[CDS](#)

join(<1..34,114..507,1181..>1573)

/codon_start=2

/product="actin 1"

/protein_id="[AFW04198.1](#)"

/db_xref="GI:411107178"

/translation="LVCDNGTGMVKAGFAGDDAPRAVFP SIVGRPRHTGVMVGMGQKD
AYVGDEAQSKRGILTLKYPIEHGIVSNWDDMEKIWHHTFYNELRVAP EEPVLLTEAP
LNPKANREKMTQIMFETFNTPAMYVAIQAVLSLYASGRRTTGIVLDSGDGVSH TVPIYE
GYALPHAILRLDLAGRDLTDALMKILTERGYSFTTTAEREIVRDVKEK LAYIALDYEQ
EMETSKTSSAVEKSYELPDGQVITIGAERFRCPEVLFQPSMIGMEAPGIHETTYN"

ORIGIN

```
1 tcttgtttgt gataatgga ctggaatggt caaggtatgg atctaacctt gttgatctca
61 tgtaatcttg taacatatgg ttttgatggg tgtttttttt tttacaatta aaggctggat
121 ttgctggaga tgatgcaccg agggctgtgt tccttagcat tgtgggtcga ccgcgccaca
```

181 ccggtgtgat ggttggatg ggacaaaagg atgcatatgt tggatgatgaa gcacaatcca
241 aaaggggtat tttgactctc aagtacccaa ttgagcatgg tatagttagt aactgggatg
301 atatggagaa gatctggcat cacacttttt ataatgagct acgtgtggct ccagaagagc
361 atcctgttct tctcaccgaa gcaccactta accctaaggc taatcgtgag aaaatgactc
421 agattatggt tgagacctc aatactccag ctatgtatgt tgctatccag gctgtgcttt
481 cgctttatgc tagtggccgt acaactggta atgattcttc catggaaatt tgcttttcat
541 aattgtagat attggagtgg tatttgctga tccttctttt tcaatttggg aaattgaggc
601 aagccacttg gatttagtca aaatttcaat ataattgtca atgaacatgg tcagaaatca
661 gaatgaccat atcagatcaa ttgtttataa taatcaatgg caactcctgt tgtttattca
721 taaacatctt gcaggaatca gtaatgtcat cttgcatact ttcttgaatg tggaaaggat
781 aagtttgaat tgatagaaag caatgtaatg gagtgaaatg aggtgaaatg gcatcagtca
841 cagttgtttg aattgtttta atatatgata caatgaaata gaaacatgat agaatgcttt
901 cttttctatt tcatgtagta actttgttac tgtttgcca atttgggggt atggctggat
961 ccaacttatt attcaccaat cttcttacca tgtgatccaa ttctaaaaaa tggaatggaa
1021 actttaaatg tccaaataat ggcatagcaa ttatattcta tttcattcca ccattttttt
1081 ccacccatca tttgattatc caaacatagc agatcaaaca tggcgcatgt attatataat
1141 tttaaagctt gacattgaaa tgagttttat gttgttatag gtattgttct ggattctgga
1201 gatgggtgga gccacacagt tcctatctat gaaggctatg ctctcccaca tgcaatcctg
1261 cgattggatc ttgcagggcg tgatctaaca gacgccctca tgaaaatctt gaccgagcgt
1321 ggctactctt ttaccactac cgctgagcgg gaaattgttc gagatgtgaa ggaaaaacta
1381 gcctacattg ctcttgatta tgaacaagag atggaaaactt caaagacaag ttcagctggt
1441 gagaagagct atgagctacc tgatggacag gtgatcacia taggcgctga aaggttccgc
1501 tgtcctgaag tactcttcca gccatccatg attggaatgg aagctcctgg aatacatgaa
1561 accacataca act

//

Hedysarum pallidum actin 3 gene, partial cds

GenBank: JX840487.1

[FASTA Graphics](#)

The following popper user interface control may not be accessible. Tab to the next button to revert the control to an accessible version.

[Destroy user interface control](#)Go to:

LOCUS JX840487 1312 bp DNA linear PLN 13-NOV-2012
DEFINITION Hedysarum pallidum actin 3 gene, partial cds.
ACCESSION JX840487
VERSION JX840487.1 GI:411107179
KEYWORDS .
SOURCE Hedysarum pallidum
ORGANISM [Hedysarum pallidum](#)
Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta;
Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; core eudicotyledons;
rosids; fabids; Fabales; Fabaceae; Papilionoideae; Hedysareae;
Hedysarum.
REFERENCE 1 (bases 1 to 1312)
AUTHORS Benhamdi,A., Rached,O., Mechakra,A., Castillo,T., Bentellis,A.,
Mith,O. and Berthomieu,P.
TITLE Effect of antimony stress on the expression of
glutathion-S-transferas genes in two populations of Hedysarum
pallidum
JOURNAL Unpublished
REFERENCE 2 (bases 1 to 1312)
AUTHORS Benhamdi,A., Rached,O., Mechakra,A., Castillo,T., Bentellis,A.,
Mith,O. and Berthomieu,P.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (05-SEP-2012) Biochimie et Physiologie Moleculaire des
Plantes, Montpellier SupAgro - INRA - CNRS - Universite Montpellier
2, Place Viala, Montpellier, Languedoc-Roussillon 34060, France
COMMENT ##Assembly-Data-START##
Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
##Assembly-Data-END##
FEATURES
source Location/Qualifiers
1..1312
/organism="Hedysarum pallidum"
/mol_type="genomic DNA"
/isolation_source="old antimony mine"
/db_xref="taxon:299725"
/ecotype="Djebel Hamimat"
/country="Algeria: Djebel"
/lat_lon="[35.98 N 7.18 E](#)"
/collection_date="20-Jun-2011"
/note="metallicolous"
[mRNA](#) join(<1..34,165..558,944..>1312)
/product="actin 3"
[CDS](#) join(<1..34,165..558,944..>1312)
/codon_start=2
/product="actin 3"
/protein_id="[AFW04199.1](#)"
/db_xref="GI:411107180"
/translation="LVCDNGTGMVKAGFAGDDAPRAVFP SIVGRPRHTGVMVGMGQKD
AYVGDEAQSKRGILT LKYP I EHGIVSNWDDMEKIWHHTFYNELRVAP E EHPVLLTEAP
LNPKANREKMTQIMFETFNTPAMYVAIQAVLSLYASGR TTGIVLDSGDGV SHTVPIYE
GYALPHAILRLDLAGRDLTDFLMKILTERGYSFTTSAEREIVRDVKEK LAYIALDYEQ
ELETARTSSSVEKSYELPDGQVITIGDERFRCPEVLYQPSMIGMEAA"
ORIGIN
1 tcttgtttgt gacaatggaa ctggaatggt taaggatatag agaggggtcctt ataattttta
61 ttatttagtt tgttttaaaaa cctaacataa ggcttcattg gaacttctta catttatatt
121 acttaagtgg atttgagaaa attaattgca atgaatctct tcaggctgga tttgctggag

181 atgatgcacc acgtgctgtg tttcccagca ttgtaggtcg tcctcgtcac actggtgtga
241 tggttggcat gggccaaaaa gatgcatatg ttggtgatga ggctcaatct aagaggggta
301 tcttgactct taaatacccc attgaacatg gaattgtgag caattgggat gacatggaaa
361 agatthggca tcacaccttc tataatgagc tccgtggtgc cccagaagag caccagttc
421 tgctaactga ggctcctctc aaccctaagg ctaatcgtga gaagatgacc caaatcatgt
481 ttgagacttt taatacccct gctatgtatg tcgccattca ggctgttctc tcaactatag
541 ccagtgggtcg tacaactggg aagtaattht gaattgtcag attaggttca gactatgtgg
601 tttgaacaag ctcgaaact tttagatttg atattgacaa atgactgaat ccatgcatga
661 gcatttagac agcctttatg ttttatgtgc aattthtaatt ggaaatacaa actaaaaatt
721 atccctttga tgthtggtht cacttaatgt gaaatthaat acggaagaac cacatgtgtg
781 aactgggatg aatthggaaa ctgattthcaa aaatthtct cthaatgtga aatthaatgc
841 ggaagaacca cthggtgtga atggggatgg atthggaaat tgtgattthca aaaaatctgt
901 catattgact gthtaaggth atthcatthgg cthctctatg caggatthgt gthggattct
961 ggtgatgggtg tcagccacac agtccccatc tatgagggth atgctctgcc acatgccatc
1021 cthcgtcttg atcttgctgg tcgtgacctc accgattthct tgatgaaaat thtgactgag
1081 cgtggthtatt catthaccac ctcagcagag cgggaaatth tgagggatgt gaaagaaaag
1141 ctggcataca thgccctthga ctacgagcaa gagctggaga cagccaggac tagctctctc
1201 gtggagaaga gctacgaatt gcctgatgga caggtthatca ctattggcga tgagcgtthc
1261 agatgtccag aggtcctgta ccaaccatcc atgataggaa tggaagcagc ag

//

Hedysarum pallidum glutathione S-transferase (GST1) gene, partial cds

GenBank: JX840484.1

[FASTA Graphics](#)

The following popper user interface control may not be accessible. Tab to the next button to revert the control to an accessible version.

[Destroy user interface control](#)Go to:

LOCUS JX840484 534 bp DNA linear PLN 13-NOV-2012
DEFINITION Hedysarum pallidum glutathione S-transferase (GST1) gene, partial cds.
ACCESSION JX840484
VERSION JX840484.1 GI:411107173
KEYWORDS .
SOURCE Hedysarum pallidum
ORGANISM [Hedysarum pallidum](#)
Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta; Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; core eudicotyledons; rosids; fabids; Fabales; Fabaceae; Papilionoideae; Hedysareae; Hedysarum.
REFERENCE 1 (bases 1 to 534)
AUTHORS Benhamdi,A., Rached,O., Mechakra,A., Castillo,T., Bentellis,A., Mith,O. and Berthomieu,P.
TITLE Effect of antimony stress on the expression of glutathione-S-transferase genes in two populations of Hedysarum pallidum
JOURNAL Unpublished
REFERENCE 2 (bases 1 to 534)
AUTHORS Benhamdi,A., Rached,O., Mechakra,A., Castillo,T., Bentellis,A., Mith,O. and Berthomieu,P.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (05-SEP-2012) Biochimie et Physiologie Moleculaire des Plantes, Montpellier SupAgro - INRA - CNRS - Universite Montpellier 2, Place Viala, Montpellier, Languedoc-Roussillon 34060, France
COMMENT ##Assembly-Data-START##
Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
##Assembly-Data-END##
FEATURES Location/Qualifiers
source 1..534
/organism="Hedysarum pallidum"
/mol_type="genomic DNA"
/isolation_source="old antimony mine"
/db_xref="taxon:299725"
/ecotype="Djebel Hamimat"
/country="Algeria: Djebel"
/lat_lon="35.98 N 7.18 E"
/collection_date="20-Jun-2011"
/note="metallicolous"
[gene](#) <1..>534
/gene="GST1"
[mRNA](#) join(<1..273,472..>534)
/gene="GST1"
/product="glutathione S-transferase"
[CDS](#) join(<1..273,472..>534)
/gene="GST1"
/codon_start=1
/product="glutathione S-transferase"
/protein_id="AFW04196.1"
/db_xref="GI:411107174"
/translation="FGMRLRIALAEKGVKYESKEEDLWNKSPLLQMPVHKKIPVLI
HNGKPVPESLIALQYIDEVWNDKYPLLPSPDPYQRSQARFWADFDVDDKKIYEIGKTLWTK

KGEEHEAARK"

ORIGIN

```

1 tttggtatga ggcttaggat agccttagct gaaaaggggtg tcaagtatga gtccaaagaa
61 gaagacttgt ggaacaagag ccccttggtta ctacaaatga acccggttca caagaaaatc
121 cctgttctca tccataatgg aaaaccgggtt cctgaatctc ttattgctct tcagtatatt
181 gatgagggtt ggaatgataa atatcccttg ttgccttctg atccttatca aagatcacag
241 gctagattct gggctgattt tgttgataag aaggtaacct tttgctgtta ttttacaaca
301 aataatgatt atggattttt ttaatttaca aaacttttta tccataagtt tctgcatctt
361 tattatTTTT gaaaatatct tatttagctt ttttgaaaat gtttaaaacc atcttccaat
421 agtaagatgt gattggatta ggataatggt tcaattttcc atgtgaaata gatatatgaa
481 attgaaaga ccctttggac caaaaaagga gaagaacatg aggctgccag gaag

```

//

Hedysarum pallidum glutathione S-transferase (GST2) gene, partial cds

GenBank: JX840485.1

[FASTA Graphics](#)

The following popper user interface control may not be accessible. Tab to the next button to revert the control to an accessible version.

[Destroy user interface control](#)Go to:

```
LOCUS       JX840485                818 bp    DNA        linear    PLN 13-NOV-2012
DEFINITION  Hedysarum pallidum glutathione S-transferase (GST2) gene, partial
            cds.
ACCESSION   JX840485
VERSION     JX840485.1  GI:411107175
KEYWORDS    .
SOURCE      Hedysarum pallidum
  ORGANISM  Hedysarum pallidum
            Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta;
            Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; core eudicotyledons;
            rosids; fabids; Fabales; Fabaceae; Papilionoideae; Hedysareae;
            Hedysarum.
REFERENCE   1  (bases 1 to 818)
  AUTHORS   Benhamdi,A., Rached,O., Mechakra,A., Castillo,T., Bentellis,A.,
            Mith,O. and Berthomieu,P.
  TITLE     Effect of antimony stress on the expression of
            glutathion-S-transferas genes in two populations of Hedysarum
            pallidum
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2  (bases 1 to 818)
  AUTHORS   Benhamdi,A., Rached,O., Mechakra,A., Castillo,T., Bentellis,A.,
            Mith,O. and Berthomieu,P.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (05-SEP-2012) Biochimie et Physiologie Moleculaire des
            Plantes, Montpellier SupAgro - INRA - CNRS - Universite Montpellier
            2, Place Viala, Montpellier, Languedoc-Roussillon 34060, France
COMMENT     ##Assembly-Data-START##
            Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
            ##Assembly-Data-END##
FEATURES             Location/Qualifiers
     source           1..818
                     /organism="Hedysarum pallidum"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /isolation_source="old antimony mine"
                     /db_xref="taxon:299725"
                     /ecotype="Djebel Hamimat"
                     /country="Algeria: Djebel"
                     /lat_lon="35.98 N 7.18 E"
                     /collection_date="20-Jun-2011"
                     /note="metallicolous"
     gene           <1..>818
                     /gene="GST2"
     mRNA         join(<1..257,726..>818)
                     /gene="GST2"
                     /product="glutathione S-transferase"
     CDS           join(<1..257,726..>818)
                     /gene="GST2"
                     /codon_start=3
                     /product="glutathione S-transferase"
                     /protein_id="AFW04197.1"
                     /db_xref="GI:411107176"
                     /translation="EIALKCLKGIEYKYVEEKIGNLSDTLHKYNPVYKKVPVLVHNEKP
            ISESLVIVEYIDETWKQNPILPSDPYQRALARFWSKFIDDKQCMLGVWKAFTLDEEE
```

REKGTEELTESLQF"

ORIGIN

```
1 tagagattgc tctcaagttg aaggggaattg agtataaata tgtggaagaa aagattggaa
61 acttgagtga tactcttcac aaatataacc cagtttataa gaagggtcct gtacttggtc
121 ataatgagaa gcccatttca gagtcccttg tgattggtga gtatattgat gaaacatgga
181 aacaaaatcc aatcttgctt tctgatcctt accaaagagc tttggctcgg ttttggcca
241 agtttattga tgacaaggta actccttccc ctcttctatt ttccacgtac atgttactag
301 tttctatact ccaatthgtg tgtgattcca catccaactt gacaagtta tattatgttt
361 tgagccggtt ttactgtgat ttttattgaa aacgcaaagt gttaatttga ttcaaccaa
421 ctaaccattc aaccaaatat acacttcttc ggaccggtgt tttaaaaacc gatctgatga
481 ttgttccaat gaaaataatg agtcattagg ttaaaagtca gaccaaatag tcacttattg
541 aatcgcatga ctcagtcaaa agtcaaacta gtgggtcatt tattgaactg catcagccgg
601 acaaaagtca aaccggtgga tcatttggtg agctacacga caaatttttt cataattcat
661 acttattgac ctggcatgta aaatttttgg aatgcatatt aattactcta ttttaattat
721 ggaagcagtg tatgcttggc gtatggaaag ctgctttcac cctagatgag gaagagcgtg
781 agaaggttac tgaggaatta acagagtctc ttcaattt
```

//

**Université Constantine 1-Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biochimie et de Biologie Moléculaire et Cellulaire**

Nom : **BENHAMDI**
Prénom : **Asma**

Date de soutenance :

Titre : Etude des enzymes de stress oxydatif chez *Hedysarum pallidum* Desf. et *Lygeum spartum* L. en réponse à la pollution du sol par Sb et As. Analyse *in-vitro* de l'expression des gènes de la GST.

Résumé

Le but de cette étude est d'évaluer le niveau du stress oxydatif et les systèmes de défense antioxydants des plantes poussant sur des sols contaminés par l'antimoine (Sb) et l'arsenic (As) ainsi que d'analyser l'expression des gènes de la GST. Pour cela, deux espèces, *Hedysarum pallidum* Desf. et *Lygeum spartum* L. ont été prélevées à partir de différentes zones des alentours d'une ancienne mine d'antimoine sise à Djebel Hamimat (Algérie), selon un gradient de concentration en Sb et en As dans le sol, et fait l'objet de l'analyse des marqueurs de stress oxydatif (le malondialdéhyde (MDA), la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT), la peroxydase (POD), l'ascorbate peroxydase (APX) et de la glutathion-S-transférase (GST)). Les deux espèces accumulent différemment le Sb et l'As dans leurs parties aériennes et souterraines.

Les résultats montrent que l'indicateur du niveau de stress oxydant, le MDA, augmente chez les deux plantes de manière significative avec l'augmentation des concentrations du Sb et de l'As dans le sol, mais, il est nettement supérieur chez *H. pallidum*. Les activités des enzymes antioxydantes varient d'une plante à l'autre et d'une zone à une autre. Les activités de SOD, APX et GST sont maximales dans la zone la plus polluée dans les deux parties de *H. pallidum*. L'inhibition de l'activité de la CAT dans les racines de *H. pallidum*, dans toutes les zones contaminées, est concomitante avec l'induction de l'activité de la POD dans le même tissu. Chez *L. spartum*, l'APX des parties supérieures, la CAT et la GST des parties supérieures et des racines, sont maximales dans la zone 5 (la plus polluée). Cependant, le déclin des activités des SOD et POD dans les tissus, suite à de fortes concentrations des sols en Sb et en As, a également été observé. Ces résultats suggèrent que le MDA peut être utilisé en tant que biomarqueur potentiel de la pollution des sols par le Sb et l'As pour les deux plantes.

La culture *in-vitro* de graines de deux populations d'*H. pallidum* a permis de réaliser le séquençage et le clonage de trois fragments de gènes d'actine et deux de la GST tau. Le pourcentage d'identité entre les deux gènes de la GST (tau1 et tau2) est de 53% au niveau nucléotidique et de 46% au niveau protéique. L'analyse de l'expression des deux gènes par la PCR semi quantitative, suite à des concentrations croissantes en Sb dans le milieu de culture, indique que l'expression de la GST tau1 est maximale en présence de faibles concentrations en Sb pour les deux populations. Celle de la GST tau2 est plus exprimée dans la population des déblais de mine et son expression devient plus importante lorsque la concentration en Sb augmente. Cela permet de déduire que chaque GST tau est spécifique à un substrat et que la GST tau2 présente un domaine H spécifique de liaison à l'antimoine. Ce métalloïde participe à l'activation de l'expression du gène qui s'intensifie avec l'augmentation de sa concentration.

Les résultats des activités de la GST ainsi que l'analyse de l'expression des deux gènes de GST tau chez *H. pallidum* permettent de déduire qu'en l'absence de stress métallique les GST sont toutes exprimées mais à de faibles quantités. Au moment du stress métallique seules les GST tau présentant un domaine spécifique pour la liaison au métal seront surexprimées.

Mots clés : Enzymes, stress oxydatif, *Hedysarum pallidum* Desf, *Lygeum spartum* L, antimoine, arsenic, GST, expression des gènes.

Laboratoires de recherche : Biologie et Environnement, Université Constantine 1.
Biochimie et Physiologie moléculaire des plantes, Campus
INRA/SupAgro, Montpellier, France.