

THESE DE DOCTORAT D'UNIVERSITE  
PRESENTEE  
A L'UNIVERSITE DE BRETAGNE OCCIDENTALE  
PAR

**Michel AOUN**

**Action du cadmium sur les plants de moutarde indienne [*Brassica juncea*  
(L.) Czern] néoformés à partir de couches cellulaires minces et issus de  
semis. Analyses physiologiques et rôle des polyamines.**

Rapporteurs : Professeur Michel COUDERCHET, Université de Reims.  
Professeur Désiré STRULLU, Université d'Angers.

Examineurs : Professeur Annick Hourmant, Université de Bretagne occidentale.  
Professeur Dominique Parent-Massin, Université de Bretagne occidentale.  
Docteur Gilbert Charles, Université de Bretagne occidentale.  
Docteur Geneviève Arzul, Ifremer, Brest.

## *Remerciements*

Je tiens à remercier Madame Annick HOURMANT, Professeur au laboratoire de Toxicologie Alimentaire à l'université de Bretagne Occidentale et directrice de thèse pour l'ensemble des efforts qu'elle a fourni pour mener à terme ce travail de thèse. Qu'elle trouve ici l'expression de mes vifs sentiments et de ma gratitude.

J'exprime mes plus sincères remerciements à Messieurs les Professeurs COUDERCHET et STRULLU , pour avoir, en tant que rapporteurs, accepté de juger ce travail.

Je suis reconnaissant à Madame le Professeur PARENT-MASSIN, à Monsieur Gilbert CHARLES et à Madame Geneviève ARZUL d'avoir bien voulu participer à ce jury.

J'exprime toute ma sympathie à ceux qui, à divers titres, m'ont aidé à réaliser ce travail, en particulier à :

- Jean-Yves CABON, pour avoir accepté de me doser le cadmium en ICP-MS,
- Patrice REY, pour son aide précieuse dans le traitement statistique des données,
- Nelly KERVAREC et Stéphane CERANTOLA pour avoir accepté de m'initier à la RMN sur l'AMX 400.
- Leila MEISTERTZHEIM, pour m'avoir permis de suivre une formation pratique sur la PCR, le clonage et le séquençage ainsi qu'une formation théorique sur la Q-PCR.
- Monsieur Charbel TANNOUS, Professeur de Physique théorique (UBO), pour la mise en ligne de mes travaux de thèse.
- Madame Marie-Paule FRIOCOURT, Docteur à l'Université de Bretagne occidentale pour son aide précieuse pour mettre en forme mes articles scientifiques en anglais.

## ABREVIATIONS

ABC	: ATP binding cassette
ACC	: Acide aminocyclopropane carboxylique
ADC	: Arginine décarboxylase
ANA	: Acide naphtalène acétique
APX	: Ascorbate peroxydase
AVG	: Aminoéthoxyvinylglycine
BAP	: 6-Benzylaminopurine
CAT	: Catalase
CCMts	: Couches cellulaires minces transversales
CDTA	: Acide trans-1,2-diaminecyclohexane- <i>N,N,N',N'</i> -tétraacétique
Chl a	: Chlorophylle a
Chl b	: Chlorophylle b
CLHP	: Chromatographie liquide à haute performance
DFMA	: $\alpha$ -DL-Difluorométhylarginine
DFMO	: $\alpha$ -DL-Difluorométhylornithine
EDDHA	: Acide éthylènediamine-di( <i>o</i> -hydroxyphénylacétique)
EDDS	: Ethylènediaminedisuccinate
EDTA	: Acide éthylènediaminetétraacétique
GPOX	: Gaïacol peroxydase
GR	: Glutathion réductase
GSH	: Glutathion réduit
GSSG	: Glutathion oxydé
MDA	: Malondialdéhyde
MF	: Matière fraîche
MS	: Matière sèche
MTs	: Métallothionéines
NTA	: Nitriloacétate
ODC	: Ornithine décarboxylase
PAs	: Polyamines
PCn	: Phytochélatines
POD	: Peroxydase

Put	: Putrescine
ROS	: Reactive oxygen species
rpm	: Rotation par minute
SAM	: S-adénosyl méthionine
SAMDC	: S-adénosyl méthionine décarboxylase
SOD	: Superoxyde dismutase
Spd	: Spermidine
Spm	: Spermine

# SOMMAIRE

<b>1- OBJECTIFS DU TRAVAIL</b>	<b>1</b>
<b>2- INTRODUCTION</b>	<b>3</b>
2.1 - Sources de pollution	3
2.2 - Les métaux lourds	4
2.2.1 - Définition	4
2.2.2 - Origine des métaux lourds	4
2.2.3 - Les métaux lourds : oligoéléments ou éléments toxiques	5
2.2.4 - Toxicité et tolérance des plantes aux métaux lourds	5
2.2.4.1 - Toxicité	5
2.2.4.2 - Tolérance	7
2.3 - Le cadmium	7
2.3.1 - Teneurs naturelles des sols	8
2.3.2 - Origines anthropogéniques	8
2.3.3 - Toxicité humaine	9
2.3.4 - Le cadmium et les plantes	10
2.3.4.1 - Effets sur la croissance	10
2.3.4.2 - Effets sur les processus métaboliques	11
2.3.4.3 - Sites d'action et stress oxydatif	11
2.3.4.4 - Absorption, Chélation, Séquestration et Translocation	13
2.3.4.4.1 - Absorption	13
2.3.4.4.2 - Chélation et séquestration	14
2.3.4.4.3 - Translocation	15
2.3.4.5 - Mécanismes de défense induits par le cadmium	16
2.4 - Polyamines libres et conjuguées	19
2.4.1 - Les polyamines libres	19
2.4.1.1 - Métabolisme	19
2.4.1.2 - Rôles physiologiques	22
2.4.2 - Les PAs conjuguées	24

2.5 - La phytoremédiation	
25	
2.5.1 - Définition	
25	
2.5.2 - Les différentes techniques	26
2.5.2.1 - Phytoextraction	26
2.5.2.1.1 - Phytoextraction naturelle	27
2.5.2.1.2 - Phytoextraction induite ou assistée par des chélateurs	28
2.5.2.2 - Phytostabilisation	28
2.5.2.3 - Phytovolatilisation	
28	
2.5.2.4 - Rhizofiltration	28
2.5.2.5 - Phytodégradation	29
2.6 - Hyperaccumulation	29
2.6.1 - Plantes hyperaccumulatrices	29
2.6.2 - Inconvénients	30
2.7 - Choix de <i>Brassica juncea</i>	31

### 3 - MATERIEL ET METHODES

3.1 - Matériel végétal	33
3.2 - Conditions de culture et de régénération des plantes <i>in vitro</i> et en chambre de culture	33
3.3 - Minéralisation et dosage du Cd	35
3.3.1 - Minéralisation	35
3.3.2- Dosage	35
3.4 - Dosage des pigments	36
3.5 - Estimation de la peroxydation des lipides	37
3.6 - Mesure de l'activité gaïacol peroxydase (GPOX)	39
3.7 - Détermination de la teneur en acides aminés libres totaux	40
3.7.1 - Principe	40
3.7.2 - Extraction	40
3.7.3 - Dosage	40

3.8 - Détermination de la proline	41
3.9 - Extraction et dosage des sucres solubles totaux	41
3.9.1 - Principe	41
3.9.3 - Dosage	42
3.10 - Extraction et dosage des polyamines	42
3.10.1 - Extraction	42
3.10.2 - Dansylation	42
3.10.3 - Dosage par Chromatographie Liquide à Haute Performance (CLHP)	43
3.10.4 - Hydrolyse des polyamines conjuguées acido-solubles	44
3.11 - Analyses statistiques	44

#### **4 – RESULTATS**

4.1 - Mise au point de la méthode de régénération	45
4.1.1 - Induction de la caulogénèse	45
4.1.2 - Influence de quelques paramètres sur la caulogénèse à partir de CCMts	45
4.1.2.1 - Effet sur la fréquence de régénération	45
4.1.2.2 - Effet sur le nombre de bourgeons par CCMt	48
4.1.2.3 - Acclimatation et transfert en pots des plantes néoformées	50
4.2 - Application de la méthode en présence de CdCl <sub>2</sub>	51
4.2.1 - Effet du CdCl <sub>2</sub> sur le pourcentage de régénération des CCMts	51
4.2.2 - Effet de la concentration en CdCl <sub>2</sub> sur le nombre de bourgeons par CCMt	52
4.2.3 - Teneur en Cd dans les bourgeons néoformés	52
4.2.4 - Mesure de l'activité gaïacol peroxydase (GPOX) au cours des premiers jours de mise en culture des CCMts issues d'hypocotyles	54
4.2.5 - Discussion et conclusion	55
4.3 - Obtention de régénérants en présence de CdCl <sub>2</sub>	59
4.3.1 - Effet du cadmium (75 µM) sur la biomasse fraîche	59
4.3.2 - Accumulation du cadmium par les plantes régénérées	60
4.3.3 - Effet de CdCl <sub>2</sub> sur la teneur en pigments	62

4.3.4 - Effet de CdCl <sub>2</sub> sur la teneur en malondialdéhyde (MDA)	63
4.3.5 - Discussion et Conclusion	64
4.4 - Effet de traitements combinés : CdCl <sub>2</sub> et polyamines	68
4.4.1 - Choix du génotype	68
4.4.2 - Effet sur la croissance	68
4.4.2.1 - Effet sur la masse de matière fraîche	68
4.4.2.2 - Effet des traitements combinés polyamines et CdCl <sub>2</sub> sur la masse de matière sèche et sur la teneur en eau	69
4.4.2.3 - Effet d'une pulvérisation foliaire de polyamines combinée avec un traitement à CdCl <sub>2</sub> sur la teneur en pigments chlorophylliens	71
4.4.3 - Accumulation de Cd dans les plants	73
4.4.3.1 - Teneurs en Cd exprimées en µg.g <sup>-1</sup> M.S.	73
4.4.3.2 - Quantités de Cd exprimées par organe	74
4.4.4 - Activité de la gaïacol peroxydase (GPOX) en réponse aux différents traitements	75
4.4.5 - Effet des traitements avec CdCl <sub>2</sub> et les polyamines sur la production de malondialdéhyde (MDA) par les feuilles	76
4.4.6 - Action des traitements sur la teneur en acides aminés des feuilles	77
4.4.6.1 - Action sur la teneur en acides aminés libres totaux	77
4.4.6.2 - Action sur la teneur en proline libre	77
4.4.7 - Action des différents traitements sur la teneur en glucides solubles totaux	78
4.4.8 - Effet sur la teneur en polyamines (PAs) libres et conjuguées	79
4.4.8.1 - Teneur en PAs libres	79
4.4.8.2 - Teneurs en PAs conjuguées	82
4.4.9 - Discussion et conclusions	85

## **CONCLUSIONS GENERALES** **94**

### **BIBLIOGRAPHIE**

**100**



## 1 - OBJECTIFS DU TRAVAIL

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

Parmi les principaux polluants inorganiques du sol, ceux qui ont le plus retenu l'attention sont les métaux rejetés en plus ou moins grandes quantités par les activités industrielles et anthropogéniques. Si certains éléments métalliques (oligo-éléments), présents à l'état de traces, sont essentiels pour l'organisme, l'accroissement de leur concentration peut représenter un danger pour les êtres vivants. D'autres éléments ne sont pas nécessaires et ne peuvent produire que des effets toxiques. A cette catégorie appartiennent différents éléments tels que le plomb, le mercure, le cadmium...dont la présence est fortement aggravée par les activités humaines.

N'étant pas dégradables dans le sol, les métaux lourds peuvent y persister longtemps et constituent un danger potentiel par bio-accumulation le long de la chaîne trophique. Les technologies physico-chimiques disponibles pour la dépollution des sols, en plus d'être très coûteuses, induisent d'importantes modifications des propriétés du milieu, ce qui a incité à développer des méthodes biologiques. La phytoremédiation regroupe différentes techniques d'assainissement du sol, faisant appel aux plantes pour stabiliser ou extraire les polluants.

C'est dans ce contexte que se situe le présent travail dont l'objectif majeur est d'analyser le comportement vis à vis de traitements par le cadmium de la moutarde

indienne (*Brassica juncea*) ; cette Brassicacée a été retenue en raison d'une part, de sa bonne capacité d'accumulation des métaux (Pilon-Smits, 2005) et, d'autre part, de l'existence pour cette plante de différents génotypes ; la relative toxicité d'un métal pouvant varier avec le génotype et les conditions expérimentales (Patra *et al.*, 2004).

Le travail expérimental présenté se compose de trois parties :

La première partie a consisté en la mise au point et l'optimisation d'une méthode de régénération *in vitro*, basée sur la technique des couches cellulaires minces transversales (CCMTs). Pour cette mise au point, trois génotypes de *Brassica juncea* ont été utilisés afin d'évaluer l'influence du génotype sur l'aptitude à la régénération, avec pour chacun, trois sources d'explants (cotylédons, hypocotyles et pétioles) pour sélectionner l'organe le plus réactif. Une application de cadmium a été réalisée au cours de la phase de néoformation *in vitro*, l'objectif étant, par une pression de sélection, de modifier la tolérance des régénérants au métal.

La deuxième partie du travail présente l'effet des traitements par le cadmium : *in vitro* et en serre, sur le développement des plants. Une analyse des perturbations physiologiques et biochimiques observées permet d'évaluer la modification de tolérance des plants vis à vis du cadmium, se traduisant dans un cas par un processus d'exclusion du métal.

Dans la troisième partie, pour compléter l'étude précédente réalisée sur des plantes néoformées, l'effet du cadmium a été testé sur des plantes de *B. juncea* directement issues de graines. Plusieurs paramètres physiologiques et biochimiques, caractéristiques des stress, ont été étudiés. En raison de leurs propriétés antioxydantes, une attention particulière a été portée aux polyamines dont l'application exogène permet d'envisager son utilisation pour améliorer la capacité d'accumulation du cadmium des plantes.

La discussion est orientée vers la contribution de la culture *in vitro* dans l'obtention de plantes ayant développé une adaptation physiologique vis à vis du cadmium et ceci constitue un modèle intéressant pour l'étude des mécanismes d'exclusion des métaux. Par ailleurs, le rôle des polyamines est discuté en relation avec une amélioration de la mise en place de la phytoextraction par les plants de *B. juncea* cultivés en serre.

## 2 - INTRODUCTION

### 2.1 – Sources de pollution

Le terme de pollution désigne l'ensemble des rejets de composés toxiques que l'homme libère dans l'écosphère, mais aussi les substances qui, sans être vraiment dangereuses pour les êtres vivants, exercent une influence perturbatrice sur l'environnement. Cependant, c'est avant tout le développement considérable des activités industrielles qui a provoqué un accroissement important des pollutions et des nuisances. Il en résulte que les polluants sont principalement des sous-produits : organiques et inorganiques, des activités humaines provoquant une pollution de l'air, des eaux et du sol.

Les polluants organiques de l'environnement, pour la plupart d'origine anthropique, constituent des xénobiotiques pour les organismes. Beaucoup d'entre eux sont toxiques voire carcinogènes et sont relâchés dans l'environnement en raison de rejets volontaires ou accidentels de produits (hydrocarbures, solvants), des activités militaires (explosifs, armes), des pratiques agricoles (herbicides, pesticides) et industrielles (chimique et pétro-chimique), de l'industrie du bois, etc... Des traitements physiques, physico-chimiques peuvent être appliqués pour extraire, transformer la substance indésirable en un composé inoffensif mais c'est le traitement biologique qui constitue la technique la plus importante car elle permet la dégradation de ces corps indésirables (Koller, 2004).

Les polluants inorganiques se produisent naturellement dans la croûte terrestre ou l'atmosphère mais aussi sous l'effet des activités humaines telles que l'extraction des minerais, les industries chimiques diverses (peintures, imprimeries, matières plastiques, tanneries, papeteries, constructions de machines...), le traitement des déchets radioactifs, le trafic routier, l'agriculture et les activités militaires qui toutes favorisent leur relâchement dans l'environnement, conduisant au phénomène de toxicité. En fait, les activités humaines génèrent de nombreux déchets qui pour beaucoup sont enrichis en éléments métalliques. Cette accumulation des métaux dans la biosphère perturbe le développement des végétaux, de la

microflore et de la microfaune du sol. L'aération du sol s'en trouve réduite et ceci freine alors très nettement la dégradation de l'humus par les microorganismes aérobies. Il en découle une diminution des formes azotées minérales c'est-à dire une baisse de la fertilité du sol, préjudiciable au bon développement des végétaux. En effet, l'appauvrissement du sol en éléments nutritifs ajouté à une absorption excessive des métaux peut conduire à la disparition de certaines espèces non tolérantes, pouvant à terme produire une perte de la biodiversité. L'homme absorbe les polluants à travers la nourriture et l'eau potable et par la respiration. Ainsi toute la chaîne alimentaire se trouve perturbée par la pollution du sol par les métaux.

## **2.2 - Les métaux lourds**

### **2.2.1 - Définition**

Le terme de métaux lourds est arbitraire et imprécis. Il est utilisé pour des raisons de simplicité et il recouvre des éléments ayant des propriétés métalliques (ductilité, conductivité, densité, stabilité des cations, spécificité de ligand...) et un numéro atomique >20 (Raskin *et al.*, 1994). Ce terme de métaux lourds désigne selon Elmsley (2001) des éléments chimiques toxiques dont la densité excède  $5\text{g/cm}^3$ . Sous cette appellation figurent des éléments qui, pour certains, sont effectivement des métaux tels que Ni, Cu, Zn, Pb, Hg, Al... mais aussi des métalloïdes tels que As et Se. C'est pourquoi, une classification plus complexe, basée sur les propriétés de formation de ligands a été proposée par Nieboer et Richardson (1980), avec la dénomination d'Eléments-Traces Métalliques, préférée par certains chercheurs. Aucune définition satisfaisante n'a en définitive émergée (Mallick et Rai, 2002).

Selon les textes législatifs, la pollution par les métaux toxiques (METOX) regroupe sept métaux et un métalloïde (chrome, zinc, cuivre, nickel, plomb, arsenic, cadmium et mercure) (Koller, 2004).

### **2.2.2 - Origine des métaux lourds**

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

- l'une, naturelle est le résultat de processus géogéniques comme l'érosion, les précipitations géochimiques de roches et de l'eau de source, l'activité volcanique et bactérienne (Sanita di Toppi et Gabbrielli, 1999 ; Baize et Sterckeman, 2001) ;

- l'autre, relève des activités anthropogéniques. En effet, ces dernières années, le développement des activités industrielles a provoqué un accroissement considérable de la teneur en métaux lourds dans l'environnement où ils peuvent parvenir de différentes manières. Sous forme gazeuse, dissoute ou de particules liées, les polluants peuvent pénétrer dans le sol par voie aérienne (déposition sèche), en utilisant l'eau comme vecteur de transport (précipitation, eau de surface, déposition humide) ou encore via des solides organiques tels les boues d'assainissement, le compost, les fertilisants et les pesticides, etc...

### **2.2.3 - Les métaux lourds : oligoéléments ou éléments toxiques**

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 sont neutres ou toxiques (Marschner, 1995). A cette catégorie appartiennent différents éléments, dont la présence est fortement aggravée par les activités humaines dans l'environnement, tels le plomb, le mercure, le cadmium...(Adriano, 2001 ; Alkorta *et al.*, 2004). A l'exception du mercure (27,5 %) , pour les autres éléments, l'émission anthropogénique dépasse l'émission naturelle. Le facteur d'interférence atmosphérique (FIA) qui définit le rapport de ces deux émissions est par exemple de 34 583 % pour le Pb et de 1 897 % pour Cd (Koller, 2004).

### **2.2.4 - Toxicité et tolérance des plantes aux métaux lourds**

#### **2.2.4.1 - Toxicité**

Les symptômes de toxicité associés aux métaux lourds sont peu différents de ceux produits par différents types de stress.

Ils peuvent être classés en deux catégories : les symptômes visibles et les symptômes uniquement mesurables ; leur importance étant fonction de la mobilité du métal à l'interface sol-plante et à l'intérieur de la plante, mobilité qui détermine la concentration endogène du métal.

Le premier effet des métaux lourds introduits dans la rhizosphère va se traduire par une interaction avec les autres composants ioniques du sol. Les métaux peuvent alors précipiter avec des ligands anioniques ou entrer en compétition avec d'autres cations pour des sites de liaison de la paroi pecto-cellulosique des cellules racinaires. Dû au fait que la paroi présente une considérable capacité d'échange des cations, le premier effet des métaux lourds

sera l'inhibition ou la stimulation de l'absorption des cations, causant des changements significatifs du métabolisme (par exemple un stress dû à la déficience en fer). Par ailleurs, dans la paroi, la génération d'espèces réactives de l'oxygène ( $O_2^-$  et  $H_2O_2$ ,  $OH^\cdot$ ) sous l'effet des métaux lourds, entraîne une peroxydation des lipides du plasmalemme. Il en découle une fuite membranaire sévère mais surtout une destruction de certaines protéines membranaires : ATPase et transporteurs, se traduisant par une inhibition des processus de transport et/ou une absorption du métal toxique dans le cytoplasme. Aucun transporteur spécifique de métaux lourds n'a pour encore été identifié. Cependant, en raison de la similarité chimique (même taille) existant avec d'autres cations, il est probable qu'ils peuvent utiliser les systèmes de transport de ces cations (Cseh, 2002). Après l'entrée symplastique dans le xylème, les métaux lourds sont ensuite transportés vers les parties aériennes par le courant transpiratoire.

L'effet le plus habituel et le moins spécifique des métaux lourds consiste en une réduction de la croissance des différentes parties de la plante. Selon l'importance du stress, les feuilles peuvent présenter une chlorose due à la fois à une perte de chlorophylle, à une relative augmentation des caroténoïdes et à une déficience en fer (Romanowska, 2002). Dans les cas les plus sévères, une apparition de tâches nécrotiques est observée (Fodor, 2002).

Ces effets apparents résultent en fait d'une altération de processus vitaux tels que le transport et le métabolisme. Ainsi, une diminution de la conductivité hydraulique racinaire associée à la fermeture des stomates entraîne une réduction de la transpiration (Poschenrieder *et al.*, 1989 ; Barcelo et Poschenrieder, 1990 ; Haag-Kerwer *et al.*, 1999) ; il en découle une réduction de la fourniture en éléments minéraux dont les nitrates et, de ce fait, une perturbation du métabolisme azoté des feuilles (Gouia *et al.*, 2000 ; Klobus *et al.*, 2002).

Les métaux induisent également un abaissement de la photosynthèse qui résulte soit d'un effet direct sur le transport des électrons et les enzymes du cycle de Calvin (en particulier de la Rubisco) soit d'un effet indirect, en raison d'une diminution de la teneur en chlorophylle (Stobart *et al.*, 1985 ; Van Assche et Clijsters, 1986 ; Chatterjee et Chatterjee, 2000 ; Mysliwa-Kurdziel et Strzalka, 2002 ; Romanowska, 2002).

En contraste avec la photosynthèse, une stimulation de la respiration est souvent observée, en réponse aux métaux lourds qui pourrait s'expliquer par une demande accrue d'ATP, généré par la phosphorylation oxydative, permettant de compenser la production limitée d'ATP par photophosphorylation (Siedlecka *et al.*, 1997 ; Romanowska *et al.*, 2002). L'inhibition de la respiration est observée pour des concentrations plus élevées de métaux (Reese et Roberts, 1985 ; Chugh et Sawhney, 1999) et pourrait être due à une liaison des

métaux aux groupes thiols de l'ATP synthétase. Le mécanisme d'action des métaux sur la respiration reste encore mal élucidé.

De façon plus ou moins spécifique s'avèrent inhibées par les métaux lourds non seulement l'expansion cellulaire mais également la division cellulaire, par altération des microtubules (Eun *et al.*, 2000).

#### **2.2.4.2 – Tolérance**

Un nombre restreint de plantes se révèlent capables de se développer sur des sols fortement contaminés par les métaux lourds. C'est en 1885 que le botaniste allemand Baumann observa que certaines espèces accumulaient ainsi dans leurs feuilles des quantités extraordinairement élevées de zinc. Ces espèces rencontrées sur des sols naturellement riches en éléments métalliques ont été utilisées comme indicateurs lors de prospections minières. A ce jour, 397 espèces accumulatrices de métaux divers ont ainsi été répertoriées (Salt *et al.*, 1998).

Ces plantes utilisent alors des mécanismes spécifiques de tolérance pour détoxifier les métaux ou pour les rendre non disponibles pour leurs actions toxiques. Deux stratégies sont ainsi observées : l'exclusion qui consiste à éviter l'absorption des métaux, présents à concentrations élevées dans le sol et, l'accumulation voire l'hyperaccumulation, qui se traduit au contraire par une absorption importante des métaux, qui se réalise également avec de faibles concentrations en métal dans le sol. En outre, quelques plantes tolèrent les métaux en ayant une faible vitesse de translocation vers les parties aériennes, effectuant ainsi une protection de leur photosynthèse.

La tolérance aux métaux peut être assurée par plusieurs mécanismes différents, à savoir par une chélation ou précipitation avec des ligands à haute affinité, localisés sur la paroi cellulaire ou à l'intérieur du cytoplasme (formation de complexes avec des peptides, des acides organiques ou des ions inorganiques), par séquestration du métal dans la vacuole des cellules foliaires ou des trichomes, ou par exclusion ou excrétion active du métal (Lindberg et Greger (2002). Il en résulte alors que le métal ne peut interférer avec les réactions métaboliques sensibles de la plante.

La tolérance pour un métal donné est souvent spécifique mais les mécanismes précédents s'appliquent en général à plus d'un métal.

### **2.3 - Le cadmium**

Le cadmium, découvert en 1817 par le chimiste allemand Stohmeyer est un métal malléable d'aspect blanc bleuâtre, qui présente une grande résistance à l'oxydation et une bonne conductibilité électrique (Juste *et al.*, 1995). Le cadmium (groupe IIB de la table périodique des éléments chimiques) est un polluant ubiquitaire classé 7<sup>ème</sup> parmi les 20 principaux toxiques, en raison de son influence négative sur les systèmes enzymatiques cellulaires (Sanita di Toppi et Gabbrielli, 1999).

### **2.3.1 - Teneurs naturelles des sols**

La croûte terrestre renferme en moyenne de 0,1 à 0,2 mg de cadmium par kg de sol sec, avec des différences importantes selon l'origine des sols. Les roches d'origine sédimentaire contenant davantage de cadmium (0,3 à 11 mg/Kg) que les roches métamorphiques (0,1 à 1 mg/Kg) ou éruptives (0,1 à 0,3 mg/Kg). Les gisements sédimentaires jouent un rôle déterminant dans l'accumulation du cadmium, avec dans certains sites, des teneurs pouvant atteindre 300 mg/Kg, par exemple dans les minerais phosphatés du Nord Ouest des USA (Juste *et al.*, 1995).

### **2.3.2 - Origines anthropogéniques**

La production mondiale de cadmium est en continuelle expansion. Evaluée à 16 000 tonnes en 1992 (Juste *et al.*, 1995), elle s'élevait à 17 800 tonnes en 2004 (Bertin et Averbek, 2006). Le cadmium n'existe pas à l'état natif, son minerai, le greenockite CdS, est très rare et inexploité. Le cadmium est présent dans presque tous les minerais de zinc et est obtenu industriellement comme sous-produit de la métallurgie du zinc ; la production d'une tonne de zinc s'accompagne obligatoirement de celle de 3 à 4 Kg de cadmium (Juste *et al.*, 1995). Le cadmium est également présent dans des minerais de plomb et de cuivre, ainsi que dans des phosphates naturels, à raison de 34 ppm pour les phosphates jordaniens et de 380 ppm pour les phosphates tunisiens.

Outre les secteurs environnant les usines de production de zinc, de très nombreuses activités anthropiques sont sources de pollution par le cadmium. Au nombre de celles-ci, on peut citer : les usines métallurgiques, chimiques (pigments, matières plastiques, peintures, batteries Ni-Cd..), de matériaux de construction, de pâte à papier, les raffineries de pétrole. Les égouts ou émissions de particules résultant de ces différentes activités, l'épandage des boues résiduares des stations d'épuration, l'utilisation massive de fertilisants (à cause des



impuretés qu'ils renferment), de pesticides sont responsables de la contamination de notre écosystème.

La pollution du sol peut aussi apparaître directement de l'air. C'est ainsi que la fumée du charbon et des cigarettes, le trafic routier... se traduisent par une dispersion de particules dans l'atmosphère qui, par dépositions sèches ou avec les précipitations (dépositions humides), apportent des quantités importantes de métaux lourds dans le sol et les eaux.

Résultant des différentes activités anthropiques, l'apport mondial de Cd dans le sol a été évalué en 1990 par Nriagu à 22 000 tonnes de cadmium /an.

Le sol peut avoir à l'égard des éléments minéraux trois réactions différentes : stockage (insolubilisation, adsorption), libération « par le haut » (transmission aux plantes) ou libération « par le bas » (transfert dans les eaux souterraines ou la roche-mère) (Koller, 2004).

De nombreux facteurs tels que le pH, la teneur en matières organiques et la présence d'autres éléments minéraux influencent fortement la disponibilité du cadmium pour les plantes (Fodor, 2002). Seule une fraction du cadmium total est disponible ; le cadmium dissous dans la solution du sol, présent sous forme hydratée et complexée par les ligands organiques ou inorganiques, se situe dans la gamme des nanomoles dans la plupart des sols (Sauvé *et al.*, 2000 ; Bolan *et al.*, 2003a, b, c ; Clemens, 2006)

Selon Wagner (1993), dans les sols peu contaminés par les activités humaines, la teneur en cadmium de la solution du sol est comprise entre 0,04 et 0,32  $\mu\text{M}$  tandis que dans les sols moyennement pollués, elle se situe entre 0,32 et 1  $\mu\text{M}$  (Sanita di Toppi et Gabrielli, 1999). Dans les sols contenant plus de 35  $\mu\text{M}$  dans la solution du sol, seules les espèces présentant une tolérance au cadmium ou une hyperaccumulation sont capables de survivre à l'exemple de *Thlaspi caerulescens* (Brown *et al.*, 1994).

Bien qu'étant un élément non essentiel pour la croissance végétale, le cadmium est facilement absorbé par les racines et transporté vers les parties aériennes (Wagner, 1993) et son accumulation dans les parties comestibles constitue la voie principale d'entrée de ce métal toxique dans la chaîne alimentaire humaine (Chaney *et al.*, 1987 ; Gupta et Gupta, 1998 ; Järup *et al.*, 1998 ; McLaughlin *et al.*, 1999).

### **2.3.3 - Toxicité humaine**

Les premières observations portant sur la toxicité du cadmium chez l'homme furent faites au Japon vers les années 1950. Le cadmium, provenant d'une mine de montagne avait produit une pollution de la rivière Jinzu dont l'eau était utilisée pour l'irrigation des rizières. L'ingestion orale de ce riz par les habitants aboutissait à une forte accumulation du cadmium

dans le corps humain et à une maladie appelée au Japon Itai-Itai (qui signifie « j'ai mal, j'ai mal », phrase souvent répétée par les malades) (Juste *et al.*, 1995 ; Kobayashi *et al.*, 2002 ; Nordberg et the ChinaCad Group, 2003 ; Uetani *et al.*, 2006).

L'ingestion par voie orale d'une dose unique de 10 mg de métal conduit à des troubles intestinaux et à une insuffisance rénale. Si la dose ingérée est plus importante, la mort peut survenir dans les 24 h (Juste *et al.*, 1995).

L'exposition chronique au cadmium, par inhalation ou ingestion, se traduit par des désordres sévères au niveau des reins, des poumons et des os incluant l'ostéoporose et l'ostéomalacie (rachitisme adulte) (Nomiyama et Nomiyama, 1998 ; Kazantzis, 2004). Ces effets négatifs sur la santé humaine sont dus à une vitesse d'excrétion lente (demi-vie de 15 à 20 ans) et à son accumulation dans l'organisme (Bertin et Averbek, 2006). Les autres conséquences de l'exposition chronique au cadmium sont l'hypertension artérielle (Nomiyama et Nomiyama, 2000), une perturbation des organes reproducteurs (Parizek, 1960 ; Hew *et al.*, 1993) et un dysfonctionnement du foie (Nomiyama et Nomiyama, 1998). Une augmentation des cas de certains cancers, en particulier des poumons, est observée chez les populations exposées au cadmium (Waalkes, 2000). La transformation cellulaire induite par le cadmium et la tumorigenèse sont associées à une activation d'oncogènes et à la production de ROS (Joseph *et al.*, 2001 ; Filipic et Hei, 2004).

### **2.3.4 - Le cadmium et les plantes**

Le cadmium est un élément non nécessaire pour les plantes et il est hautement toxique. Sa toxicité est considérée de 2 à 20 fois plus élevée que celle des autres métaux lourds (Das *et al.*, 1997) et, pour Pahlsson (1989), il constitue le quatrième métal le plus toxique pour les plantes vasculaires. Cependant, la sensibilité à l'égard du cadmium varie suivant les espèces et même les cultivars d'une même espèce (Inouhe *et al.*, 1994 ; Kuldeep et Brar, 2002 ; Fodor, 2002 ; Lindberg et Greger, 2002). Bien qu'un nombre restreint de plantes tolèrent et/ou accumulent de fortes teneurs de ce métal, toutes les plantes manifestent des symptômes de toxicité qui apparaissent également chez les plantes tolérantes pour de plus fortes concentrations en métal.

#### **2.3.4.1 - Effets sur la croissance**

Parmi les symptômes visibles, le cadmium induit une inhibition de la croissance des différents parties des plantes. Ainsi, il produit une réduction de la biomasse des différents

organes chez des plants aussi variés que le haricot (Poschenrieder *et al.*, 1989), le pois (Sandalio *et al.*, 2001 ; Chaoui *et al.*, 2004), le tournesol (Di Cagno *et al.*, 1999 ; Groppa *et al.*, 2007a), le riz (Fodor, 2002 ; Hassan *et al.*, 2005 ; Aina *et al.*, 2007), le saule et le peuplier (Lunackova *et al.*, 2003 ; Cosio *et al.*, 2005), l'ail (Liu *et al.*, 2003/4) et des plantes du genre *Brassica* comme le colza (Larsson *et al.*, 1998) et la moutarde indienne (Haag-Kerwer *et al.*, 1999). Ces inhibitions de la croissance s'accompagnent de changements anatomiques, structuraux et ultrastructuraux importants au niveau des feuilles (Baryla *et al.*, 2001 ; Sandalio *et al.*, 2001) mais également des racines (Lunackova *et al.*, 2003/4 ; Cosio *et al.*, 2005 ; Patel *et al.*, 2005). La réduction de l'élongation racinaire peut être causée par une inhibition de la division cellulaire et de la synthèse des polysaccharides pariétaux (Ernst *et al.*, 1992 ; Punz et Sieghart, 1993).

L'exposition à long terme au cadmium produit au niveau des feuilles, l'apparition du phénomène de chlorose due à une diminution de la teneur en chlorophylle (Padmaja *et al.*, 1990 ; Stobart *et al.*, 1985 ; Lagriffoul *et al.*, 1998 ; Larsson *et al.*, 1998 ; Di Cagno *et al.*, 1999 ; Baryla *et al.*, 2001 ; Fodor, 2002 ; Cosio *et al.*, 2005).

#### **2.3.4.2 - Effets sur les processus métaboliques**

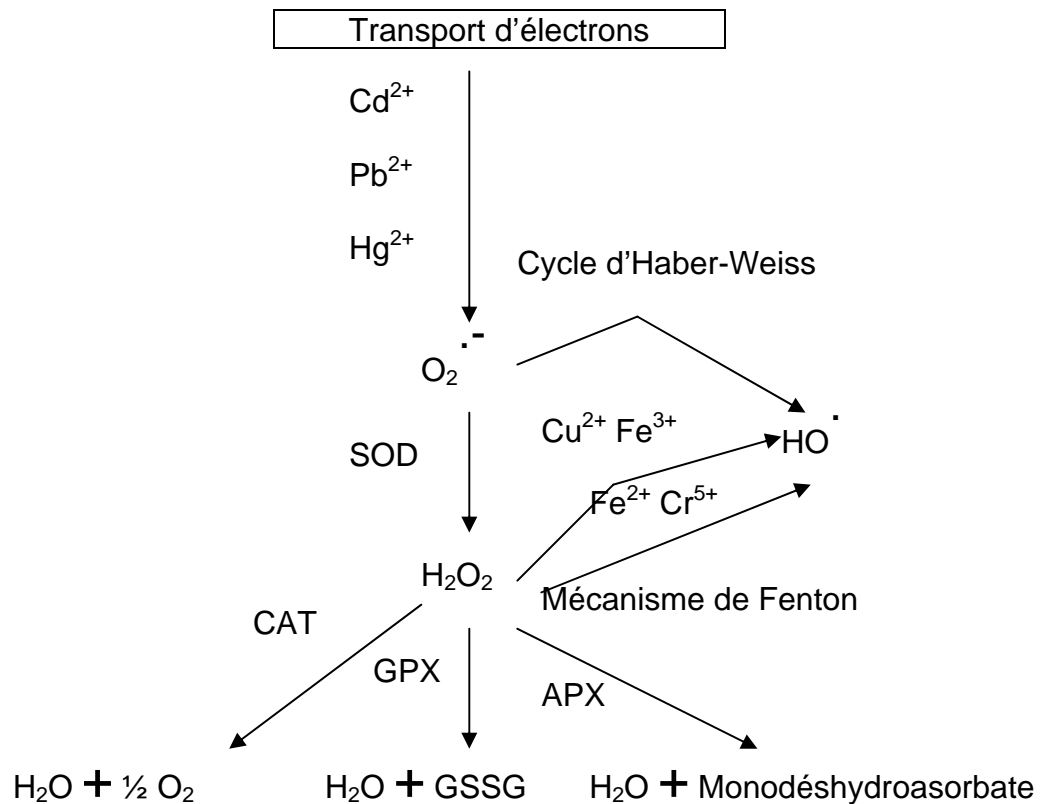
L'inhibition de la croissance par le cadmium est interprétée de différentes façons : altération de l'équilibre hydrique de la plante ou/et effets direct et indirect sur la photosynthèse, processus primaire fournisseur d'énergie chez les plantes (Krupa et Baszynski, 1995 ; Mysliwa-Kurdziel et Stralka, 2002 ; Mysliwa-Kurdziel *et al.*, 2002). En effet, à la réduction de la teneur en chlorophylle induite par le cadmium, s'ajoute une inhibition directe de l'activité des photosystèmes et de l'assimilation du CO<sub>2</sub> par la Rubisco (Romanowska, 2002). De plus, la disponibilité en CO<sub>2</sub> peut être réduite par un abaissement de la conductance des stomates observée dans certains cas, sous l'effet du cadmium (Ali *et al.*, 2000 ; Sandalio *et al.*, 2001). L'augmentation de la résistance des stomates entraîne obligatoirement une baisse de la transpiration et donc de l'absorption et de la distribution des macro- et micro-éléments dans la plante (Gussarson, 1994 ; Gussarson *et al.*, 1996 ; Sandalio *et al.*, 2001 ; Krupa *et al.*, 2002 ; Pal *et al.*, 2006), en particulier du potassium et des nitrates (Prasad, 1995 ; Fodor, 2002). La conséquence directe en est alors une réduction de la croissance (Poschenrieder *et al.*, 1989 ; Haag-Kerwer *et al.*, 1999 ; Sandalio *et al.*, 2001).

#### **2.3.4.3 - Sites d'action et stress oxydatif**

Les symptômes de toxicité sont aussi le résultat d'interactions du cadmium au niveau cellulaire et moléculaire.

La toxicité due au cadmium peut résulter de sa liaison aux groupes thiols des protéines entraînant l'inhibition de leur activité ou la destruction de leur structure (Van Assche et Clijters, 1990 ; Prasad, 1995). Le cadmium peut aussi prendre la place, au centre actif de la molécule, des cations divalents, composants catalytiques des enzymes (Siedlecka et Krupa, 2002).

L'exposition des plantes aux métaux lourds induit un stress oxydatif parce qu'ils sont impliqués dans plusieurs types de mécanismes qui génèrent des espèces réactives de l'oxygène (ROS) : l'anion superoxyde  $O_2^{\cdot-}$ , le peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$ , et le radical hydroxyle  $OH^{\cdot}$  (Figure 1).



**Figure 1 :** Production des espèces réactives de l'oxygène (ROS) par les métaux lourds (d'après Benavides *et al.*, 2005).

Une production transitoire de ROS accompagne toujours chez les plantes les processus physiologiques normaux tels que la respiration et la photosynthèse (Asada et Takahashi, 1987). Bien que quelques ROS peuvent agir comme molécules signal, en modifiant

l'expression de certains gènes et en modulant l'activité de protéines spécifiques de défense, tous les ROS, à hautes concentrations, peuvent être extrêmement nuisibles pour les organismes. Ils peuvent induire une oxydation des protéines, des lipides et des acides nucléiques, conduisant à des altérations des structures cellulaires et à la mutagenèse (Halliwell et Gutteridge, 1999).

Le cadmium, à l'inverse des métaux de transition tels que le fer et le cuivre, ne participe pas directement à la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), à savoir par les réactions de Fenton et d'Haber-Weiss, (Figure 1). Cependant, c'est un métal hautement réactif qui stimule la formation des ROS, conduisant au développement d'un stress oxydatif secondaire (Siedlecka et Krupa, 2002). Les ROS sont en effet capables d'oxyder les groupes thiols des protéines, affectant ainsi l'activité de nombreuses enzymes (Dietz , 2005) mais aussi de provoquer la peroxydation des lipides, conduisant à une altération des fonctions des membranes (Benavides *et al.*, 2005). En outre, la modification par le cadmium de la composition des phospholipides des membranes contribue également à la modification de leurs propriétés (Olmos *et al.*, 2003 ; Romero-Puertas *et al.*, 2004 ; Fodor, 2002).

Les symptômes du stress oxydatif dus au cadmium sont en fait une conséquence de sa liaison avec GSH, produisant un épuisement du glutathion réduit et l'empêchant ainsi d'assurer sa fonction d'élimination des ROS (Clemens,2006).

#### **2.3.4.4 – Absorption, Chélation, Séquestration et Translocation**

##### **2.3.4.4.1 - Absorption**

L'absorption du cadmium par les racines est déterminée par la concentration en cadmium du sol et par sa disponibilité biologique. Seule une fraction du cadmium est disponible pour l'absorption. Le cadmium dissous dans la solution du sol, sous forme d'ions libres hydratés et complexés par des ligands organiques et inorganiques, est présent dans la plupart des sols dans la gamme de concentrations des nanomoles (Wagner, 1993). De nombreux facteurs tels que le pH du sol, le contenu en matières organiques et la concentration des autres éléments minéraux peuvent influencer fortement la fraction de cadmium disponible (Sauvé *et al.*, 2000). En effet, l'absorption du cadmium semble être en compétition avec des éléments tels que K, Ca, Mg, Fe, Mn, Cu, Zn, Ni pour les mêmes transporteurs transmembranaires (Cseh, 2002 ; Benavides *et al.*, 2005 ; Clemens, 2006 ; Pal *et al.*, 2006).

Au niveau des racines, le continuum apoplastique de l'épiderme et du cortex est facilement perméable aux solutés. La paroi des cellules de la couche de l'endoderme agissant comme une barrière pour la diffusion apoplastique, les solutés doivent alors passer dans le symplasme racinaire avant qu'ils ne puissent entrer dans le xylème.

Le transport membranaire du cadmium dans les cellules est alors vraisemblablement réalisé par des transporteurs d'autres ions divalents en particulier du fer et du zinc (Cosio *et al.*, 2004 ; Benavides *et al.*, 2005 ; Clemens, 2006) mais probablement aussi par les canaux à calcium (Clemens, 2006).

Ainsi, chez *Arabidopsis thaliana*, le transporteur du fer ferreux IRT1 (Iron Regulated Transporter), qui appartient à la famille ubiquitaire ZIP de transporteurs de métaux (Zinc Regulated Transporter/IRT Related proteins), pourrait contribuer à l'influx racinaire de différents cations dont le cadmium (Briat et Lebrun 1999 ; Guerinot, 2000 ; Clemens, 2006).

Par ailleurs, chez l'hyperaccumulateur *Thlaspi caerulescens*, le transport du zinc, réalisé par le transporteur ZNT1, appartenant aussi à la famille ZIP, s'avère également capable de prendre en charge le cadmium (Hall, 2002 ; Clemens, 2006).

Une autre famille de transporteurs de métaux permettant potentiellement l'entrée du cadmium est constituée par la famille Nramp (protéines de macrophages associées à la résistance naturelle). La surexpression du gène AtNramp3 chez *Arabidopsis thaliana* lui confère une hypersensibilité au cadmium (Thomine *et al.*, 2000) et le transporteur Nramp3 serait localisé au niveau du tonoplaste (Clemens, 2006) (Figure 2).

Normalement, les ions cadmium sont majoritairement retenus dans les racines et seules, de petites quantités sont transportées vers les parties aériennes (Cataldo *et al.*, 1983).

#### **2.3.4.4.2 - Chélation et séquestration**

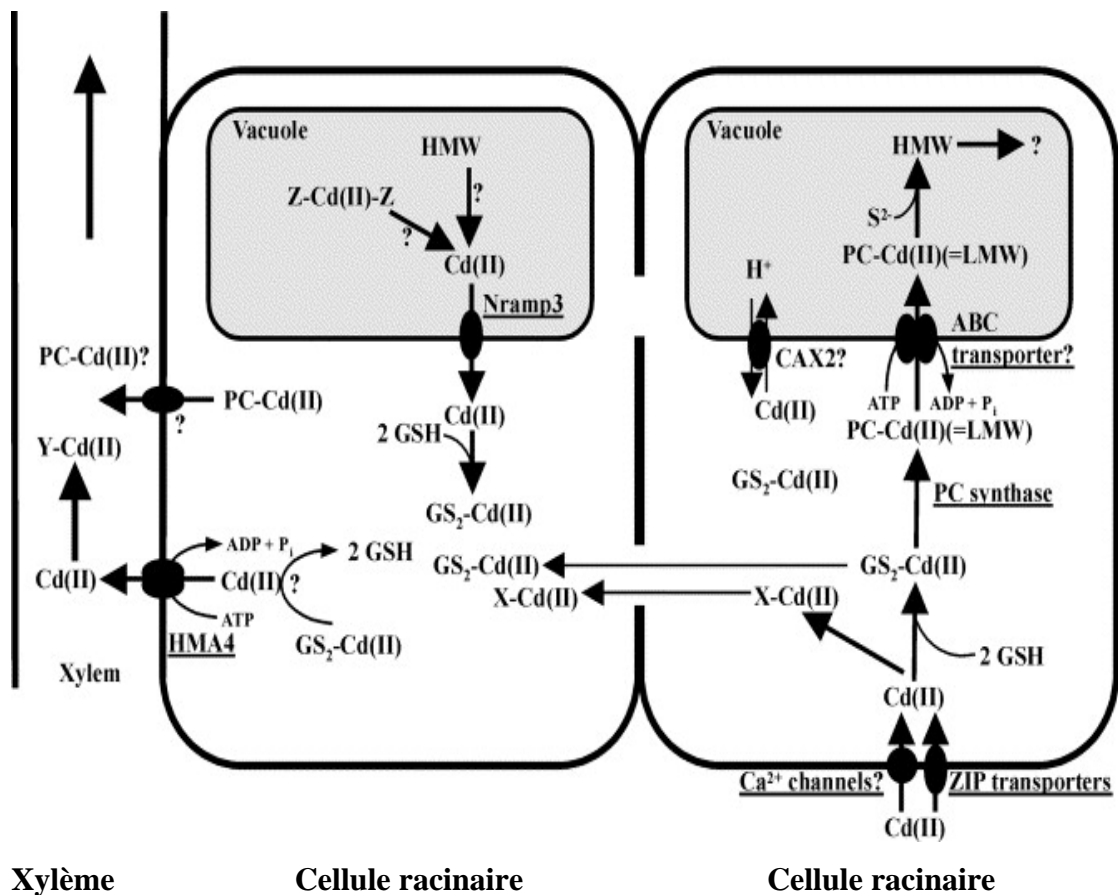
Les voies de séquestration du métal dans la racine jouent un rôle en déterminant la vitesse de translocation vers les parties aériennes de la plante.

Après l'entrée dans le cytosol, le cadmium, qui présente une forte affinité pour les thiolates, est en grande partie chélaté par le glutathion ou par des peptides dérivés du glutathion : les phytochélatines mais aussi par des acides organiques comme le citrate (Clemens, 2006).

Les phytochélatines sont synthétisées en réponse à l'exposition à différents ions métalliques et le cadmium en est le plus puissant activateur (Clemens, 2006). Le complexe Cd-phytochélatine, formé dans le cytosol, serait transporté dans la vacuole par un transporteur

de type ABC ; le cadmium libre pouvant également être transporté dans la vacuole selon un antiport  $H^+/Cd$  (Figure 2).

Dans le cytosol, la formation d'un complexe entre le cadmium et le glutathion, permet le transfert du cadmium libre dans le xylème grâce à une pompe d'efflux, le complexe Cd-GSH présentant une grande affinité pour le transporteur d'efflux. Un efflux du complexe entier cadmium-phytochélatine à partir du parenchyme du xylème semble également possible (Clemens, 2006) (Figure 2).



**Figure 2 :** Représentation schématique des processus impliqués dans l'absorption, la séquestration et la translocation du cadmium dans les racines de plantes. (d'après Clemens, 2006). PC = phytochélatine ; GSH = glutathion ; HMW = haut poids moléculaire ; LMW = faible poids moléculaire.

#### 2.3.4.4.3 - Translocation

Après son efflux dans le xylème, le cadmium, libre et lié aux phytochélatines, est transporté vers les parties aériennes de la plante par la sève xylémienne (Salt *et al.*, 1995b ;

Gong *et al.*, 2003). Dans les plantes normales, la teneur en Cd des feuilles est comprise entre 0,1-3  $\mu\text{g} / \text{g M.S.}$ , chez les plantes qui l'excluent, elle est de 0,03  $\mu\text{g} / \text{g M.S.}$  et chez les plantes accumulatrices, de 20  $\mu\text{g} / \text{g MS.}$  (Reeves et Baker, 2000).

La plus grande partie du cadmium accumulé reste dans les racines, seules de petites quantités sont transportées vers les parties aériennes. Ainsi, chez le blé, 78 % du cadmium sont retenus dans les racines (Zhang *et al.*, 2000). En général, la teneur en cadmium des plantes diminue dans l'ordre suivant : racines > tiges > feuilles > fruits > graines. L'accumulation de cadmium dans les fruits reste controversée. Pour Moral *et al* (1994), bien que le cadmium soit facilement transporté vers les parties aériennes des plants de tomate, aucune détection de Cd n'était faite dans les fruits. A l'opposé, Wenzel *et al*, (1996) et Hart *et al.* (1998) émettent l'hypothèse d'une accumulation de cadmium dans les fruits, pouvant résulter d'une redistribution par le phloème.

#### **2.3.4.5- Mécanismes de défense induits par le cadmium**

Les mécanismes conduisant à la tolérance au métal lourd peuvent être divisés en deux groupes : les stratégies d'exclusion et les stratégies de tolérance. Les mécanismes d'exclusion limitent la pénétration du métal, l'excluant ainsi des tissus de la plante. Les plantes présentant des mécanismes de tolérance sont capables d'accumuler, de stocker et d'immobiliser le métal.

Le premier système de défense fonctionne au niveau racinaire et met en jeu, outre les processus de chélation et de séquestration rapportés dans la figure 2, en raison de leur implication dans l'absorption, la distribution et l'accumulation du cadmium, une immobilisation du cadmium par les composés pariétaux : sites pectiques et groupes histidyls (Leita *et al.*, 1996). La tolérance pourrait aussi impliquer le plasmalemmes soit en réduisant l'absorption soit en stimulant l'efflux des métaux lourds ayant été absorbés. Le nombre d'exemples d'exclusion est tout à fait limité chez les plantes supérieures ; une vitesse réduite d'absorption d'arsenic a toutefois été montrée chez un génotype d'*Holcus lanatus* tolérant à ce métal (Hall, 2002). L'efflux actif de métaux comme stratégie de contrôle du métal intracellulaire n'a été mise en évidence que chez les bactéries et les cellules animales (Hall, 2002).

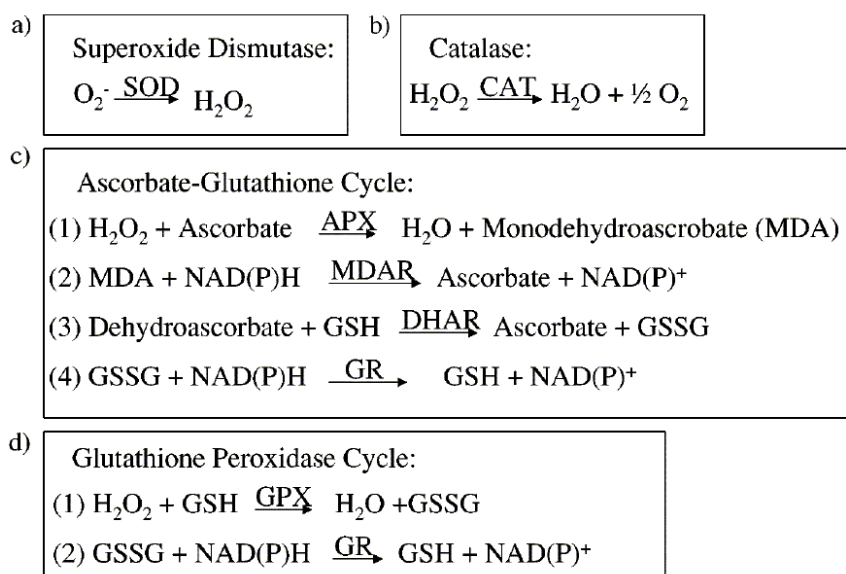
La compartimentation du cadmium peut aussi se réaliser au niveau foliaire, de façon identique à celle rapportée au niveau racinaire dans la figure 2. Une particularité observée chez *B. juncea* et le tabac est un stockage préférentiel du cadmium dans les trichomes des feuilles (Salt *et al.*, 1995b ; Choi *et al.*, 2001).



Le rôle des phytochélatines dans la chélation des métaux et du cadmium en particulier, en relation avec la tolérance au cadmium, a fait l'objet de nombreuses études rapportées par Cobett (2000), Benavides *et al.* (2005) et Clemens (2006). A titre d'exemple, en utilisant *Brassica juncea*, Haag-Kerwer *et al.* (1999) montrent que l'accumulation du cadmium s'accompagne d'une induction rapide de la biosynthèse de phytochélatines, théoriquement suffisante pour assurer une protection des processus physiologiques de la plante.

Les mécanismes pouvant générer des ROS sous l'effet des métaux lourds sont rapportés dans la figure 1. Pour se protéger de l'action destructrice de ces ROS, les plantes mettent en oeuvre des systèmes d'élimination de ces radicaux libres : enzymes antioxydantes et composants non enzymatiques (Noctor et Foyer, 1998 ; Ann Peer *et al.*, 2005).

Parmi les enzymes antioxydantes, la superoxyde dismutase, présente dans les chloroplastes et les mitochondries, permet la transformation de  $O_2^{\cdot -}$  en  $H_2O_2$  ; ce dernier est directement éliminé par la catalase dans les peroxysomes mais aussi par la gaïacol peroxydase présente dans le cytosol, la vacuole et la paroi (Figure 3).

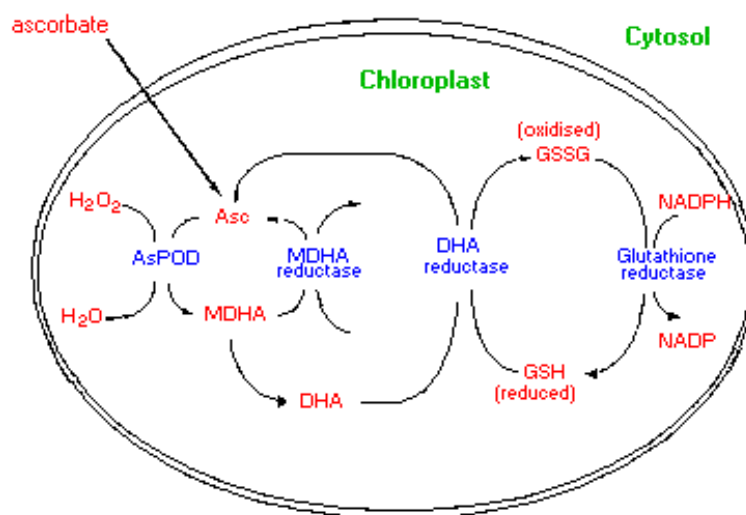


**Figure 3** : Principales réactions enzymatiques permettant d'élimination des espèces réactives de l'oxygène (ROS) : superoxyde dismutase (SOD), catalase (CAT), cycle ascorbate-glutathion, et cycle de la glutathion peroxydase (GPX) (Appel et Hirt, 2004).

$H_2O_2$  est également éliminé par l'action du cycle ascorbate-glutathion impliquant les réactions d'oxydo-réductions successives de l'ascorbate, du glutathion et du NADPH, qui

sont catalysées par l'ascorbate peroxydase (APX), la monodéhydroascorbate réductase (MDAR), la déhydroascorbate réductase (DHAR) et la glutathion réductase (GR). Chez les plantes, le cycle ascorbate-glutathion peut opérer dans le cytosol et dans tous les organites dans lesquels une détoxification des ROS est nécessaire (Figure 3).

La figure 4 montre une représentation du cycle ascorbate-glutathion, se réalisant dans le chloroplaste où l'ascorbate qui est présent à forte concentration dans la stroma, constitue le principal substrat pour la détoxification de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Noctor et Foyer, 1998).



**Figure 4** : Cycle ascorbate-glutathion (Foyer *et al.*, 1994)

De nombreux travaux confirment une augmentation des activités anti-oxydantes sous l'effet des métaux lourds (Lagriffoul *et al.*, 1998 ; Baccouch *et al.*, 1998, 2001 ; Dixit *et al.*, 2001 ; Pal *et al.*, 2002 ; Zacchini *et al.*, 2003). Cependant, au-delà d'une certaine concentration en cadmium, une inhibition de certaines activités enzymatiques antioxydantes peut être observée (Gallego *et al.*, 1996 ; Srivastava *et al.*, 2004).

Parmi les composants non enzymatiques, impliqués dans l'élimination des ROS, figurent deux types de molécules organiques : la proline et les polyamines.

Une des stratégies mise en oeuvre par les plantes pour contrecarrer les effets toxiques des métaux lourds, est constituée par une accumulation d'acides aminés et plus particulièrement de la proline (Sharma et Dietz, 2006). Une augmentation de ce soluté compatible a été observée sous l'effet du cadmium chez le tournesol, la silène, le haricot et le soja (Kastori *et al.*, 1992 ; Schat *et al.*, 1997 ; Zhang *et al.*, 2000 ; Balestrasse *et al.*, 2005). Outre son rôle reconnu d'osmoticum, la proline permettrait d'éliminer ou de réduire la

production d'espèces toxiques de l'oxygène telles que l'oxygène singulet ( $^1\text{O}_2$ ) et le radical hydroxyle ( $\text{OH}^\cdot$ ), assurant ainsi une protection des constituants cellulaires (Sharmila et Pardha Saradhi, 2002).

De nombreux travaux ont montré une accumulation de polyamines, en particulier de la putrescine, en réponse à des stress environnementaux variés (Bouchereau *et al.*, 1999). La putrescine permettrait alors d'éliminer les radicaux libres (Drolet *et al.*, 1986). Seuls, quelques travaux ont porté sur leur implication dans la réaction des plantes aux métaux lourds (Sharma et Dietz, 2006) ; c'est pourquoi leur participation dans le traitement au cadmium sera recherchée.

## **2.4 - Polyamines libres et conjuguées**

### **2.4.1 - Les polyamines libres**

#### **2.4.1.1 - Métabolisme**

Les polyamines (PAs) sont des composés aliphatiques, de faible poids moléculaire, de nature polycationique au pH cellulaire et présentes dans toutes les cellules végétales (Galston et Kaur-Sawhney, 1990 ; Bouchereau *et al.*, 1999 ; Igarashi et Kashiwagi, 2000).

L'importance des PAs a d'abord été mise en évidence au cours de la division cellulaire chez les microorganismes, et cette corrélation a ensuite été établie pour les cellules animales (Tabor et Tabor, 1976). Depuis une vingtaine d'années, les PAs chez les végétaux constitue un axe de recherche important.

Ces composés répondent à deux des critères qui définissent les régulateurs de croissance :

- Ils existent dans tous les types de cellules et exercent un contrôle sur la croissance et le développement,
- une altération de leur voie de biosynthèse perturbe considérablement le développement des organismes.

Les PAs sont considérées comme un groupe de régulateurs de croissance à part entière (Galston et Kaur-Sawhney, 1995) en raison d'une part, de leur distribution et de la régulation de leur métabolisme par des stimuli exogènes (lumière, hormones, stress) et, d'autre part, de leurs effets exogènes.

Le métabolisme des PAs chez les végétaux supérieurs est plus complexe que celui établi chez les bactéries ou les cellules animales et présente un certain nombre de caractéristiques originales (Tiburcio *et al.*, 1990), à savoir :

- existence de deux précurseurs de la putrescine : l'arginine et l'ornithine (Figure 5) ;
- partage d'un précurseur commun avec une phytohormone, l'éthylène (Galston et Kaur-Sawhney, 1987) ;
- utilisation des PAs comme précurseurs de multiples métabolites secondaires tels que les alcaloïdes (nicotine, tropane...) (Flores *et al.*, 1989).
- enfin, présence dans les cellules végétales des PAs sous deux formes : libres ou conjuguées à d'autres molécules, les deux formes ayant des rôles importants (Martin-Tanguy, 1985).

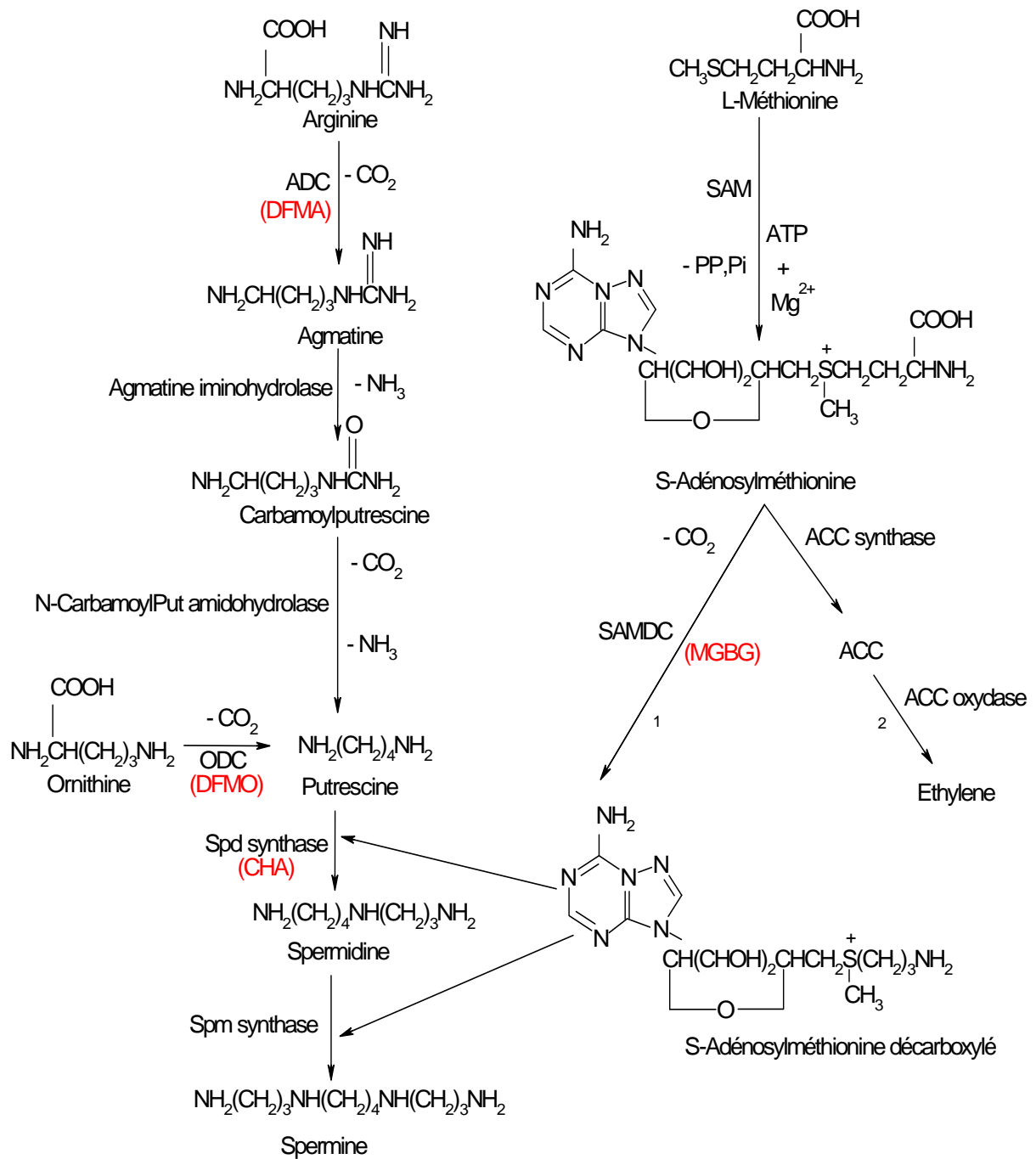
Les voies de biosynthèse des trois PAs majeures : putrescine, spermidine et spermine sont bien établies et leurs enzymes bien identifiées (Tiburcio *et al.*, 1997 ; Kumar *et al.*, 1997). Les teneurs cellulaires en PAs varient de quelques micromoles à des valeurs plus élevées de l'ordre des millimoles (Galston et Kaur-Sawhney, 1990).

Chez les plantes, il existe deux voies possibles pour la synthèse de la Put : à partir de l'arginine et de l'ornithine respectivement via les activités de l'arginine décarboxylase (ADC, EC 4.1.1.9) et de l'ornithine décarboxylase (ODC, EC 4.1.1.17) (Figure 5) (Martin-Tanguy, 2001). Comme dans les cellules animales et les champignons, l'ODC catalyse la décarboxylation directe de l'ornithine en Put. Par une voie alternative, comme chez les bactéries, l'ADC produit, par décarboxylation de l'arginine, de l'agmatine qui est ensuite convertie en *N*-carbamoylputrescine par l'agmatine iminohydrolase puis en Put par la *N*-carbamoylputrescine amidohydrolase (Figure 5) (Smith, 1980 ; Martin-Tanguy, 2001 ; Kusano *et al.*, 2007).

La Spd et la Spm sont formées à partir de la Put par l'addition respective d'un ou de deux groupes aminopropyl provenant de la décarboxylation de la *S*-adénosylméthionine (SAM) et ces réactions sont catalysées par la Spd synthase (SDE, EC 2.5.1.16) et la Spm synthase (SME, EC 2.5.1.22) (Figure 5) (Galston et Kaur-Sawhney, 1987 ; Tiburcio *et al.*, 1990 ; Martin-Tanguy, 2001).

Les gènes codant pour les différentes enzymes de biosynthèse ont été isolés ces dernières années à partir de différentes plantes et en particulier d'*Arabidopsis thaliana* (Watson *et al.*, 1997 ; Hanzawa *et al.*, 2000, 2002 ; Kusano *et al.*, 2007).

Les contributions relatives de l'ADC et de l'ODC à la voie de synthèse des polyamines varient selon les espèces végétales, les stades de développement et en réponse aux stress (Smith, 1985). L'activité ADC est normalement impliquée dans les réponses aux stress tandis que l'activité ODC est davantage associée à la croissance et au développement (Bouchereau *et al.*, 1999).



**Figure 5 :** Voies de biosynthèse des polyamines chez les végétaux. DFMA :  $\alpha$ -Difluorométhylarginine, DFMO :  $\alpha$ -Difluorométhylornithine, CHA : cyclohexylammonium, MGBG : méthylglyoxal-bis-(guanylhyazone), sont les inhibiteurs respectivement de l'arginine décarboxylase, de l'ornithine décarboxylase, de la spermidine synthase et de S-Adénosyl-méthionine décarboxylase. (d'après Martin-Tanguy, 2001).

Des réactions d'interconversion de la Spm et de la Spd respectivement en Spd et en Put ont été rapportées par De Agazio *et al.* (1995), réactions qui se feraient par l'intermédiaire d'acétylspermine et d'acétylspermidine (Tassoni *et al.*, 2000 ; Kusano *et al.*, 2008).

Par ailleurs, les PAs et l'éthylène possèdent un précurseur commun : la SAM ; en effet, sous l'action de l'ACC synthase, la SAM peut produire de l'ACC (acide 1-aminocyclopropane-1-carboxylique) qui, après oxydation, génère de l'éthylène (Adams et Yang, 1979 ; Evans et Malmberg, 1989) (Figure 5).

Concernant la dégradation des PAs chez les végétaux, deux types d'oxydases sont impliquées : les diamines oxydases (CuAO ou DAO, EC 1.4.3.6) qui catalysent la désamination oxydative des diamines (Put et cadavérine) et les polyamines oxydases (PAO, EC 1.5.3.11) celle des polyamines. Ces différentes oxydases produisent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et un aldéhyde qui peut se cycliser après élimination d'une molécule d'eau.

#### **2.4.1.2 – Rôles physiologiques**

Les polyamines sont nécessaires lors de la division cellulaire chez les animaux comme chez les végétaux (Tabor et Tabor, 1976). La croissance et la division cellulaire se traduisent par des taux élevés de PAs endogènes pour de nombreux systèmes biologiques *in vivo* comme *in vitro* (Bagni *et al.*, 1982 ; Smith, 1985 ; Evans et Malmberg, 1989 ; Fowler *et al.*, 1996 ; Kusano *et al.*, 2008).

Les PAs sont essentielles lors du passage de la phase G1 à la phase S (Fuller *et al.*, 1977 ; Serafini-Fracassini *et al.*, 1980 ; Heby, 1981 ; Galston et Kaur-Sawhney, 1987). En effet, la diminution du taux de PAs conduit à l'arrêt du cycle cellulaire (Flores *et al.*, 1989 ; Kusano *et al.*, 2008).

Les PAs se trouvent sous forme polycationique au pH cellulaire et de ce fait présentent une grande affinité pour des polyanions tels que les acides nucléiques et les phospholipides membranaires ; le mode d'action des PAs peut être expliqué par l'association à ces macromolécules. Une fois liées, les PAs pourraient moduler la synthèse, l'activité des molécules et réguler les étapes de la mitose ou de la méiose (Tabor et Tabor, 1984 ; Grimes *et al.*, 1986 ; Galston et Kaur-Sawhney, 1987).

Les PAs peuvent également se lier de façon covalente à des protéines spécifiques grâce à des enzymes transglutaminases et cette conjugaison des PAs semble jouer un rôle important, en protégeant les protéines des chloroplastes contre l'action des protéases,

préservant ainsi l'efficacité de la photosynthèse (Bagni et Tassoni, 2001 ; Navakoudis *et al.*, 2003).

En se fixant sur les groupements anioniques des phospholipides comme sur d'autres sites membranaires, les PAs modifient la rigidité et la perméabilité membranaire (Roberts *et al.* 1986 ; Liu *et al.*, 2000).

De nombreux travaux ont mis en évidence l'implication des PAs dans les processus morphogénétiques que sont la floraison et la rhizogenèse. Ainsi il existe un lien étroit entre les PAs et les événements physiologiques conduisant à la floraison (Bernier *et al.*, 1993 ; Caffaro et Vicente, 1994 ; Havelange *et al.*, 1996 ; Martin-Tanguy, 1996 ; Galston *et al.*, 1997) ; en outre, les PAs sont essentielles pour la morphogenèse des organes floraux et la maturation des fruits (Egea-Cortines et Mizrahi, 1991 ; Slocum et Galston, 1985 ; Kakkar *et al.*, 2000). La réponse rhizogénique est également fortement dépendante de la teneur en PAs (Burtin *et al.*, 1990 ; Torrigiani *et al.*, 1993 ; Féray *et al.*, 1993, 1994 ; Faivre-Rampant *et al.*, 2000 ; Le Guen-Le Saos et Hourmant, 2001).

Par ailleurs, les PAs sont impliquées dans l'embryogenèse somatique et l'activité de l'ADC semble déterminante dans l'initiation du processus de régénération, celle de l'ODC dans la division cellulaire (Torné *et al.*, 1994 ; Bernet *et al.*, 1998 ; Bertoldi *et al.*, 2004).

Les PAs sont également impliquées dans les réponses aux stress biotiques et abiotiques. Ainsi, ont été rapportées des modifications des teneurs en PAs sous l'effet des radiations UV (Smith *et al.*, 2001), des pesticides (DiTomaso *et al.*, 1988 ; Zheleva *et al.*, 1993), des stress hydrique (Tiburcio *et al.*, 1986 ; Aziz *et al.*, 1997 ; Gonzalez *et al.*, 2003 ; Huaipan *et al.*, 2006) et salin (Ali, 2000 ; Zhao *et al.*, 2003 ; Maiale *et al.*, 2004), des températures basses (Racz *et al.*, 1996 ; Lee, 1997 ; Shen *et al.*, 2000) ou élevées (Desiderio *et al.*, 1996 ; Königshofer et Lechner, 2002), de déficiences variées (P, S, K<sup>+</sup> et Mg<sup>2+</sup>, saccharose et azote) (Kapneck, 1983 ; Smith, 1984), d'un excès de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (Reggiani *et al.*, 1993 ; Shen *et al.*, 1994 ; Palavan-Ünsal, 1995), de l'ozone et de SO<sub>2</sub> (Palavan-Ünsal, 1995 et de l'infection par des pathogènes (Martin et Martin-Tanguy, 1981 ; Cowley et Walters, 2002 ; Kusano *et al.*, 2008).

Une augmentation significative de la teneur en PAs est généralement observée sous l'effet des stress.

Concernant les stress métalliques, une altération de la teneur en PAs a également été montrée notamment sous l'action du cadmium et du cuivre (Weinstein *et al.*, 1986 ;

Wettlaufer *et al.*, 1991 ; Lesko et Simon-Sarkadi, 2002 ; Kuthanova *et al.*, 2004 ; Pirintsos *et al.*, 2004 ; Balestrasse *et al.*, 2005 ; Groppa *et al.*, 2003, 2007a, b ; Sharma et Dietz, 2006). Cependant, peu est connu concernant les activités de biosynthèse qui aboutissent à l'accumulation des PAs en réponse aux métaux lourds mais cette accumulation de PAs jouerait un rôle protecteur, en piégeant les radicaux libres ou en inhibant leur production et en stabilisant le pH et les membranes (Drolet *et al.*, 1986 ; Tadolini, 1989 ; Lovaas, 1997 ; Ha *et al.*, 1998 ; Groppa *et al.*, 2003 ; Balestrasse *et al.*, 2005).

Cependant, la majorité de ces études a été conduite sur des disques foliaires ou feuilles détachées et peu d'études ont été conduites sur une plante entière en culture.

### 2.4.2 - Les PAs conjuguées

Dans les cellules végétales, les PAs peuvent se lier à diverses molécules, en particulier aux acides hydroxycinnamiques (acides coumarique, férulique et caféique) (Figure 6) (Tiburcio *et al.*, 1990 ; Martin-Tanguy, 1997).

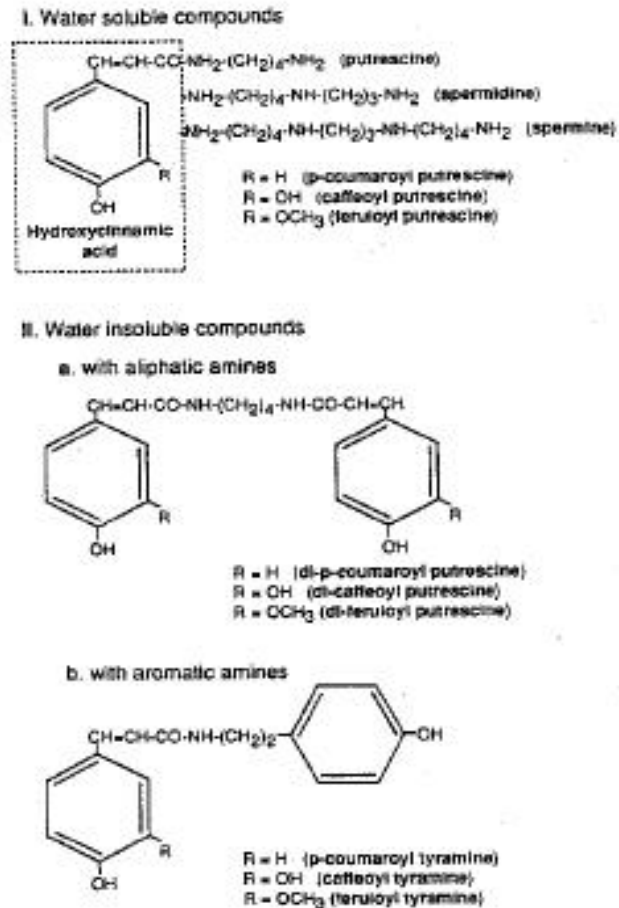
Les amides conjuguées sont classées en deux catégories, les amides basiques, solubles dans l'eau, possédant une fonction amine primaire et les amides neutres, insolubles dans l'eau et dépourvues de fonction ionisable (Figure 6) (Martin-Tanguy, 1985).

Les PAs conjuguées sont associées à différents phénomènes physiologiques et développementaux (Flores et Martin-Tanguy, 1991 ; Bouchereau *et al.*, 1999).

C'est ainsi que les PAs conjuguées s'accumulent dans les apex de tiges lors de l'initiation florale (Cabanne *et al.*, 1981 ; Martin-Tanguy, 1985, 1997 ; Havelange *et al.*, 1996). En outre, sur la base de la composition en PAs conjuguées, on peut non seulement différencier les organes mâles et femelles mais également les parties reproductrices fertiles et stériles (Flores et Martin-Tanguy, 1991).

Les PAs conjuguées sont associées à la formation des racines chez le tabac (Torrighiani *et al.*, 1989 ; Burtin *et al.*, 1990) et au développement des tubercules chez la pomme de terre (Féray *et al.*, 1994). Par ailleurs, des changements de PAs conjuguées accompagnent les réactions d'hypersensibilité aux virus et aux champignons (Martin-Tanguy *et al.*, 1976 ; Torrighiani *et al.*, 1997 ; Legaz *et al.*, 1998 ; Kusano *et al.*, 2008). Cependant, aucune relation claire de cause à effet entre l'augmentation de la teneur en PAs conjuguées et le déclenchement des processus correspondants n'a pu encore être établie.





**Figure 6 :** Structures chimiques de quelques polyamines conjuguées le plus couramment rencontrées (d'après Sun *et al.*, 1991).

Si de façon indiscutable, les PAs libres sont connues pour être transportées par le xylème et le phloème (Friedman *et al.*, 1986 ; Béraud *et al.*, 1992 ; Antognoni *et al.*, 1998), en revanche, aucune trace de formes conjuguées n'est retrouvée dans les exsudats du phloème et du xylème de ricin (Antognoni *et al.*, 1998), bien que Havelange *et al* (1996) aient suggéré un transport phloémien des formes conjuguées lors de l'initiation florale.

## 2.5- La phytoremédiation

### 2.5.1- Définition

L'idée d'utiliser des plantes pour extraire les métaux lourds et leurs composantes fut introduite en 1983, mais le principe est connu depuis 300 ans (Henry, 2000). C'est dans les années 90 que le concept de la remédiation (bio et phytoremédiation) émerge comme une

nouvelle technologie qui utilise les plantes vertes et des microorganismes associés (i.e. bactéries, champignons) pour le nettoyage d'un environnement pollué par les métaux (ici le Cd), les métalloïdes, les radionucléides et les xénobiotiques organiques (Figure 7) (Salt *et al.*, 1995a, 1998 ; McGrath *et al.*, 2002 ; Alkorta *et al.*, 2004 ; Ghosh et Singh, 2005 ; Gratao *et al.*, 2005 ; Pilon-Smits, 2005 ; Smits et Freeman, 2006). Le terme phytoremédiation vient du préfixe grec « phyto » (plante) et du mot latin *remedium* (pour corriger ou éliminer un mal) (Ghosh et Singh, 2005).

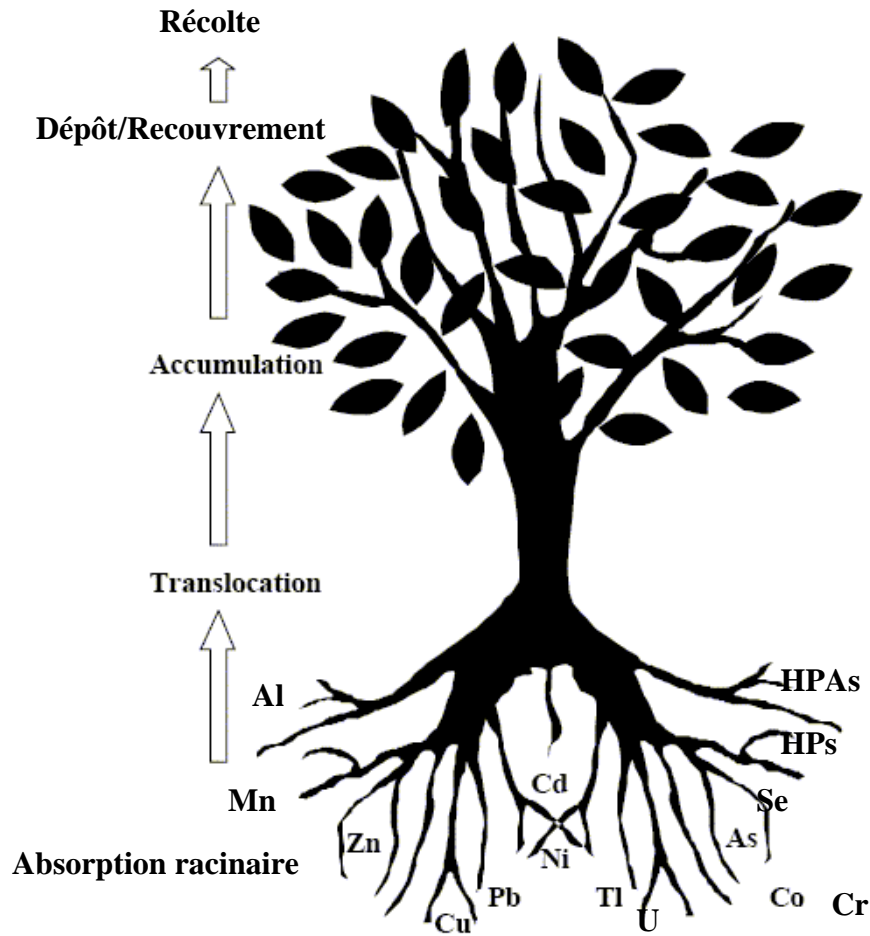
La phytoremédiation comprend plusieurs techniques : la phytoextraction, la phytovolatilisation, la phytostabilisation, la phytodégradation et la rhizofiltration (Gleba *et al.*, 1999 ; Garbisu et Alkorta, 2001 ; Ann Peer *et al.*, 2003, 2005 ; Pilon-Smits, 2005 ; Kirkham, 2006).

## **2.5.2- Les différentes techniques**

### **2.5.2.1- Phytoextraction**

La phytoextraction est une technologie *in situ* liée aux plantes qui sont capables d'absorber les métaux lourds par leurs racines et de les transporter ensuite vers les parties aériennes (Kümar *et al.*, 1995 ; Ebbs *et al.*, 1997 ; Garbisu et Alkorta, 2001 ; Lasat, 2002 ; McGrath *et al.*, 2002 ; Caille *et al.*, 2003 ; McGrath et Zhao, 2003 ; Schwartz *et al.*, 2003 ; Angle et Linacre, 2005 ; Xiaomei *et al.*, 2005 ; Do Nascimento et Xing, 2006 ; Keller, 2006 ; Lestan, 2006). Les tiges et feuilles sont alors récoltées et éliminées des sites pollués. Ceci contribue à rétablir la fertilité de larges zones agricoles, contaminées pour la plupart, dans leur couche supérieure (Figure 7).

Deux stratégies sont proposées pour une phytoextraction réussie des sols contaminés par les métaux lourds et autres polluants : la phytoextraction naturelle et la phytoextraction induite ou assistée par des chélateurs.



**Figure 7** : Phytoextraction des métaux, des métalloïdes, des radionucléides et des composés organiques. HPAs (hydrocarbures polyaromatiques), HPs (hydrocarbures pétroliers) (Alkorta *et al.*, 2004, légèrement modifié).

### 2.5.2.1.1- Phytoextraction naturelle

Pour qu'une plante soit adéquate pour la phytoextraction d'un polluant donné, elle doit être capable durant toute sa vie de résister à la toxicité du polluant et de l'accumuler dans ses parties aériennes. En effet, la phytoextraction naturelle utilise des plantes hyperaccumulatrices qui peuvent naturellement extraire des teneurs importantes de métaux présents sur des sols pollués sans présenter de signes de phytotoxicité (Baker *et al.*, 1994 ; Lombi *et al.*, 2001 ; McGrath et Zhao, 2003 ; Do Nascimento et Xing, 2006 ; Quartacci *et al.*, 2006).

### **2.5.2.1.2- Phytoextraction induite ou assistée par des chélateurs**

Elle est basée sur l'utilisation de chélateurs permettant à des plantes non hyperaccumulatrices mais de biomasse importante d'absorber des teneurs élevées en métaux à partir d'un site pollué. La solubilité des métaux est accrue par des chélateurs tels que l'acide citrique, l'EDTA, l'EDDS, l'EDDHA, le CDTA et le NTA. Ils sont appliqués soit directement sur le sol ou en conditions hydroponiques (Huang *et al.*, 1997 ; Vassil *et al.*, 1998 ; Cooper *et al.*, 1999 ; Epstein *et al.*, 1999 ; Chen et Cutright, 2001 ; Lesage *et al.*, 2005 ; Do Nascimento et Xing, 2006 ; Lestan, 2006 ; Evangelou *et al.*, 2007) soit en pulvérisation foliaire (Meers et Tack, 2004). C'est ainsi que l'EDTA a permis d'améliorer la mobilisation et le transport subséquent de Pb, Cd, Cr, Cu, Ni et Zn par la moutarde indienne et le tournesol (Ann-Peer *et al.*, 2003). Cependant, la haute solubilité dans l'eau de certains complexes chélateur-toxique peut résulter dans leur déplacement vers les couches plus profondes du sol et ceci constitue un risque potentiel important de contamination de l'eau et des estuaires (Lombi *et al.*, 2001 Ann-Peer *et al.*, 2003).

### **2.5.2.2- Phytostabilisation**

La phytostabilisation utilise un couvert végétal pour empêcher la dispersion des contaminants dans les eaux souterraines et l'habitat humain, donc pour les rendre peu mobiles dans les écosystèmes (Alkorta *et al.*, 2004 ; Ghosh et Singh, 2005 ; Krämer, 2005 ; Pilon-Smits, 2005). Certaines plantes immobilisent les contaminants par précipitation dans le sol par les exsudats racinaires ou par accumulation dans les racines (Do Nascimento et Xing, 2006). En outre, les plantes contribuent à la stabilisation du sol. Des projets de phytostabilisation ont été employés ces dernières années, notamment en France (Marseille *et al.*, 2000).

### **2.5.2.3- Phytovolatilisation**

Dans ce procédé, les contaminants solubles sont absorbés par les racines, transportés vers les feuilles et volatilisés dans l'atmosphère par les stomates sous des formes moins toxiques ou après une modification métabolique. Ainsi, le sélénium peut être relâché dans l'atmosphère sous forme de diméthyl sélénite ou de diméthyl disélénite et le mercure volatilisé après réduction (Zayed *et al.*, 1998 ; Ann Peer *et al.*, 2005).

### **Rhizofiltration**

Elle est utilisée pour nettoyer les eaux contaminées et est une combinaison de la phytoextraction et de la phytostabilisation. L'adsorption, l'absorption ou la précipitation des métaux toxiques par les racines jouent un rôle clef dans cette technique et en conséquence, d'importantes surfaces de racines sont requises (Dushenkov *et al.*, 1995 ; Alkorta *et al.*, 2004 ; Ghosh et Singh, 2005). Bien que davantage utilisée pour les contaminants inorganiques, la rhizofiltration a également été appliquée aux eaux contenant des polluants organiques (herbicides, nitrotoluène, hydrocarbures...). Ces composés peuvent être métabolisés et la rhizofiltration devient alors de la phytodégradation (Chaudhry *et al.*, 1998).

### **2.5.2.5- Phytodégradation**

La phytodégradation (ou phytotransformation) consiste à convertir des polluants organiques en composés moins toxiques voire même être totalement minéralisés. Cette décomposition est réalisée grâce à des enzymes variées, internes ou sécrétées par la plante (Chaudhry *et al.*, 1998 ; Ann Peer *et al.*, 2005).

## **2.6- Hyperaccumulation**

L'efficacité de la phytoremédiation est avant tout dépendante de la ou des plantes choisie(s) et conduit à rechercher les plantes aptes à tolérer et à accumuler les métaux.

### **2.6.1- Plantes hyperaccumulatrices**

Les plantes hyperaccumulatrices sont des espèces capables d'accumuler des teneurs élevées en métaux lourds dans leurs organes aériens, à des concentrations 10 à 100 fois plus élevées que celles tolérées par la plupart des plantes (Brooks, 1998 ; Gratao *et al.*, 2005 ; Meharg, 2005 ; Salt et Krämer, 2000).

L'hyperaccumulation de métaux dans les plantes a été mise en évidence en 1865 par Sachs pour *Thlaspi calaminare* (aujourd'hui *T. caerulescens*). L'hyperaccumulation a été confirmée par la mesure de teneurs qui, rapportées à la biomasse sèche aérienne, étaient

supérieures à 0,2 % pour le Cd, 1,2 % pour le Co, 3,8 % pour le Ni et 4 % pour le Zn (Krämer et Chardonnens, 2001). L'hyperaccumulation implique trois processus majeurs (Salt et Krämer, 2000) :

- Absorption rapide des métaux par les racines,
- Taux élevé de translocation des racines vers les parties aériennes,
- Capacité élevée de stockage par compartimentation dans la vacuole.

Avec plus de 397 espèces végétales répertoriées, les plantes hyperaccumulatrices appartiennent à 45 familles différentes (Salt *et al.*, 1998 ; Reeves et Baker, 2000) et environ 75% de ces espèces sont des hyperaccumulateurs de Ni se développant sur des sols à serpentine (Brooks *et al.*, 1974, 1998 ; Brooks et Wither, 1977 ; Jaffré *et al.*, 1976, 1979 ; Gratao *et al.*, 2005).

*Thlaspi caerulescens* est considérée comme une espèce modèle. Métallophyte endémique, hyperaccumulateur principalement du Cd, Zn et Ni, elle constitue l'une des espèces les plus étudiées car elle possède les trois caractéristiques énoncées ci-dessus (Baker *et al.*, 1994 ; Chaudhry *et al.*, 1998 ; Lasat *et al.*, 1998 ; Zhao *et al.*, 2002 ; Ueno *et al.*, 2004).

### **2.6.2- Inconvénients**

Les plantes hyperaccumulatrices se développent naturellement sur des sites riches en métaux et possèdent une capacité naturelle pour extraire des teneurs inhabituellement élevées de métaux et sont capables de les transférer efficacement dans leurs parties aériennes. Une telle capacité justifie l'utilisation de ces plantes pour décontaminer les sols pollués par les métaux (Brooks, 1998).

Cependant, ces plantes ne sont pas idéales pour la phytoremédiation du fait de leur croissance et de leur biomasse faibles. En outre, ces plantes n'accumulent souvent qu'un métal spécifique parmi les différents métaux présents simultanément sur un même site. Ces faits les disqualifient pour la phytoremédiation commerciale des sols pollués par les métaux lourds, particulièrement des sites à contamination multiple (Gleba *et al.*, 1999 ; Krämer, 2005 ; Kirkham, 2006 ; Lestan, 2006).

C'est pour tenter de surmonter ce problème que la culture de plantes ayant une biomasse élevée a été proposée, pour extraire les métaux des sols ; cette phytoextraction, assistée ou non par les chélateurs, devant se réaliser sur une période de temps raisonnable (Huang *et al.*, 1997 ; Lombi *et al.*, 2001 ; Kirkham, 2006).

### 2.6.3- Choix de *Brassica juncea*

La famille des *Brassicaceae* (ex. Crucifères) offre une des sources les plus importantes en espèces oléagineuses et alimentaires. Parmi elles *Brassica napus*, *B. rapa* et *B. juncea* couvrent plus de 11 millions d'hectares des sols agricoles à travers le monde et apportent plus de 8% des huiles consommées sous des conditions climatiques variées (Downey, 1983, 1990). Le Canada, la Chine, le Nord de l'Europe et le continent indien sont les zones majeures de production des espèces de *Brassica* spp. (Downey, 1990). En effet, pour la seule moutarde grise (*Brassica juncea*), la production annuelle en Inde atteint 5 millions de tonnes (FAO, 2003).

*Brassica juncea* est une espèce amphidiploïde (AABB = 36) résultant d'une hybridation spontanée entre la navette (*Brassica rapa*, AA = 20) et la moutarde noire (*Brassica nigra*, BB = 16). C'est une plante connue depuis la plus haute antiquité ; néanmoins, son origine géographique reste peu précise. Certains chercheurs situent ses origines en Afghanistan entre 2300 et 5500 avant Jésus Christ (J.C.). Pour d'autres, elle viendrait de Chine (Dynastie Chou, 247-1122 avant J. C.) où elle servait de condiment. Pour d'autres encore, son berceau serait l'est de l'Inde où elle est utilisée depuis 2300 avant J.C. comme source d'huile alimentaire (<http://www.enesad.fr/fileadmin/medias/enesad>).

Le choix de la moutarde indienne (*Brassica juncea*) peut être défendu par le fait que cette plante a une croissance vigoureuse, une bonne tolérance à la chaleur et à la sécheresse, une résistance aux champignons à pied noir, une accumulation et une tolérance importantes pour les métaux lourds (i.e. Cd, Cu, Zn, Ni, Pb et Se). *B. juncea* a été utilisée dans l'étude de plusieurs processus impliqués dans la phytoremédiation (Kümar *et al.*, 1995 ; *et al.*, 1995).

Les approches transgéniques, combinant les génomes d'un hyperaccumulateur et d'espèces non accumulatrices à biomasse élevée, constituent une alternative prometteuse pour la dépollution des sols et ont fait l'objet d'un certain nombre d'études (Krämer et Chardonnens, 2001 ; Lasat, 2002 ; McGrath et Zhao, 2003 ; Gratao *et al.*, 2005 ; Do Nascimento et Xing, 2006 ; Smits et Freeman, 2006).

L'obtention des régénérants par une pression de sélection en présence de Cd, appliquée en culture *in vitro* (CCMTs), n'a pour encore jamais été abordée chez la moutarde indienne.

L'utilisation de couches minces longitudinales en culture *in vitro* a été développée pour la première fois il y a 35 ans par Tran Thanh Van (1973) ; cette technique a permis la régénération des plantes chez nombre d'espèces dont quelques unes récalcitrantes comme *Beta vulgaris* (Detrez *et al.*, 1988), *Lupinus mutabilis* et *L. albus* (Mulin et Bellio-Spataru, 2000).

Plus récemment, des sections fines réalisées transversalement *in vitro* à partir de différents types d'organes, ont également permis la régénération de plantes. Cette technique a été appliquée avec succès pour des espèces aussi variées que *Oryza sativa* (Nhut *et al.*, 2000), *Lilium longiflorum* (Nhut *et al.*, 2002), *Spinacia oleracea* (Léguillon *et al.*, 2003) et *Brassica napus* (Klimaszewska et Keller, 1985 ; Ben Ghnaya *et al.* 2008) .

C'est cette méthode qui a donc été envisagée pour la régénération *in vitro* de quelques génotypes de *Brassica juncea*. En effet, la mise au point et l'optimisation d'une nouvelle méthode de régénération s'avère nécessaire pour l'obtention d'un meilleur taux de régénération .Une application de cadmium a été réalisée au cours de la phase de néoformation *in vitro*, l'objectif étant, par une pression de sélection, de modifier la tolérance des régénérants au métal. L'analyse de quelques paramètres physiologiques en relation avec le mécanisme d'accumulation du métal a permis de caractériser les régénérants.

Pour compléter cette étude faite avec des plants néoformés, l'effet du cadmium a été testé sur des plants issus de semis. Plusieurs métabolites, impliqués dans les stress ont été quantifiés et un intérêt particulier a été porté aux polyamines dont l'application exogène permet d'envisager son utilisation pour améliorer la capacité d'accumulation du cadmium par les plantes.



### 3- MATERIEL ET METHODES

#### 3.1- Matériel végétal

Les trois lignées du printemps de moutarde indienne [*Brassica juncea* (L.) Czern.] I39/1, AB79/1 et J99 (génotypes 1, 2 et 3 respectivement) ont été fournies par l'Ecole Nationale d'Enseignement Supérieur Agronomique (ENESA) de Dijon (France).

On peut défendre le choix de la moutarde indienne par le fait qu'elle possède plusieurs avantages par rapport à *Brassica napus*. Elle a une croissance plus vigoureuse, une tolérance plus importante pour la chaleur, la sécheresse, une résistance accrue aux champignons à pied noir, une accumulation et une tolérance plus importantes pour les métaux lourds (i.e. Cd, Cu, Zn, Ni, Pb et Se) et elle est utilisée dans plusieurs processus de la phytoremédiation (Kümar *et al.*, 1995 ; Salt *et al.*, 1995a).

#### 3.2- Conditions de culture et de régénération des plantes *in vitro* et en chambre de culture

Les graines de trois génotypes de moutarde indienne ont été désinfectées selon le protocole de Léguillon *et al.* (2003) légèrement modifié. Tout d'abord, les graines sont placées sous un courant d'eau chaude à 60°C pendant 30 secondes, puis une stérilisation en surface de 30 secondes par de l'éthanol 70 % est réalisée, suivie d'une décontamination avec de l'hypochlorite de calcium (5 %, p/v) pendant 10 min. Deux rinçages à l'eau distillée stérile de 5 min sont ensuite effectués. Pour la germination, une seule graine est placée dans un tube à essai contenant 10 ml d'un milieu Murashige et Skoog (MS) solidifié avec de l'agar à 0,6 % (p/v) (Murashige et Skoog, 1962). Ce milieu est enrichi en saccharose à 2 % (p/v) et le pH est ajusté à 5,8 avec NaOH (0,1 M).

Pour les études de régénération, les CCMts (400-500 µm d'épaisseur) sont coupées à partir d'hypocotyles, de pétioles et de cotylédons de plantes âgées de 7 jours en culture. Les CCMts sont cultivées dans des boîtes de Pétri à raison de 15 CCMts par boîte, chacune contenant un milieu MS de base solidifié avec de l'agar (0,6 %, p/v), du saccharose à (2 %, p/v) supplémenté avec de l'ANA (3,22 µM), de la BAP (26,6 et 53,3 µM) et de l'AgNO<sub>3</sub> (0-

20  $\mu\text{M}$ ). Pour les expériences en présence du  $\text{CdCl}_2$ , une gamme de 0 à 250  $\mu\text{M}$  est appliquée. Le pH de tous les milieux est ajusté à 5,8 par  $\text{NaOH}$  ou  $\text{HCl}$  (0,1 M) selon le besoin avant autoclavage à 121°C pendant 20 min.

Après 4 et 6 semaines de culture en boîte de Pétri, une partie des plants régénérés en présence ou non de  $\text{CdCl}_2$  sont coupés et transférés sur un milieu MS solidifié avec de l'agar 0,7 % (p/v), contenant du saccharose 2 % (p/v) en absence de toute hormone de croissance et, une autre partie, est excisée pour doser les teneurs en Cd dans les bourgeons néoformés. Après deux semaines, les plantes enracinées sont transférées en serre et elles fleurissent normalement un mois plus tard.

Pour l'obtention des régénérants, les CCMts sont gardées 6 semaines en culture, les bourgeons obtenus sont coupés et transférés dans des tubes à essai sur un milieu MS sans hormones de croissance ni  $\text{CdCl}_2$ . Ils sont acclimatés durant 2 semaines dans une chambre de culture. Ensuite, les plantes enracinées sont transférées et cultivées en pot contenant de la vermiculite (EFISOL, vermiculite exfoliée, VERMEX M), arrosées par une solution Hoagland  $\frac{1}{2}$  selon le besoin (Hoagland et Arnon, 1950). Après 3 semaines de cultures, les plantes homogènes sont enlevées des pots et leurs racines lavées avec précaution, puis transférées en conteneurs pour être cultivées en conditions hydroponiques sur une solution de Hoagland  $\frac{1}{2}$  en présence de tampon MES (1 mM) et de  $\text{Cd Cl}_2$  (0 ou 75  $\mu\text{M}$ ).

Des mesures de l'activité peroxydasique ont été effectuées sur des CCMts âgées de 8 jours, issues d'un milieu MS supplémenté ou non avec différentes concentrations de  $\text{CdCl}_2$  (0 – 150  $\mu\text{M}$ ).

Pour les expériences basées sur l'application exogène de PAs, les graines ont été mises en germination sur de la vermiculite et irriguées avec une solution de Hoagland  $\frac{1}{2}$  selon les besoins. Quand les plantes atteignent l'âge de 18 jours, elles sont enlevées des pots, les racines sont lavées avec précaution et transférées dans des récipients séparés pour être cultivées en hydroponique dans une solution de Hoagland  $\frac{1}{2}$  supplémentée ou non par  $\text{CdCl}_2$  (75  $\mu\text{M}$ ), et tamponnée à pH 6,60 par MES (1 mM). Une pulvérisation foliaire de putrescine (Put) ou de spermidine (Spd), à la concentration de 1 mM (Sigma) additionnée de Teepol (0,01 % en concentration finale) est appliquée. Les plantes témoins sont pulvérisées avec une solution de Teepol (0,01 %). Le volume de la pulvérisation est de 7  $\mu\text{l}$  par plante. Après 84 h

de croissance en conditions hydroponiques, les plantes (issues des CCMts ou des expériences en présence des PAs) sont lavées soigneusement avec de l'eau distillée et utilisées pour les différents dosages.

La solution de Hoagland est composée uniquement de macro éléments selon la composition suivante :  $\text{KNO}_3$  (5 mM),  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (5 mM),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (2 mM) et  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1 mM). Dans les deux types d'expérience, le milieu est aéré de façon continue.

Toutes les expériences sont réalisées dans une chambre de culture avec 12h de photopériode à  $60 \mu\text{mol photon} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  fournies par des lampes fluorescentes de type «cool white» avec une thermopériode de 22 / 20°C (jour / nuit).

### **3.3- Minéralisation et dosage du Cd**

#### **3.3.1- Minéralisation**

Pour doser la teneur en Cd des échantillons, ces derniers sont séchés dans une étuve pendant 10 min à 110°C puis durant 4 jours à 80°C jusqu'à atteindre un poids constant, puis ils sont finalement réduits en poudre fine à l'aide d'un broyeur à bille.

La minéralisation d'un échantillon d'environ 200 mg se fait par digestion acide dans des tubes en Téflon. Cette digestion est réalisée à l'aide d'un mélange d'acides comprenant 4 ml de  $\text{HNO}_3$  (65 %, Merck), 3 ml de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (30 %, Baker) et 1 ml de HF (40 %, Merck Suprapur®). Le mélange acide est chauffé et porté à sec à 110°C. Le minéralisat est repris par un mélange de 3 ml de  $\text{HNO}_3$  et 2 ml de  $\text{H}_2\text{O}_2$  et porté également à sec à 110°C. Le minéralisat est ensuite repris avec 4 ml de  $\text{HNO}_3$  chauffés à 85°C pendant 2 heures, puis dilué avec 20 ml d'eau ultra pure. Toutes les solutions sont préparées avec de l'eau ultra pure, fournie par un système MilliQ (Millipore, Milford, MA, USA).

#### **3.3.2- Dosage**

La détermination des concentrations de cadmium dans les différents minéralisats a été réalisée à l'aide d'un spectromètre d'absorption atomique (SIMAA 6100 Perkin Elmer) fonctionnant en mode mono-élémentaire, avec atomisation électrothermique.

Des tubes en graphite avec revêtement pyrolytique, équipés de plates-formes, ont été utilisés. Le gaz inerte est l'argon. Les échantillons sont déposés dans le four graphite à l'aide d'un passeur d'échantillons AS-800. Les tubes en polyéthylène ont été préalablement lavés à l'acide nitrique puis rincés avec de l'eau ultra-pure.

La source de lumière est une lampe Cd EDL Perkin Elmer. Les mesures sont effectuées à 228,8 nm. Les courbes d'étalonnage sont réalisées par dilution d'une solution étalon Merck à 1 g.L<sup>-1</sup> Cd. Les solutions d'échantillons sont également diluées avec de l'eau ultra-pure avant introduction dans le tube graphite. Les dilutions sont réalisées à l'aide de pipettes pneumatiques Gilson. Le Pd (10 µg) utilisé comme modificateur chimique ainsi que l'échantillon sont introduits simultanément dans le tube graphite. L'atomisation est effectuée à 1800°C sous un flux d'argon de 250 ml min<sup>-1</sup> sans étape de pré-traitement électrothermique (Weiss *et al.*, 1999).

### 3.4- Dosage des pigments

Les teneurs en chlorophylles a et b et caroténoïdes sont déterminées selon le protocole de Lichtenthaler (1987). L'extraction est réalisée à froid par 25 ml d'acétone pour environ 1 g de matière fraîche foliaire. Après 10 min de centrifugation à 5000 g, à 4°C, une mesure de l'absorbance A est effectuée à 470, 662 et 645 nm à l'aide d'un spectrophotomètre Shimadzu (UV-1605).

Les teneurs en pigments, exprimées en µg.ml<sup>-1</sup>, sont calculées à partir des équations suivantes :

$$C_a = 11,24 A_{662} - 2,04 A_{645}$$

$$C_b = 20,13 A_{645} - 4,19 A_{662}$$

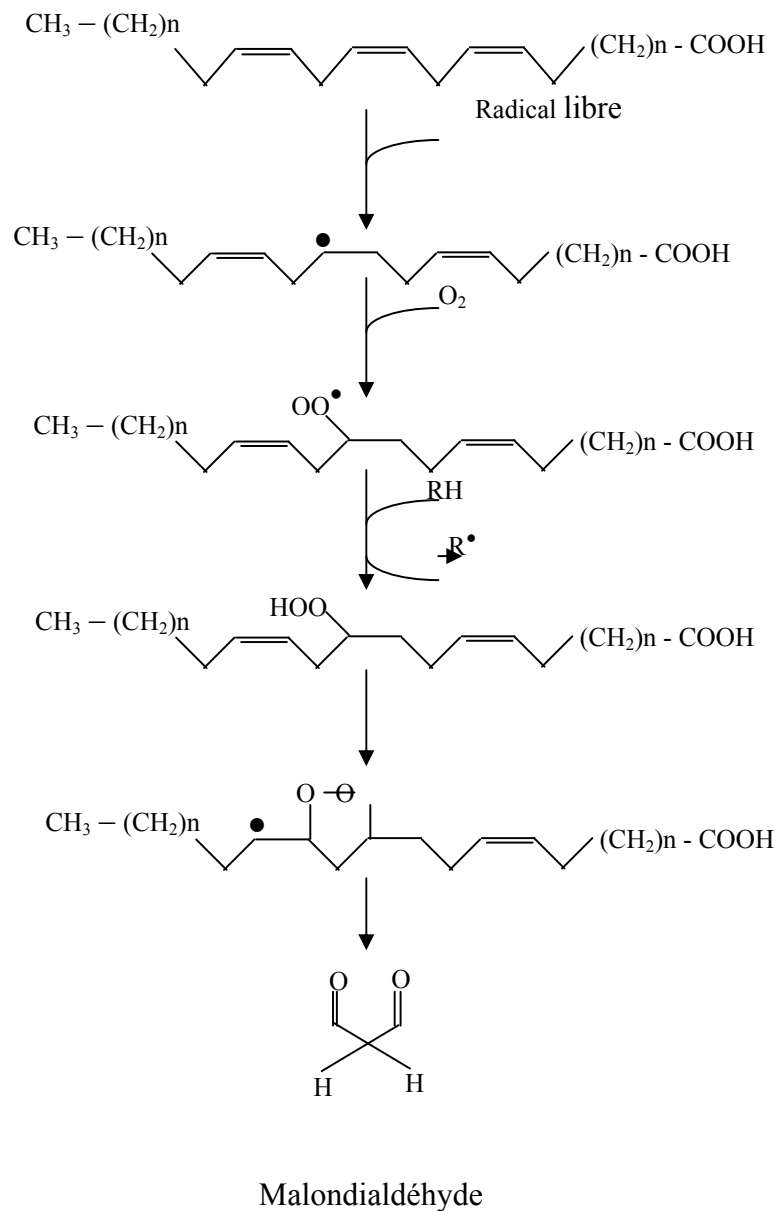
$$C_{a+b} = 7,05 A_{662} - 18,09 A_{645}$$

$$C_{x+c} = \frac{1000 A_{470} - 1,90 C_a - 63,14 C_b}{214}$$

(C<sub>a</sub> et C<sub>b</sub> : Concentration en chlorophylles a et b ; C<sub>x + c</sub> : Concentration en caroténoïdes).

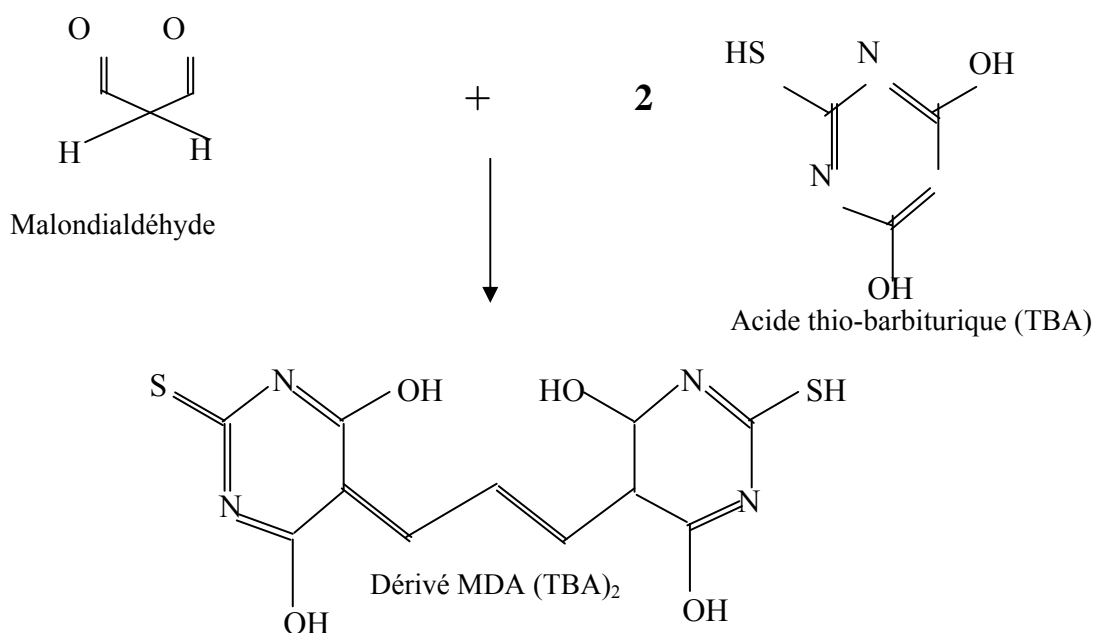
### 3.5- Estimation de la peroxydation des lipides

Les plantes soumises à des stress métalliques (i.e. Cd) présentent une chaîne de peroxydation de lipides amenant finalement à la production de malondialdéhyde (MDA) (Figure 8).



**Figure 8** : Formation de malondialdéhyde suite à la progression de la chaîne de peroxydation des lipides en réponse à un stress oxydatif (Ames *et al.*, 1993).

La peroxydation des lipides est estimée par mesure du malondialdéhyde (MDA) produit, capable de réagir avec l'acide 2-thiobarbiturique (Figure 9).



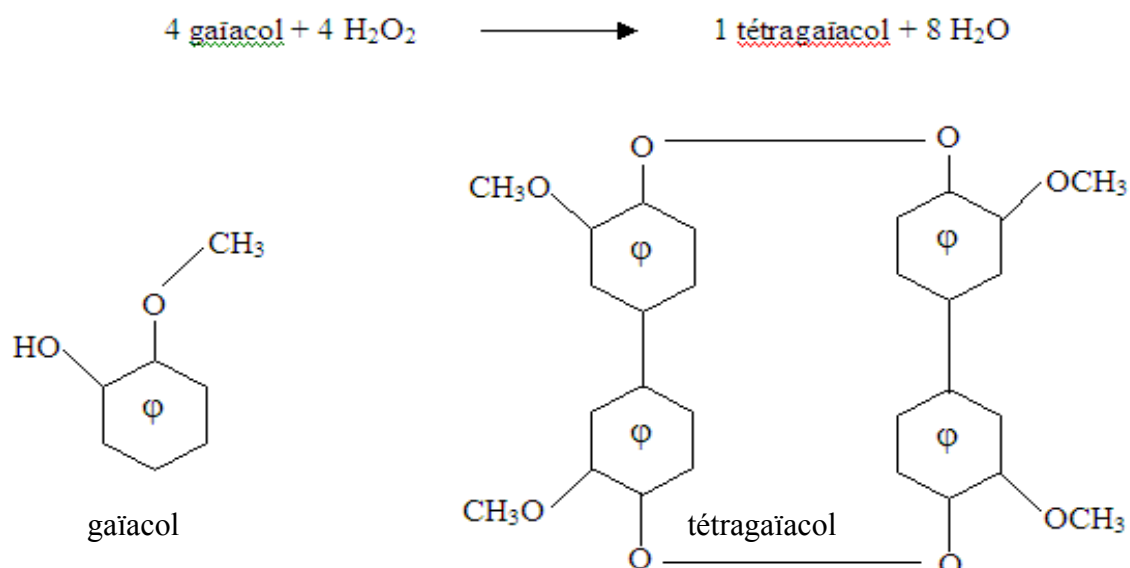
**Figure 9** : Réaction de condensation du MDA avec l'acide thio-barbiturique formant le dérivé coloré : MDA (TBA)<sub>2</sub>, mesuré par spectrophotométrie à 532 nm.

L'extraction et le dosage du MDA ont été réalisés selon les méthodes de Minotti et Aust (1987) et Iturbe-Ormaetxe *et al.* (1998). L'extraction est réalisée par broyage d'environ 1 g de matière végétale foliaire congelée avec un mélange constitué de 5 ml d'acide métaphosphorique (5 %, p/v) et de 100 µl de butylhydroxytoluène (2 %, p/v dans l'éthanol). Après 30 min de contact, l'homogénat est centrifugé à 5 000 g pendant 20 min à 4°C. A 4 ml de surnageant, sont additionnés 400 µl de butylhydroxytoluène (2 %, p/v dans l'éthanol), 2 ml de HCl (25 %, v/v) et 2 ml d'acide 2-thiobarbiturique (1 %, p/v préparé dans NaOH, 50 mM). L'homogénat est alors incubé à 95°C pendant 30 min et la réaction est arrêtée par refroidissement du mélange dans de la glace. Pour l'extraction du chromogène, 3 ml de 1-butanol sont ajoutés à l'homogénat et l'ensemble est agité vigoureusement. Après 5 min de centrifugation à 500 g, l'absorbance est mesurée à 532 nm. Le contenu en MDA est calculé en utilisant le coefficient d'extinction molaire du MDA ( $\epsilon = 155 \text{ mmol.L}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ).

Le blanc est réalisé en remplaçant l'acide 2-thiobarbiturique par NaOH (50 mM).

### 3.6- Mesure de l'activité gaïacol peroxydase (GPOX)

Le dosage repose sur l'utilisation du gaïacol comme substrat des peroxydases. En présence de l'eau oxygénée il y a formation de tétragaïacol qui présente un maximum d'absorption à 470 nm permettant donc de déterminer l'activité enzymatique (Figure 10).



**Figure 10** : Réaction d'oxydation du gaïacol en tétragaïacol en présence du  $\text{H}_2\text{O}_2$  permettant de mesurer l'activité de la GPOX.

L'extraction de la GPOX est réalisée à partir de 500 mg de matière végétale fraîche par 6 ml de tampon phosphate (100 mM, pH 6,5), dans de la glace. Après une centrifugation de 10 min à 5000 g, le surnageant est récupéré et maintenu à 4°C jusqu'à utilisation.

L'activité GPOX est déterminée selon le protocole décrit par MacAdam *et al.* (1992) légèrement modifié. A 100  $\mu\text{l}$  d'extrait enzymatique est ajouté le mélange réactionnel constitué de 2,7 ml de tampon phosphate (100 mM, pH 6,5), 100  $\mu\text{l}$  d'une solution de gaïacol (18 mM) et 100  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (obtenu en diluant 100 fois une solution commerciale à 3 %). La réaction débute dès l'addition de 100  $\mu\text{l}$  d'extrait enzymatique au mélange réactionnel (volume final de 3 ml).

L'activité enzymatique est suivie en fonction du temps à l'aide d'un spectrophotomètre Shimadzu (UV-1605) par mesure de l'absorbance à 470 nm. L'activité enzymatique est exprimée en  $\mu\text{mol}$  gaïacol oxydé. $\text{min}^{-1}.\text{g}^{-1}$  M.F., en utilisant la valeur de coefficient d'extinction de tétragaïacol ( $\epsilon$  :  $26,6 \text{ mM}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ).

## **3.7- Détermination de la teneur en acides aminés libres totaux**

### **3.7.1- Principe**

Tous les acides aminés réagissent avec la ninhydrine à 100°C pour former le pourpre de Ruheman (Yemm et Cooking, 1955).

### **3.7.2- Extraction**

Environ 1 g de matière fraîche foliaire est mélangé à 7 ml d'eau distillée dans un tube en verre. Les tubes, bouchés par une bille d'agate, sont placés dans un bain-marie bouillant (100°C) pendant 1 h. Après refroidissement dans de la glace, le mélange est broyé au Potter. Puis centrifugé à 5000 g pendant 10 min, à 4°C. Le culot subit une deuxième extraction avec 7 ml d'eau distillée (1 h au bain-marie à 100°C) puis le mélange est centrifugé à 5000 g pendant 10 min et à 4°C. Les deux surnageants sont récupérés et filtrés sur un papier filtre.

### **3.7.3- Dosage**

Une partie aliquote de l'extrait (200 µl) est mélangée à 500 µl de tampon citrate (160 mM, pH 4,6 ajusté avec HCl 25 %). Après homogénéisation au vortex, 1 ml du mélange réactionnel ninhydrine-acide ascorbique est ajouté au broyat. Les tubes sont agités vigoureusement, bouchés par une bille d'agate et placés au bain-marie bouillant à 100°C pendant 20 min. Après refroidissement dans de la glace pilée, 3 ml d'éthanol à 70 % sont ajoutés et l'ensemble est agité vigoureusement. L'absorbance du chromogène est mesurée à 570 nm.

La solution de ninhydrine (54 mM : 0,575 g de ninhydrine dans 60 ml d'éthanol à 70 %) est préparée extemporanément et additionnée de 2 ml d'acide ascorbique (1%, p/v). La réaction se déroule dans un milieu tamponné à pH 4,6.

Une courbe étalon est réalisée à partir d'une solution mère de leucine à 5 mM préparée dans l'eau distillée pour des valeurs comprises entre 0 et 200 nmoles de leucine. Les résultats seront exprimés en µmoles d'équivalents leucine.g<sup>-1</sup> M.F.



### **3.8- Détermination de la proline**

Le contenu en proline libre est déterminé par la méthode de Bates *et al.* (1973). Les tissus foliaires congelés (1 g) sont extraits dans 10 ml d'acide sulfosalicylique à 3 % (p/v) et l'homogénat est filtré sur du papier filtre.

Une fraction du filtrat (0,5 ml) est mélangée avec 1 ml de ninhydrine à 1 % (p/v) dans l'acide acétique à 60 % (v/v). Après 1h au bain-marie bouillant, la réaction est arrêtée par refroidissement dans de la glace. Ensuite, 3 ml de toluène sont ajoutés et l'ensemble est vortexé pendant 2 min avant incubation à température ambiante. Après un minimum de 3h à l'obscurité, l'absorbance est lue à 520 nm.

Une courbe étalon est réalisée à partir d'une solution mère de proline à 5 mM préparée dans l'eau distillée pour des valeurs comprises entre 0 et 200 nmoles de proline. Les résultats sont exprimés en  $\mu\text{moles proline.g}^{-1}$  M.F.

### **3.9- Extraction et dosage des sucres solubles totaux**

#### **3.9.1- Principe**

En milieu acide et à chaud, les glucides solubles sont dégradés en furfural qui forme avec l'anthrone un composé bleu dont l'absorbance est mesurée au spectrophotomètre à 625 nm (Cerning-Beroard, 1975).

#### **3.9.2- Extraction**

Environ 1 g de matière fraîche foliaire est mélangé avec 7 ml d'eau distillée dans un tube en verre. Les tubes sont bouchés par une bille d'agate puis placés dans un bain-marie bouillant (100°C) pendant 1 h. Après refroidissement des tubes dans de la glace, le mélange est broyé au Potter et centrifugé à 5000 g pendant 10 min, à 4°C. Le culot subit une deuxième extraction avec 7 ml d'eau distillée (1 h au bain-marie à 100°C) puis le mélange est centrifugé à 5000 g pendant 10 min et à 4°C. Les deux surnageants sont mélangés et filtrés sur un papier filtre.

### **3.9.3- Dosage**

A une partie aliquote de l'extrait (500  $\mu$ l) sont ajoutés 5 ml de réactif à l'anthrone préparé extemporanément (92 mg d'anthrone et 92 mg de thiourée sont dissous dans 100 ml d'acide sulfurique à 70 %). Après agitation au vortex, les tubes bouchés par des billes d'agate sont placés dans un bain-marie bouillant pendant 10 min. Après refroidissement dans de la glace pilée, l'absorbance est mesurée à 625 nm. Une gamme d'étalonnage est réalisée à partir d'une solution mère de glucose, avec des teneurs comprises entre 0 et 400 nmoles. Les résultats sont exprimés en  $\mu$ moles d'équivalents glucose.g<sup>-1</sup> M.F.

### **3.10- Extraction et dosage des polyamines**

L'extraction et le dosage des polyamines sont effectués selon le protocole de Flores et Galston (1982).

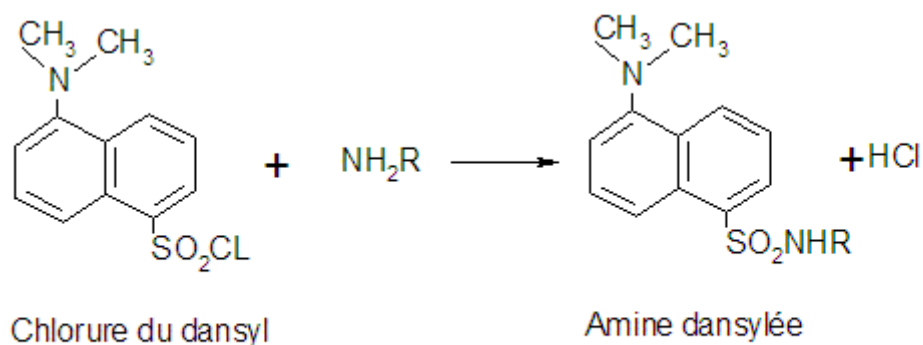
#### **3.10.1- Extraction**

Les échantillons provenant des différentes expériences sont lavés, séchés sur papier, pesés puis congelés dans l'azote liquide.

Le broyage des échantillons est réalisé au Potter, à 4°C, en présence de HClO<sub>4</sub> à 5 % (v/v), à raison de 1 ml pour 100 mg de tissus frais. Le mélange est laissé sous agitation durant une heure avant 10 min de centrifugation à 5000 g, à 4°C. Ensuite, le surnageant est recueilli dans des tubes en plastique et congelé à -20°C jusqu'au dosage. Dans ces conditions, les extraits sont stables pendant plusieurs mois.

#### **3.10.2- Dansylation**

La réaction de dansylation est réalisée dans des tubes en verre selon le protocole de Flores et Galston (1982) légèrement modifié (Figure 11).



**Figure 11** : Réaction de dansylation des polyamines (Flores et Galston,1982).

A 200  $\mu\text{l}$  d'extrait perchlorique sont ajoutés 200  $\mu\text{l}$  de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  saturé (4 g dans 7 ml d'eau distillée). Après agitation, 200  $\mu\text{l}$  de chlorure de dansyl (5  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  d'acétone) sont ajoutés. Les échantillons sont homogénéisés puis laissés à l'obscurité pendant une nuit à température ambiante. Les polyamines dansylées sont récupérées par 2 extractions successives avec 0,5 ml de benzène. On procède ensuite à l'évaporation totale dans une étuve à 70°C d'une partie aliquote de la phase benzénique (500  $\mu\text{l}$ ). Le résidu est repris par 500  $\mu\text{l}$  de méthanol puis les polyamines sont dosées par chromatographie liquide à haute performance (CLHP).

### 3.10.3- Dosage par CLHP

Le système de dosage est constitué de 2 pompes à solvants (Kontron 420, Kontron 422) couplées à un mélange haute pression, une valve d'injection (Kontron HPLC 360 autosampler). La précolonne est de type Spheri ODS 5  $\mu\text{M}$  (4,6 x 30 mm) (Brownlee) et la colonne analytique est de type Ultrasphère (4,6 x 250 mm) (Beckman).

La phase mobile est constituée de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (0,01 M, pH 4,4) (solvant A) et d'un mélange acétonitrile/méthanol (50 / 50) (solvant B). La proportion de deux solvants évolue au cours du temps selon le gradient suivant : 5 min (solvant B) 80 % ; 2 min (solvant B) 80-89 % ; 5 min (solvant B) 89-100 % ; 3 min (solvant B) 100-80 % ; 10 min (solvant B) 80 %. Le débit est de 1  $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ .

La détection des polyamines est réalisée par un spectrofluorimètre (Kontron SFM 25), en utilisant 360 et 510 nm comme longueur d'onde d'excitation et d'émission respectivement. Le gradient des solvants, l'injection des extraits contenant les polyamines et l'analyse des données du spectrofluorimètre sont contrôlés par un micro-ordinateur de type Kontron.

### **3.10.4- Hydrolyse des polyamines conjuguées acido-solubles**

Les polyamines conjuguées acido-solubles sont libérées en suivant la méthode de Torrigiani *et al.* (1987). A 200 µl d'extrait perchlorique sont ajoutés 200 µl de HCl (12N). Les ampoules sont scellées au bec Meker puis placées dans une étuve à 110°C pendant 18 heures. Ensuite, les hydrolysats sont placés dans un bain marie à 75°C, placés sous un courant d'air comprimé jusqu'à évaporation totale. Le résidu est repris par 200 µl de HClO<sub>4</sub> à 5 % (v/v) et l'ensemble transféré dans des tubes en verre ; chaque ampoule est rincée avec 200 µl de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> à saturation et la dansylation est poursuivie comme décrit ci-dessus.

Les polyamines conjuguées libérées par hydrolyse sont ensuite dosées par CLHP selon le protocole décrit ci-dessus.

### **3.11- Analyses statistiques**

Le nombre de CCMts caulogènes par boîte de Pétri, ainsi que, le nombre de bourgeons par CCMt caulogène sont comptés et le pourcentage de bourgeons formés est calculé. Il y a 15 CCMts par boîte de Pétri et 4 boîtes par organe (en présence ou non de CdCl<sub>2</sub>).

La détermination de la biomasse fraîche est réalisée à partir de 3 expériences indépendantes, avec 30 plants chacune. Les différents dosages sont les moyennes de 3 expériences indépendantes, avec 3 mesures par expérience. Les valeurs obtenues correspondent aux moyennes ± erreur standard.

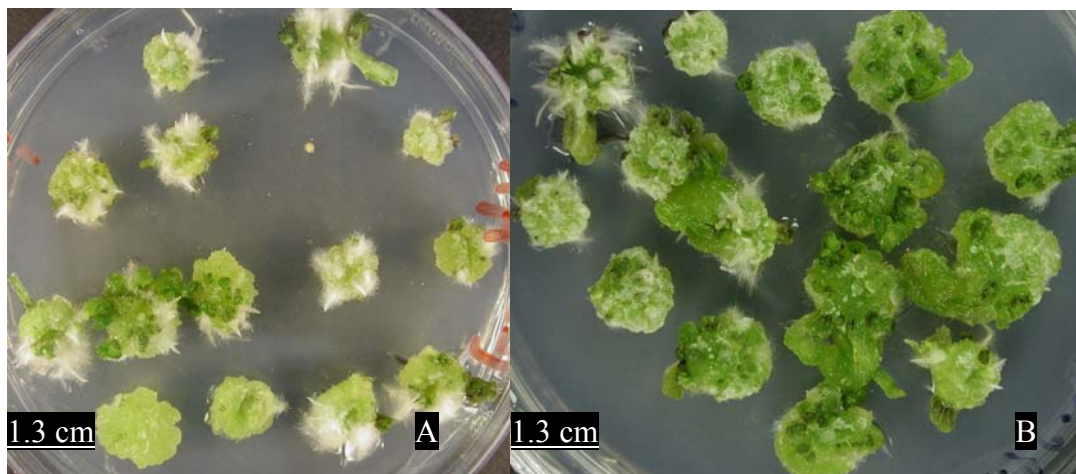
Pour les analyses statistiques, l'analyse de variance ANOVA et le test LSD (least significant difference) ou test de la plus petite différence significative ont été utilisés. Le test t est utilisé lorsque les échantillons sont comparés deux à deux. Ces analyses sont réalisées à l'aide du programme Statgraphics à P < 0,05 ou 0,01 (Statgraphics version 5.1, Manugistics inc., Rocville, USA) et la normalité des échantillons a été vérifiée.

## 4- RESULTATS

### 4.1- Mise au point de la méthode de régénération

#### 4.1.1 – Induction de la caulogénèse

Les résultats montrent que quel que soit le génotype, les premiers bourgeons de *B. juncea* apparaissent dix jours après l'initiation de la culture de CCMts et atteignent leur fréquence maximale au 27<sup>ème</sup> jour de culture. La callogenèse s'avère le premier phénomène observé suivi par la rhizogénèse puis la caulogénèse. Quelle que soit l'origine des CCMts, des taux élevés en rhizogénèse et en callogenèse sont obtenus (jusqu'à 99 %) (Figure 13 A, B et C). Les cals sont compacts et de couleur vert foncé en présence de nitrate d'argent, alors qu'en son absence, ils sont friables, tendres, avec un aspect noduleux et de couleur vert clair quels que soient la concentration en AgNO<sub>3</sub>, le génotype et l'organe (Figure 12 ).



**Figure 12** : Morphologie des cals issus de CCMts d'hypocotyles du génotype 2 (*B. juncea* AB79/1) après 27 j de culture sur un milieu MS supplémenté avec ANA (3,22 µM), BAP (26,6 µM), saccharose 2 %, en absence (A) ou en présence (B) de AgNO<sub>3</sub> (10 µM).

#### 4.1.2 – Influence de quelques paramètres sur la caulogénèse à partir de CCMts

##### 4.1.2.1- Effet sur la fréquence de régénération

Les fréquences de caulogénèse des CCMts ont été comparées selon le génotype, l'origine de l'explant et la composition du milieu de culture (BAP, AgNO<sub>3</sub>).

Lorsque les CCMts sont mises en culture sur un milieu MS, l'addition de BAP aux concentrations de 26,6 ou de 53,3 µM, conduit globalement aux mêmes résultats de caulogénèse (Tableau 1). Cependant, les résultats montrent que la néoformation de bourgeons est fortement influencée par le génotype et par la nature de l'explant (Tableau 1). Ainsi, selon le génotype utilisé, la fréquence de caulogénèse varie de 0 – 1% (génotype 3), de 6,67 – 30,46% (génotype 2) et de 0 - 78,67% (génotype 1) ; les pourcentages minima étant obtenus à partir d'hypocotyles et les maxima à partir de cotylédons ; les pétioles permettant l'obtention de pourcentages intermédiaires de caulogénèse.

Les données du tableau 2 montrent qu'en l'absence d'AgNO<sub>3</sub>, le nombre de bourgeons par CCMt issue de cotylédons n'est que peu ou pas significativement différent pour les trois génotypes, avec des valeurs comprises entre 1 et 1,34, que la BAP soit présente à 26,6 ou 53,3 µM. Des résultats similaires sont observés pour les CCMts de pétioles des génotypes 1 et 2. L'absence d'AgNO<sub>3</sub> ne permet de régénération des CCMts de pétioles du génotype 3 qu'en présence de 53,3 µM mais ne conduit à aucune régénération des CCMts d'hypocotyles des génotypes 1 et 3.

L'addition d'AgNO<sub>3</sub> au milieu de culture permet d'accroître significativement à la fois le pourcentage de régénération (Tableau 1) et le nombre de bourgeons par CCMt (Tableau 2) et ceci est vrai quels que soient le génotype et l'origine de l'explant utilisés. Ces résultats, observables dès 1 µM en AgNO<sub>3</sub>, sont améliorés par l'addition de 5 µM mais peu modifiés par élévation de la concentration à 10 µM, à l'exception toutefois du génotype 3 pour lequel de meilleurs résultats sont obtenus avec la plus forte concentration en AgNO<sub>3</sub>. L'adjonction au milieu de culture de concentrations en AgNO<sub>3</sub> supérieures à 10 µM (15 et 20 µM), ne modifient ni les fréquences de régénération ni le nombre de bourgeons par explant (résultats non rapportés) ; ceci est observé quels que soient les génotypes et les organes utilisés.

Si les pourcentages de régénération des CCMts issues de cotylédons des trois génotypes s'avèrent insensibles à la variation de la concentration en BAP, en revanche, le doublement de la concentration en BAP produit une diminution de la fréquence de régénération des CCMts issues de pétioles et d'hypocotyles (Tableau 1), exception faite des CCMts de pétioles du génotype 3.

En conditions optimales pour les génotypes 1 et 2, à savoir : 26,6  $\mu$ M, BAP, 10  $\mu$ M  $\text{AgNO}_3$ , les données du tableau 1 montrent que ce sont les CCMts du génotype 2 qui s'avèrent les plus organogènes, avec des taux de régénération, similaires pour les trois types d'organes,

**Tableau 1** : Effet du génotype, de la BAP et de  $\text{AgNO}_3$  sur l'organogenèse *in vitro* des CCMts issues de cotylédons, de pétioles et d'hypocotyles. Les pourcentages de CCMts organogènes étaient évalués 27 j après l'initiation de la culture des CCMts.

Génotypes	AgNO <sub>3</sub>	BAP	Fréquence de CCMts organogènes (%)			
			Cotylédons	Pétioles	Hypocotyles	
1	0	26,6	78,67 <sup>c</sup>	23,34 <sup>fg</sup>	0,00 <sup>k</sup>	
			93,34 <sup>a</sup>	68,93 <sup>d</sup>	11,13 <sup>gh</sup>	
			96,67 <sup>a</sup>	75,60 <sup>c</sup>	13,34 <sup>gh</sup>	
			97,34 <sup>a</sup>	77,80 <sup>c</sup>	18,67 <sup>g</sup>	
	0	53,3	72,20 <sup>c</sup>	8,00 <sup>gh</sup>	0,00 <sup>k</sup>	
			86,67 <sup>b</sup>	32,27 <sup>f</sup>	7,80 <sup>h</sup>	
			93,34 <sup>a</sup>	44,00 <sup>e</sup>	7,80 <sup>h</sup>	
			94,47 <sup>a</sup>	46,67 <sup>e</sup>	11,14 <sup>gh</sup>	
	2	0	26,6	30,47 <sup>f</sup>	22,27 <sup>fg</sup>	6,67 <sup>h</sup>
				93,34 <sup>a</sup>	87,88 <sup>b</sup>	65,56 <sup>d</sup>
				96,67 <sup>a</sup>	92,27 <sup>a</sup>	87,80 <sup>b</sup>
				<b>100,00<sup>a</sup></b>	98,87 <sup>a</sup>	92,23 <sup>a</sup>
		0	53,3	26,67 <sup>f</sup>	10,00 <sup>gh</sup>	16,67 <sup>g</sup>
				95,34 <sup>a</sup>	67,80 <sup>d</sup>	37,80 <sup>e</sup>
95,60 <sup>a</sup>				75,60 <sup>c</sup>	73,34 <sup>c</sup>	
96,67 <sup>a</sup>				84,47 <sup>b</sup>	75,60 <sup>c</sup>	
3		0	26,6	0,93 <sup>j</sup>	0,00 <sup>k</sup>	0,00 <sup>k</sup>
				0,93 <sup>j</sup>	0,00 <sup>k</sup>	0,93 <sup>j</sup>
				6,67 <sup>h</sup>	0,00 <sup>k</sup>	9,53 <sup>gh</sup>
				15,20 <sup>g</sup>	1,13 <sup>j</sup>	9,53 <sup>gh</sup>
		0	53,3	0,93 <sup>j</sup>	0,93 <sup>j</sup>	0,00 <sup>k</sup>
				0,93 <sup>j</sup>	2,87 <sup>i</sup>	0,00 <sup>k</sup>
	12,40 <sup>gh</sup>			10,47 <sup>gh</sup>	0,00 <sup>k</sup>	
	13,34 <sup>gh</sup>			19,07 <sup>g</sup>	0,00 <sup>k</sup>	

Culture des CCMts sur un milieu MS supplémenté avec ANA (3,22  $\mu$ M), BAP (26,6 ou 53,3  $\mu$ M), saccharose 2 % et  $\text{AgNO}_3$  (0-10  $\mu$ M). Résultats de 3 expériences indépendantes, chacune avec 5 boîtes

de Pétri et 15 CCMts par boîte. Les différentes lettres indiquent des différences significatives à  $p = 0,05$  (ANOVA et test LSD).

Compris entre 92,23 et 100 %. En revanche, concernant le génotype 1, la nature de l'explant influence fortement la fréquence de régénération des CCMts, avec un taux maximal de 97,34 % pour les cotylédons qui chute à 18,67 % pour les hypocotyles. Ces mêmes conditions de culture s'avèrent également optimales pour les CCMts de cotylédons et d'hypocotyles du génotype 3 mais ne permettent que de faibles taux de régénération qui sont respectivement de 15,20 et 9,53 %. Seules les fréquences de régénération des CCMts de pétioles du génotype 3 sont améliorées par l'augmentation de la concentration en BAP de 26,6 à 53,3  $\mu\text{M}$  ; en effet, la fréquence s'élève de 1,13 % à 19,07 %.

#### **4.1.2.2- Effet sur le nombre de bourgeons par CCMt**

Globalement, concernant le nombre de bourgeons, les meilleurs résultats par CCMt sont obtenus pour le génotype 2, puis par le génotype 1 et enfin par le génotype 3. Cependant, au sein d'un génotype donné, le nombre de bourgeons est fonction de la nature de l'explant et de la concentration en BAP et en  $\text{AgNO}_3$  (Tableau 2).

En l'absence d' $\text{AgNO}_3$ , l'augmentation de la concentration en BAP de 26,6 à 53,3  $\mu\text{M}$  ne produit pas d'effet significatif sur le nombre de bourgeons, avec toutefois deux exceptions : réduction dans le cas des hypocotyles du génotype 2 et induction de bourgeons adventifs à partir des pétioles du génotype 3.

Pour les deux concentrations en BAP testées, l'accroissement de la concentration en  $\text{AgNO}_3$  de 1 à 5 - 10  $\mu\text{M}$  permet dans certains cas une augmentation significative du nombre de bourgeons par CCMt. L'effet est particulièrement marqué pour le génotype 2 et dans une certaine mesure chez le génotype 3.

En présence d' $\text{AgNO}_3$ , l'élévation de la concentration en BAP de 26,6 à 53,3  $\mu\text{M}$  conduit dans certains cas à une réduction du nombre de bourgeons par CCMt (pétioles du génotype 1, hypocotyles des génotypes 2 et 3).

En examinant les résultats obtenus avec le milieu combinant 26,6  $\mu\text{M}$  de BAP et 10  $\mu\text{M}$  de  $\text{AgNO}_3$  (milieu optimal dans tous les cas, à l'exception toutefois des CCMts de pétioles du génotype 3), on peut mettre en évidence un effet de l'organe source sur le nombre de bourgeons par CCMt (Tableau 2).



**Tableau 2 :** Effet du génotype, de la concentration en BAP et en AgNO<sub>3</sub> sur le nombre de bourgeons adventifs par CCMt excisée à partir de différents organes (cotylédons, pétioles et hypocotyles).

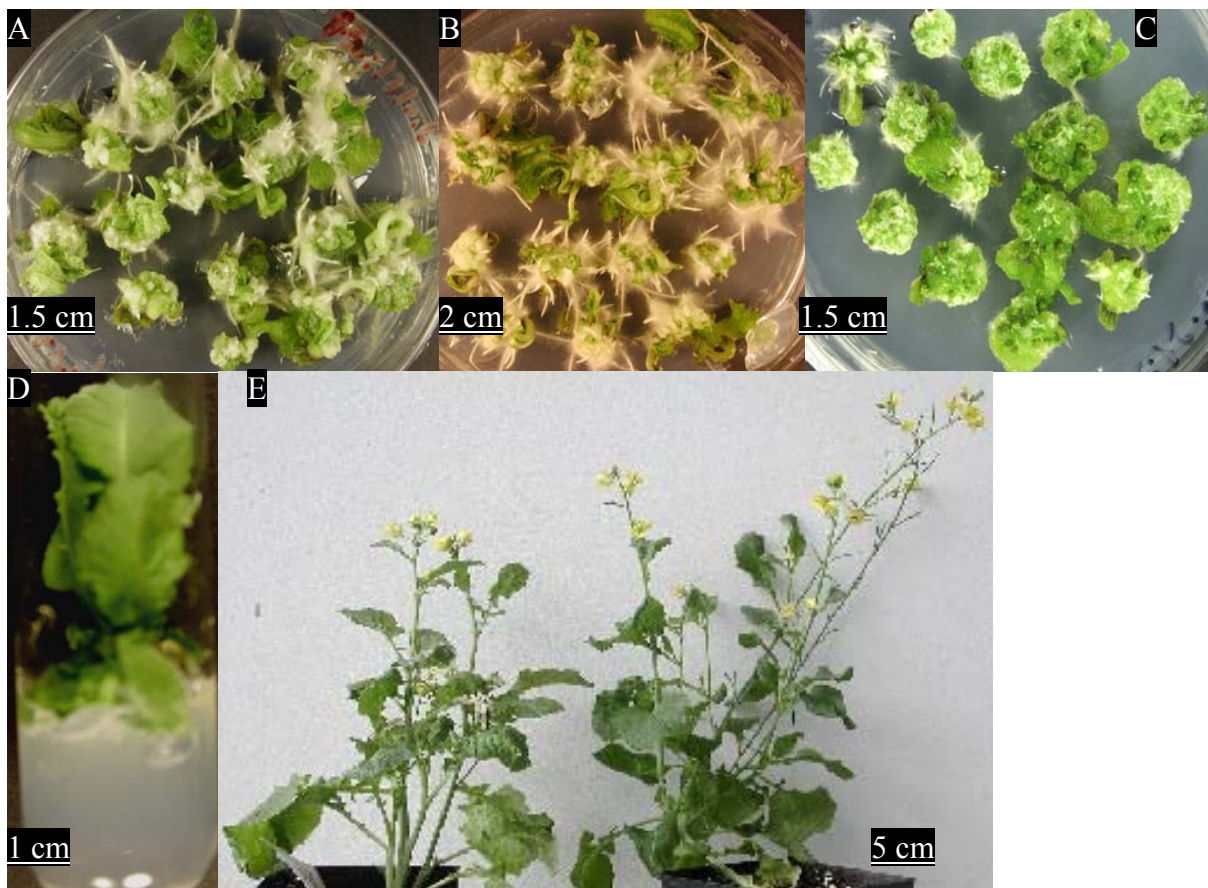
Génotypes	AgNO <sub>3</sub>	BAP		Nombre de bourgeons par CCMt		
		Cotylédons	Pétioles	Hypocotyles		
1	0	26,6	1,34 <sup>ef</sup>	1,16 <sup>ef</sup>	0 <sup>g</sup>	
			1,69 <sup>e</sup>	1,75 <sup>e</sup>	1,00 <sup>f</sup>	
			1,81 <sup>e</sup>	1,86 <sup>e</sup>	1,07 <sup>f</sup>	
			<b>1,86<sup>e</sup></b>	<b>1,90<sup>e</sup></b>	<b>1,12<sup>f</sup></b>	
	5	53,3	1,26 <sup>ef</sup>	1,00 <sup>f</sup>	0 <sup>g</sup>	
			1,51 <sup>e</sup>	1,02 <sup>f</sup>	1,00 <sup>f</sup>	
			1,82 <sup>e</sup>	1,23 <sup>ef</sup>	1,00 <sup>f</sup>	
			<b>1,89<sup>e</sup></b>	1,30 <sup>ef</sup>	<b>1,14<sup>f</sup></b>	
	2	0	26,6	1,00 <sup>f</sup>	1,23 <sup>ef</sup>	2,09 <sup>de</sup>
				1,64 <sup>e</sup>	2,60 <sup>d</sup>	2,88 <sup>d</sup>
				2,27 <sup>de</sup>	3,16 <sup>c</sup>	3,87 <sup>b</sup>
				<b>2,40<sup>de</sup></b>	<b>3,30<sup>c</sup></b>	<b>4,45<sup>a</sup></b>
		5	53,3	1,00 <sup>f</sup>	1,12 <sup>f</sup>	1,42 <sup>ef</sup>
				1,14 <sup>f</sup>	2,75 <sup>d</sup>	1,68 <sup>e</sup>
2,15 <sup>de</sup>				3,26 <sup>c</sup>	2,67 <sup>d</sup>	
<b>2,22<sup>de</sup></b>				<b>3,43<sup>c</sup></b>	2,78 <sup>d</sup>	
3		0	26,6	1,00 <sup>f</sup>	0 <sup>g</sup>	0 <sup>g</sup>
				1,00 <sup>f</sup>	0 <sup>g</sup>	1,00 <sup>f</sup>
				1,23 <sup>ef</sup>	0 <sup>g</sup>	1,12 <sup>f</sup>
				<b>1,34<sup>ef</sup></b>	1,00 <sup>f</sup>	<b>1,23<sup>ef</sup></b>
		5	53,3	1,00 <sup>f</sup>	1,00 <sup>f</sup>	0 <sup>g</sup>
				1,00 <sup>f</sup>	1,11 <sup>f</sup>	0 <sup>g</sup>
	1,27 <sup>ef</sup>			1,31 <sup>ef</sup>	0 <sup>g</sup>	
	<b>1,41<sup>ef</sup></b>			<b>1,37<sup>ef</sup></b>	0 <sup>g</sup>	

Les données sont obtenues 4 semaines après l'initiation de la culture des CCMts sur un milieu MS supplémenté avec ANA (3,22 µM), BAP (26,6 ou 53,3 µM), saccharose 2 % et AgNO<sub>3</sub> (0-10 µM). Les valeurs sont les moyennes de 3 expériences indépendantes (5 boîtes de Pétri et 15 CCMts par boîte). Des lettres différentes indiquent une différence significative à  $p = 0,01$  (ANOVA et test LSD).

Il apparaît alors que chez le génotype 1, les CCMts de pétioles et de cotylédons permettent d'obtenir un nombre similaire de bourgeons (1,86 - 1,90), supérieur à celui produit par les CCMts d'hypocotyles. En revanche, chez le génotype 2, les meilleurs résultats sont obtenus avec les CCMts d'hypocotyles, présentant 4,45 bourgeons par CCMt contre 3,30 et 2,40 respectivement pour les pétioles et les cotylédons. Concernant le génotype 3, les hypocotyles et les cotylédons permettent d'obtenir un nombre similaire de bourgeons par CCMt (1,23 – 1,34), légèrement supérieur à celui obtenu avec les pétioles (Tableau 2).

#### 4.1.2.3- Acclimatation et transfert en pots des plantes néoformées

Les bourgeons apparaissent au 10<sup>ème</sup> jour de culture et, au 27<sup>ème</sup> jour, ils sont coupés et transférés sur un milieu MS solidifié avec de l'agar 0,7 % sans ajout d'hormones de croissance.



**Figure 13** : Régénération de bourgeons et développement de plantes à partir de CCMts de moutarde indienne : (A) cotylédons ; (B) pétioles ; (C) hypocotyles ; (D) : pousse enracinée obtenue à partir de CCMts, 2 semaines après transfert dans un tube à essai ; (E) : plantes régénérées, cultivées et fleuries en serre.

Après 2 semaines, les plantes régénérées sont transférées en pots de terreau sous conditions de serre. Aucune altération phénotypique n'a été détectée sur les plantes régénérées (Figure 13 D et E). Les plantes fleurissent normalement un mois plus tard et arrivent à maturité en donnant des graines viables, présentant une conformité apparente à celles de la plante mère.

## 4.2- Application de la méthode en présence de CdCl<sub>2</sub>

### 4.2.1- Effet du CdCl<sub>2</sub> sur le pourcentage de régénération des CCMts

La présence de CdCl<sub>2</sub> dans le milieu de régénération des CCMts provoque, dès la concentration de 5 µM, une diminution significative du pourcentage de régénération qui

**Tableau 3** : Effet de CdCl<sub>2</sub> sur l'organogenèse *in vitro* des CCMts de cotylédons, pétioles et hypocotyles de *B. juncea* AB79/1 (génotype 2).

CdCl <sub>2</sub>	Fréquence des CCMts organogènes (%)			Nombre de bourgeons par CCMt organogène		
	Cotylédons	Pétioles	Hypocotyles	Cotylédons	Pétioles	Hypocotyles
0	<b>100<sup>a</sup></b>	<b>98,87<sup>a</sup></b>	<b>93,78<sup>a</sup></b>	<b>2,40<sup>c</sup></b>	<b>3,20<sup>b</sup></b>	<b>4,24<sup>a</sup></b>
5	86,22 <sup>b</sup>	80,89 <sup>bc</sup>	77,33 <sup>bc</sup>	2,36 <sup>c</sup>	2,02 <sup>cd</sup>	2,98 <sup>b</sup>
25	85,78 <sup>b</sup>	67,56 <sup>c</sup>	67,11 <sup>c</sup>	1,73 <sup>d</sup>	1,34 <sup>d</sup>	2,47 <sup>c</sup>
50	70,22 <sup>c</sup>	63,56 <sup>c</sup>	66,67 <sup>c</sup>	0,97 <sup>e</sup>	1,17 <sup>de</sup>	1,88 <sup>d</sup>
100	22,20 <sup>e</sup>	31,11 <sup>d</sup>	35,56 <sup>d</sup>	0,29 <sup>g</sup>	0,44 <sup>f</sup>	0,85 <sup>e</sup>
150	0,44 <sup>g</sup>	21,30 <sup>e</sup>	23,30 <sup>e</sup>	0,04 <sup>h</sup>	0,23 <sup>g</sup>	0,50 <sup>f</sup>
200	0 <sup>h</sup>	0 <sup>h</sup>	<b>3,56<sup>f</sup></b>	0 <sup>g</sup>	0 <sup>g</sup>	<b>0,07<sup>h</sup></b>
250	0 <sup>h</sup>	0 <sup>h</sup>	0 <sup>h</sup>	0 <sup>g</sup>	0 <sup>g</sup>	0 <sup>g</sup>

Les données (fréquence de régénération et nombre de bourgeons par CCMt organogène) sont notées après 4 semaines de culture des CCMts sur un milieu MS supplémenté avec ANA (3,22 µM), BAP (26,6 µM), saccharose 2 %, AgNO<sub>3</sub> (10 µM) et différentes concentrations de CdCl<sub>2</sub> (0-250 µM). Les valeurs sont les moyennes de trois expériences indépendantes (5 boîtes de Pétri avec 15 CCMts chacune). Des lettres différentes indiquent une différence significative à  $p = 0,05$  (ANOVA et test LSD).

s'accroît avec l'augmentation de la concentration en  $\text{CdCl}_2$  (Tableau 3). Ceci est vrai pour les CCMts issues de cotylédons aussi bien que de pétioles et d'hypocotyles.

Si, en présence de  $150 \mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$  le pourcentage de régénération reste encore de 21 % pour les CCMts issues de pétioles et d'hypocotyles, il devient quasiment nul pour les CCMts issues de cotylédons (0,45 %). L'élévation à  $200 \mu\text{M}$  de la concentration en  $\text{CdCl}_2$  se traduit par la mort des CCMts issues de cotylédons et de pétioles (après 4 j de culture) et un très faible taux de régénération des CCMts issues d'hypocotyles (3,6 %) ; la concentration de  $250 \mu\text{M}$  leur étant létale.

#### **4.2.2- Effet de la concentration en $\text{CdCl}_2$ sur le nombre de bourgeons par CCMt**

L'application de  $\text{CdCl}_2$  à la concentration de  $5 \mu\text{M}$  affecte peu ou pas le nombre de bourgeons par CCMt lorsqu'elle provient de cotylédons qui se situe à 2,40 (Tableau 3). En revanche, cette concentration en  $\text{CdCl}_2$  induit une réduction significative du nombre de bourgeons qui baisse de 4,24 et 3,20 à 2,98 et 2,02 chez les CCMts issues d'hypocotyles et de pétioles respectivement. Pour les trois types de CCMts, le nombre de bourgeons diminue avec l'augmentation de la concentration en  $\text{CdCl}_2$  et, en présence de  $150 \mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$ , seules quelques unes des CCMts régénèrent encore des bourgeons. A la concentration de  $200 \mu\text{M}$  en  $\text{CdCl}_2$ , quelques unes des CCMts issues d'hypocotyles régénèrent en formant 1,13 bourgeon par CCMt (Tableau 3).

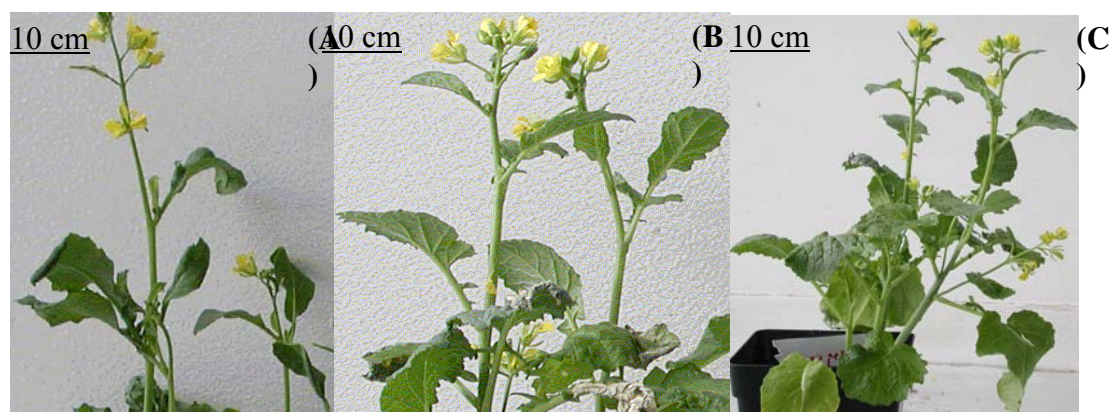
#### **4.2.3- Teneur en Cd dans les bourgeons néoformés**

Une mesure de la teneur en Cd a été réalisée dans les bourgeons issus de CCMts, après 27 j de culture en présence de différentes concentrations en  $\text{CdCl}_2$ . Quel que soit l'organe à l'origine des CCMts, la même teneur en Cd est retrouvée dans les bourgeons formés (Tableau 4). Il apparaît que la quantité de Cd accumulé augmente avec la concentration en Cd du milieu de culture, passant en moyenne de 33 à  $285 \mu\text{g Cd.g}^{-1}$  M.S. lorsque la concentration du milieu en  $\text{CdCl}_2$  s'élève de  $25$  à  $150 \mu\text{M}$ .

**Tableau 4** : Teneur en cadmium accumulé dans les pousses néoformées 27 j après initiation de la culture des CCMts excisées à partir de différents organes (cotylédons, pétioles, hypocotyles).

CdCl <sub>2</sub> (μM)	Teneurs du Cd par bourgeon (μg.g <sup>-1</sup> M.S.)		
	Cotylédons	Pétioles	Hypocotyles
0		0 <sup>e</sup>	0 <sup>e</sup>
25		29,23 <sup>d</sup>	30,43 <sup>d</sup>
50		76,45 <sup>c</sup>	78,57 <sup>c</sup>
100		166,32 <sup>b</sup>	172,34 <sup>b</sup>
150		<b>278,87<sup>a</sup></b>	<b>281,56<sup>a</sup></b>

Les données (teneurs de Cd dans les pousses néoformées) sont notées à 27 j de culture des CCMts sur un milieu MS supplémenté avec ANA (3,22 μM), BAP (26,6 μM), saccharose 2 %, AgNO<sub>3</sub> (10 μM) et différentes concentrations de CdCl<sub>2</sub> (0-150 μM). Moyennes de 3 expériences indépendantes (avec trois répétitions chacune). Des lettres différentes indiquent une différence significative à  $p = 0,05$  (ANOVA, et test LSD).



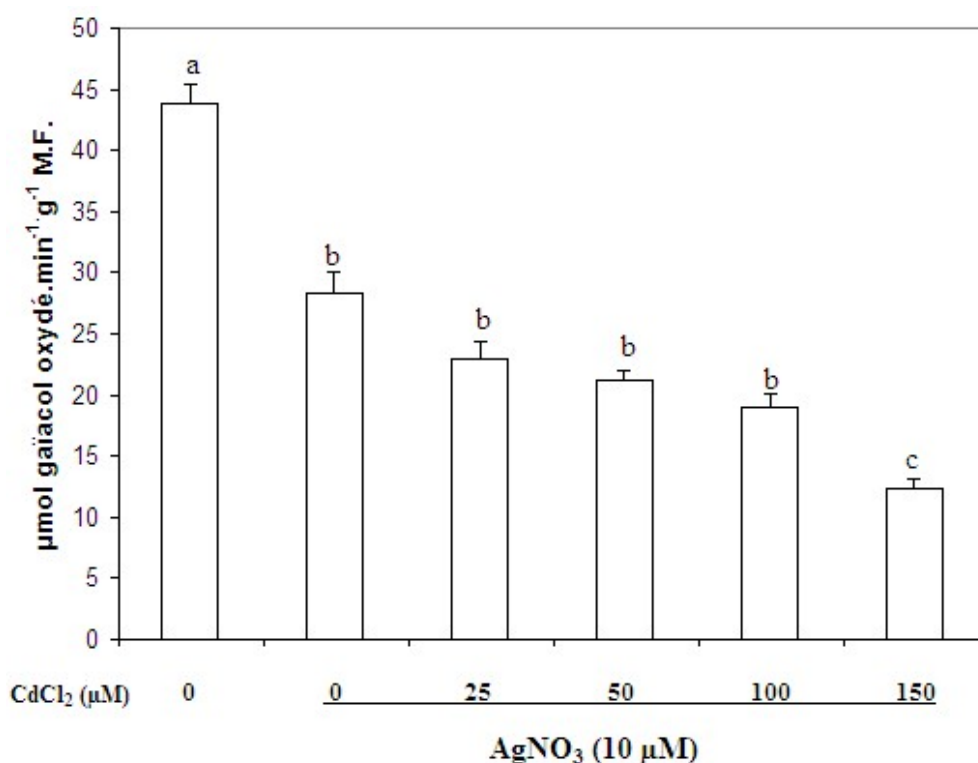
**Figure 14** : Plants régénérés, cultivés et fleuris normalement en serre, 6 semaines après transfert en pot (vermiculite-terreau 50/50) des bourgeons issus de CCMts cultivées *in vitro* en présence de CdCl<sub>2</sub>. CCMts issues de : cotylédon (+ 150 μM CdCl<sub>2</sub>) (A) ; pétiole (+ 150 μM CdCl<sub>2</sub>) (B) ; hypocotyle (+ 200 μM CdCl<sub>2</sub>) (C).

Après avoir été acclimatées pendant deux semaines en tube à essai sur un milieu MS, en absence de toute hormone de croissance, les plantes régénérées en présence ou non de CdCl<sub>2</sub> (5 à 200 μM) sont transférées en pots de terreau sous conditions de serre.

Aucune altération phénotypique n'a été détectée sur les plantes régénérées. Les plantes, quelle que soit la concentration en CdCl<sub>2</sub>, fleurissent normalement un mois plus tard et arrivent à maturité en donnant des graines viables, présentant une conformité apparente à celles de la plante mère (Figure 14).

#### 4.2.4- Mesure de l'activité gaïacol peroxydase (GPOX) au cours des premiers jours de mise en culture des CCMts issues d'hypocotyles

Les CCMts issues d'hypocotyles permettent l'obtention d'un nombre plus élevé de bourgeons en présence de 150 μM CdCl<sub>2</sub> et, contrairement à ce qui est observé pour les autres



**Figure 15** : Mesure de l'activité gaïacol peroxydase (GPOX) au niveau des CCMts issues d'hypocotyles cultivées pendant 8 j en présence ou non de AgNO<sub>3</sub> (10 μM) et de CdCl<sub>2</sub> (0-150 μM). Les valeurs sont les moyennes de 3 expériences indépendantes (avec 3 répétitions chacune) ± ES. Des lettres différentes indiquent une différence significative à  $p = 0,05$  (ANOVA, test LSD).

CCMts, cette régénération se produit encore à la concentration de 200  $\mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$  (Tableau 3). C'est pourquoi l'hypocotyle a été retenu pour la suite des expériences en culture *in vitro*.

La mesure de l'activité de la gaïacol peroxydase (GPOX) a été réalisée au niveau des CCMts après 8 j de mise en culture. L'addition de  $\text{AgNO}_3$  au milieu de culture induit une diminution significative de l'activité GPOX qui chute de 44 à 28,4  $\mu\text{mol}$  gaïacol oxydé. $\text{min}^{-1}.\text{g}^{-1}$  M.F (Figure 15).

Lorsque  $\text{CdCl}_2$ , aux concentrations variant de 25 à 100  $\mu\text{M}$ , est combiné à  $\text{AgNO}_3$  (10  $\mu\text{M}$ ), une diminution supplémentaire significative de 23 à 27 % de l'activité GPOX est observée, soit une réduction de 50 % par rapport au témoin (sans  $\text{AgNO}_3$ ). L'élévation à 150  $\mu\text{M}$  de la concentration en  $\text{CdCl}_2$ , induit à nouveau une réduction de cette activité enzymatique qui s'établit à 33 % de celle mesurée en présence de  $\text{AgNO}_3$  seul (Figure 15).

#### 4.2.5- Discussion et conclusion

La technique des couches cellulaires minces transversales (CCMts) utilisée dans ce travail constitue un système expérimental hors corrélations, présentant de nombreux avantages comparativement à la technique des explants traditionnels. Outre la disponibilité en grand nombre de CCMts à partir d'un organe donné, les CCMts présentent une surface de contact importante avec le milieu de culture, ce qui les rend plus réactives et leur permet une meilleure absorption des facteurs chimiques (glucides, régulateurs de croissance, macro- et micro-éléments...) pouvant déterminer l'expression morphogénétique. C'est ainsi qu'en utilisant les CCMts de *B. juncea*, l'obtention de cals s'est avérée possible après 4 à 5 j de culture et les premiers bourgeons apparaissent 5 j plus tard. Avec des explants traditionnels de brassicacées : *B. napus* (Tang *et al.*, 2003 ; Akasaka-Kennedy *et al.*, 2005), *B. carinata*, *B. rapa*, ou *B. juncea* (Tang *et al.*, 2003) observent la formation de cals après 7 j et les premiers bourgeons se forment 2 semaines plus tard.

Les résultats obtenus, qui sont très comparables à ceux rapportés pour la brassicacée *B. napus* à partir de couches cellulaires minces soit longitudinales par Klimaszewska et Keller (1985) soit transversales par Ben Ghnaya *et al.* (2008), constituent la première étude de régénération à partir de CCMts de *B. juncea*.

L'utilisation des CCMts s'est avérée particulièrement efficace au cours de notre étude, puisqu'elle a permis la régénération des trois génotypes de *B. juncea* utilisés, avec un taux de régénération pouvant atteindre 100 % dans certaines conditions.

Cependant, les résultats montrent que la caulogénèse de la moutarde indienne est influencée par des facteurs variés tels que la combinaison hormonale, la présence d'AgNO<sub>3</sub> et en tout premier lieu par le génotype et la nature de l'explant.

L'influence du génotype, rapportée dès 1980 par Tran Thanh Van pour le tabac et plus récemment pour le colza par Tang *et al.* (2003), Akasaka-Kennedy *et al.*, (2005) et Ben Ghnaya *et al.*, (2008), est retrouvée chez *B. juncea*. Ainsi, parmi les trois génotypes testés, deux d'entre eux : le génotype 2 (*B. juncea* AB79/1) et le génotype 1 (*B. juncea* I39/1), montrent une capacité de régénération nettement supérieure à celle du génotype 3 (*B. juncea* J99) qui s'est avéré plus récalcitrant.

Par ailleurs, il apparaît que le phénomène de néoformation est fortement dépendant de l'origine de l'explant. Pour tous les génotypes, les CCMts issues de cotylédons sont en effet plus caulogènes que celles issues de pétioles et d'hypocotyles et possèdent les taux de régénération les plus importants. Ceci confirme les travaux faits chez le colza qui rapportent l'influence de l'organe-source sur la caulogénèse tant des explants traditionnels (Tang *et al.* ; 2003) que des CCMts (Nhut *et al.*, 2003 ; Ben Ghnaya *et al.*, 2008).

L'importance de la combinaison hormonale dans les processus de régénération n'est plus à démontrer. Pour ne prendre en compte que quelques travaux portant sur les CCMts, citons ceux de Tran Thanh Van (1980), de Klimaszewska et Keller (1985) et de Ben Ghnaya *et al.* (2008).

Chez les CCMts de *B. juncea*, l'addition d'ANA (3,22 µM) au milieu de culture s'avère tout à fait indispensable pour l'induction de la régénération ; en effet, en son absence, aucune caulogénèse n'est observée (résultat non montré). L'adjonction à l'ANA de la BAP (26,6 µM) a permis l'organogénèse de nombreuses CCMts avec des pourcentages maxima de caulogénèse des CCMs de cotylédons de : 78,7 %, 30,5 % et 0,93 % respectivement chez des génotypes 1, 2 et 3. Le doublement de la concentration en BAP, non seulement n'améliore pas ces pourcentages de régénération mais réduit significativement ceux des CCMts de pétioles ; la régénération des CCMts d'hypocotyles demeurant très faible voire inexistante.



Le découpage des CCMts implique une surface de lésion importante, qui génère très certainement une production d'éthylène ; on sait en effet que les blessures constituent l'un des facteurs responsables de la synthèse de cette hormone (McKeon et Yang, 1987). L'ion argent est connu comme un inhibiteur puissant et spécifique de l'action de l'éthylène ; en se liant au récepteur de cette hormone, il en modifie sa conformation et empêche la liaison avec C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> (Reid, 1987).

L'addition de AgNO<sub>3</sub> au milieu de culture améliore sensiblement la néoformation de bourgeons des trois génotypes. Sont ainsi augmentés non seulement la fréquence de régénération qui peut atteindre 100 % dans certains cas mais également le nombre de bourgeons par CCMt, avec des valeurs de 2,40 à 4,45 /CCMt chez le génotype 2.

Ces résultats sont en concordance avec des travaux antérieurs portant sur des explants traditionnels de brassicacées issus de cotylédons (Burnett *et al.*, 1994 ; Chi *et al.*, 1991 ; Zhang *et al.*, 1998 ; Tang *et al.*, 2003), de pédoncules et segments foliaires (Pua et Chi, 1993 ; Eapen et George, 1997 ; Akasaka-Kennedy *et al.*, 2005) et d'hypocotyles (Chi *et al.*, 1990).

Ces travaux, obtenus en utilisant AgNO<sub>3</sub>, que ce soit avec des explants traditionnels ou les CCMts de *B. juncea*, s'accordent avec le rôle inhibiteur de l'éthylène, rapporté par Biddington (1992) et Pua (1999) pour différents processus de régénération *in vitro*.

En se basant sur l'ensemble des données, un protocole efficace de régénération de la moutarde indienne a été établi à partir de CCMts, avec un taux de caulogénèse élevé pour l'une des variétés testées, à savoir le génotype 2 d'où son utilisation pour la suite des expériences : la régénération en présence d'un élément-trace métallique (ETM), le cadmium.

Le milieu de culture MS (26,6 µM de BAP + 3,22 µM d'ANA + 10 µM de AgNO<sub>3</sub>) qui s'est révélé le plus favorable pour la caulogénèse du génotype 2, permettant un taux de régénération de la quasi-totalité des CCMts, a été retenu pour la suite des expériences.

Les résultats montrent que, quel que soit l'organe utilisé, l'addition de CdCl<sub>2</sub> peut affecter significativement la caulogénèse des CCMts. L'effet inhibiteur de CdCl<sub>2</sub>, visible dès 5 µM, s'accroît avec l'élévation de la concentration de ce métal jusqu'à 200 µM. Ces résultats confirment la tolérance de *B. juncea* vis à vis des métaux, précédemment rapportée

par Rout *et al.* (1999), qui observent pour cette espèce une régénération en présence de 240  $\mu\text{M}$  de Zn et 800  $\mu\text{M}$  de Mn

Pour les CCMts des différents organes, les pourcentages de caulogenèse et le nombre de bourgeons par CCMt varient sensiblement de la même façon lorsque la concentration en  $\text{CdCl}_2$  augmente de 5 à 100  $\mu\text{M}$ . En présence de 150  $\mu\text{M}$ , on observe une régénération de 21,3 et 23,3 % des CCMts de pétioles et d'hypocotyles respectivement ; les CCMts de cotylédons étant nettement moins réactives (0,44 %).

Quelle que soit l'origine de l'explant, les pousses néoformées accumulent du Cd proportionnellement à la concentration en  $\text{CdCl}_2$  ajouté dans le milieu de culture. En présence de 200  $\mu\text{M}$  en  $\text{CdCl}_2$ , un taux de caulogenèse de 3,56 % a pu être obtenu avec des CCMts issues d'hypocotyles. Après transfert en serre, les plantes néoformées en présence de 150 ou 200  $\mu\text{M}$  en  $\text{CdCl}_2$ , ne présentent aucune altération phénotypique ni retard de floraison et ceci devrait permettre l'utilisation de ce système de régénération en propagation clonale et pour diverses applications biotechnologiques de cette espèce.

Ces dernières années, un intérêt croissant a été porté à l'implication des ROS dans la croissance, le développement et la différenciation des cellules végétales (Jones et Smirnoff, 2005). Plusieurs travaux ont suggéré un lien entre les activités de certaines enzymes antioxydantes et l'organogenèse des cals (Konieczny *et al.*, 2008). La diminution par  $\text{AgNO}_3$  de l'activité de la GPOX dont le rôle est d'éliminer  $\text{H}_2\text{O}_2$  est associée à une capacité de régénération accrue, en accord avec les travaux de Tian *et al.* (2003) et Tang et Newton (2005).

Cependant, l'addition de Cd produit, en présence de  $\text{AgNO}_3$ , une baisse supplémentaire de l'activité GPOX et de la régénération des CCMts, relation contradictoire avec la suggestion précédente. Les métaux lourds sont connus pour accroître la formation de ROS (Siedlecka et Krupa, 2002), produisant un stress oxydatif secondaire dont une altération de la structure des protéines, par oxydation des groupes thiols (Davies, 1987 ; Van Assche et Clijsters, 1990 ; Dietz, 2005), conduisant à une baisse de l'activité de la GPOX. Dès lors, la sévérité du stress imposé par le Cd ne permet plus de lier l'activité de la GPOX et la régénération des bourgeons. Siedlecka et Krupa (2002) mentionnent en effet que, aussi longtemps que le stress engendré par les métaux lourds n'est pas trop fort pour la capacité de

défense de la plante, la principale réponse consiste en une augmentation des activités SOD et peroxydasiques.

Toutefois, ces résultats qui indiquent un stress sévère induit par le Cd, restent dans les limites d'une compatibilité avec une régénération des CCMts.

### 4.3- Obtention de régénérants en présence de CdCl<sub>2</sub>

Les CCMts issues d'hypocotyles sont cultivées sur le milieu MS pendant 6 semaines en présence ou non de CdCl<sub>2</sub> (150 µM). Les bourgeons néoformés sont prélevés et placés 2 semaines en tube sur un milieu MS dépourvu de Cd. Puis, les plants enracinés sont transférés et acclimatés 3 semaines sur de la vermiculite. Un traitement de 3 jours avec CdCl<sub>2</sub> (75 µM) est alors appliqué en conditions hydroponiques.

#### 4.3.1- Effet du cadmium (75 µM) sur la biomasse fraîche

La présence de CdCl<sub>2</sub> (150 µM) dans le milieu de culture des CCMts induit une diminution de la croissance des bourgeons néoformés.

**Tableau 5** : Effet d'un traitement de 3 j avec CdCl<sub>2</sub> (75 µM) sur la masse de matière fraîche des plants régénérés à partir des CCMts cultivées 6 semaines sur un milieu MS additionné ou non de CdCl<sub>2</sub> (150 µM).

CdCl <sub>2</sub> (µM)		0	150
0	Feuilles	2670 ± 150 <sup>b</sup>	1170 ± 50 (44 %) <sup>a</sup>
	Tige	390 ± 20 <sup>b</sup>	140 ± 10 (36 %) <sup>a</sup>
	Racines	130 ± 10 <sup>b</sup>	60 ± 3 (46 %) <sup>a</sup>
	Total	3190 ± 170 <sup>b</sup>	1370 ± 50 (43 %) <sup>a</sup>
75	Feuilles	2620 ± 190 <sup>b</sup>	1165 ± 40 (45 %) <sup>a</sup>
	Tige	400 ± 20 <sup>b</sup>	142 ± 10 (35,5 %) <sup>a</sup>
	Racines	130 ± 5 <sup>b</sup>	56 ± 4 (43 %) <sup>a</sup>
	Total	3150 ± 20 <sup>b</sup>	1363 ± 10 (43 %) <sup>a</sup>

Les résultats sont exprimés en mg de M.F. ± ES. Et en % par rapport aux témoins. Des lettres différentes indiquent des différences significatives à  $p = 0,05$  (test t) pour chaque organe.

Cette diminution, observée après avoir acclimaté les plantes enracinées pendant 5 semaines en l'absence de CdCl<sub>2</sub>, est due à une réduction de la masse totale de la matière fraîche de – 57 % (Tableau 5) et de la matière sèche de – 52 % (Tableau 6).

Cette inhibition résulte d'un abaissement significatif des masses de matière fraîche et sèche des différents organes pour lesquels on note des diminutions de 56 et 48 %, 64 et 66 % et 54 et 61 % respectivement pour les feuilles, les tiges et les racines. Cependant, lorsque les plantes régénérées en présence ou non de CdCl<sub>2</sub> (150 µM) sont soumises pendant 3 j à un traitement au CdCl<sub>2</sub> (75 µM) en conditions hydroponiques, leur croissance (matière fraîche et sèche) n'est pas significativement modifiée par rapport à leurs témoins respectifs (Tableaux 5 et 6).

**Tableau 6 :** Effet d'un traitement de 3 j avec du CdCl<sub>2</sub> (75 µM) sur la matière sèche des plantes régénérées, obtenues à partir des CCMts cultivées 6 semaines sur un milieu MS additionné ou non de CdCl<sub>2</sub> (150 µM).

CdCl <sub>2</sub> (µM)		0	150
0	Feuilles	248,23 ± 6,51 <sup>b</sup> (100%)	128,24 ± 3,07 (52 %) <sup>a</sup>
	Tige	42,80 ± 1,92 <sup>b</sup> (100%)	14,61 ± 0,17 (34 %) <sup>a</sup>
	Racines	27,91 ± 0,26 <sup>b</sup> (100%)	11,01 ± 0,10 (39 %) <sup>a</sup>
	Total	318,94 ± 0,17 <sup>b</sup> (100%)	153,86 ± 2,91 (48 %) <sup>a</sup>
75	Feuilles	251,21 ± 11,81 <sup>b</sup> (100%)	129,27 ± 2,72 (51 %) <sup>a</sup>
	Tige	43,31 ± 1,64 <sup>b</sup> (100%)	14,85 ± 0,35 (34 %) <sup>a</sup>
	Racines	27,86 ± 0,53 <sup>b</sup> (100%)	10,86 ± 0,09 (39 %) <sup>a</sup>
	Total	322,38 ± 11,08 <sup>b</sup> (100%)	154,98 ± 2,72 (48 %) <sup>a</sup>

Les résultats sont exprimés en mg de M.S. ± ES. Et en % par rapport aux témoins. Des lettres différentes indiquent des différences significatives à  $p = 0,05$  (test t) pour chaque organe.

#### 4.3.2- Accumulation du cadmium par les plantes régénérées

Le tableau 7 rapporte les quantités de Cd trouvées dans les différents organes de plantes soumises à une ou deux expositions à CdCl<sub>2</sub>.

La présence de CdCl<sub>2</sub> (150 µM) dans le milieu de culture des CCMts pendant 6 semaines, permet une accumulation de 154,83 µg Cd.g<sup>-1</sup> M.S. dans les racines des plantes régénérées puis acclimatées. Une teneur plus faible en Cd (46,34 µg.g<sup>-1</sup> M.S.) est retrouvée dans les tiges. Aucune teneur appréciable en Cd n'est observée dans les feuilles de ces plants (20 µg.Cd.g<sup>-1</sup> M.S.). En effet, les valeurs rapportées pour les plantes non exposées au cadmium (de 21 à 25 µg Cd.g<sup>-1</sup> M.S.) représentent le bruit de fond des mesures.

Lorsque les plants subissent uniquement le traitement de 3 j avec CdCl<sub>2</sub> (75 µM), en conditions hydroponiques, on observe une accumulation de Cd qui va décroissant depuis les racines (3070,84 µg Cd.g<sup>-1</sup> M.S.) vers les feuilles (463,17 µg Cd.g<sup>-1</sup> M.S.).

**Tableau 7** : Teneurs en Cd accumulé, exprimées en µg Cd.g<sup>-1</sup> M.S. ± ES. et en % par rapport aux témoins pour chaque organe.

CdCl <sub>2</sub> (µM)		0	150
0	Feuilles	21,14 ± 1,44 <sup>a</sup>	20,01 ± 0,34 (95 %) <sup>a</sup>
	Tige	25,00 ± 1,83 <sup>a</sup>	46,34 ± 2,90 (185 %) <sup>b</sup>
	Racines	22,83 ± 2,09 <sup>a</sup>	154,83 ± 6,12 (678 %) <sup>b</sup>
75	Feuilles	463,17 ± 41,62 <sup>b</sup>	264,43 ± 19,03 (57 %) <sup>a</sup>
	Tige	849,34 ± 56,20 <sup>b</sup>	686,67 ± 10,43 (81 %) <sup>a</sup>
	Racines	3070,84 ± 257,55 <sup>b</sup>	1544,00 ± 38,75 (50 %) <sup>a</sup>

Des lettres différentes indiquent des différences significatives à  $p = 0,05$  (test t) pour chaque organe.

Cependant, lorsque les plantes ont été régénérées en présence de CdCl<sub>2</sub> (150 µM), l'accumulation de Cd, mesurée après le traitement de 3j, est nettement inférieure à celle qui est observée chez les plantes issues de CCMts régénérées en absence de CdCl<sub>2</sub> (Tableau 7) ; l'accumulation s'avérant globalement 2 fois moindre dans les racines et les feuilles.

Pour s'affranchir des effets de Cd sur la croissance, la quantité de Cd accumulé a été exprimée par organe, en prenant donc en compte la matière sèche totale.

Les données du tableau 8 montrent que, chez les plants régénérés en présence de Cd, une faible accumulation de ce métal se produit dans les racines, avec 1,70 µg / racine et, la quantité totale de Cd trouvée dans le plant, est faible.

Lorsque les plants ont subi le traitement en chambre de culture avec CdCl<sub>2</sub> (75 µM), qu'ils aient été régénérés ou non en présence de Cd, il apparaît que ce sont les feuilles qui possèdent la plus grande quantité de Cd (Tableau 8). Toutefois, la quantité de Cd accumulé

dans les feuilles des plantes régénérées en présence de Cd s'avère 3,4 fois plus faible (34,18 µg / 116,52 µg). Cette moindre accumulation du Cd est également retrouvée dans les tiges et racines de ces plantes. Il en résulte une quantité totale de Cd accumulé par plant (61,15 µg), 4 fois plus faible que chez les plants régénérés en l'absence de Cd (238,85 µg).

**Tableau 8** : Accumulation de Cd dans les différents organes des plantes régénérées à partir de CCMts d'hypocotyles cultivées pendant 6 semaines en présence ou non de CdCl<sub>2</sub> (150 µM) puis acclimatées pendant 5 semaines et soumises à un deuxième traitement de 3 j avec CdCl<sub>2</sub> (75 µM).

CdCl <sub>2</sub> (µM)		0	150
0	Feuilles	5,25 ± 0,06 (100 %) <sup>b</sup>	2,57 ± 0,09 (98 %) <sup>a</sup>
	Tige	1,07 ± 0,01 (100 %) <sup>b</sup>	0,68 ± 0,01 (94 %) <sup>a</sup>
	Racines	0,64 ± 0,01 (100 %) <sup>a</sup>	1,70 ± 0,02 (279 %) <sup>b</sup>
	Total	6,96 ± 0,05 (100 %) <sup>b</sup>	4,95 ± 0,06 (71 %) <sup>a</sup>
75	Feuilles	116,52 ± 5,01 (100 %) <sup>b</sup>	34,18 ± 0,69 (24 %) <sup>a</sup>
	Tige	36,78 ± 0,40 (100 %) <sup>b</sup>	10,20 ± 0,31 (30 %) <sup>a</sup>
	Racines	85,55 ± 1,45 (100 %) <sup>b</sup>	16,77 ± 0,19 (19 %) <sup>a</sup>
	Total	238,85 ± 6,24 (100 %) <sup>b</sup>	61,15 ± 0,80 (25 %) <sup>a</sup>

Résultats exprimés en µg Cd / organe ± ES. Et en % par rapport à l'organe témoin. Des lettres différentes indiquent des différences significatives à  $p = 0,05$  (test t) pour un même organe.

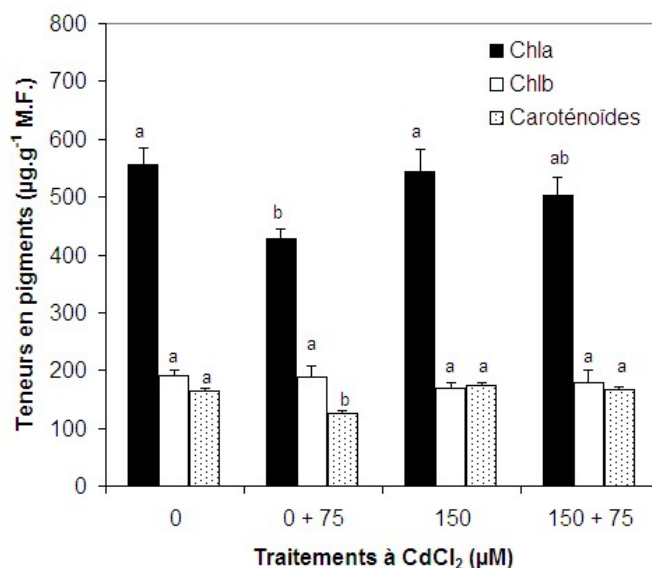
#### 4.3.3- Effet de CdCl<sub>2</sub> sur la teneur en pigments

La figure 16 montre que la régénération des plants en présence ou non de CdCl<sub>2</sub> (150 µM) ne produit pas de changement significatif de leur teneur en pigments et le rapport chlorophylles a / b se révèle être de 2,95 (témoin) et 3,24 (CdCl<sub>2</sub>).

En revanche, l'application d'un traitement à CdCl<sub>2</sub> (75 µM) à des plants régénérés en l'absence de Cd, induit une baisse significative de 33 % des teneurs en chlorophylle a et en caroténoïdes, abaissant le rapport chlorophylles a / b à la valeur de 2,38.

Cependant, si les plants régénérés en présence de CdCl<sub>2</sub> (150 µM) sont soumis à ce même traitement avec CdCl<sub>2</sub> (75 µM), aucun effet significatif n'est observé sur la teneur en pigments, comparativement aux témoins.

Il est à noter que quels que soient les traitements à  $\text{CdCl}_2$  appliqués, aucun effet sur la teneur en chlorophylle b n'est observé (Figure 16).



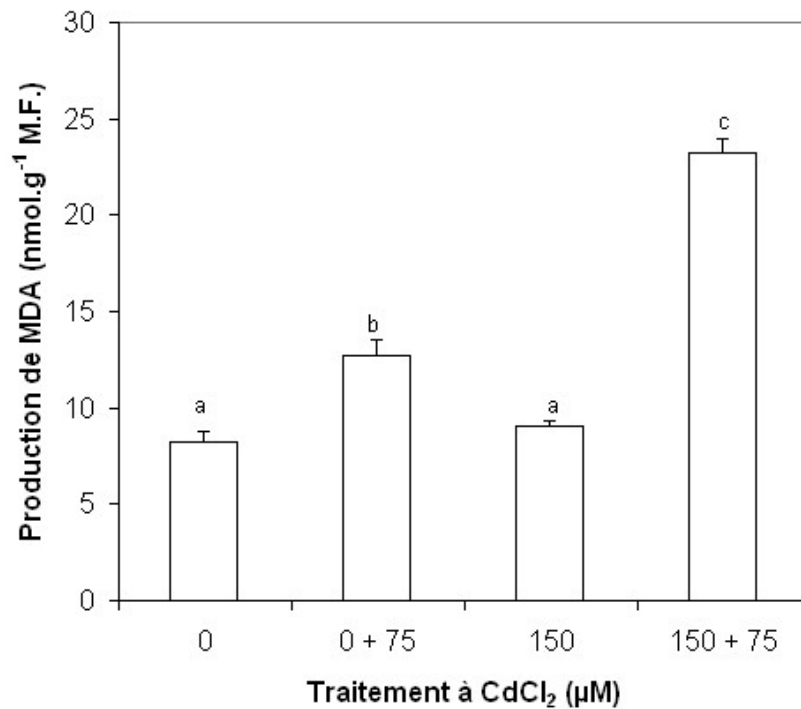
**Figure 16** : Teneurs en chlorophylles a, b et en caroténoïdes des feuilles de plantes régénérées à partir de CCMts, en présence ou non de  $\text{CdCl}_2$  (150  $\mu\text{M}$ ) et soumises ultérieurement à un traitement de 3 j à  $\text{CdCl}_2$  (75  $\mu\text{M}$ ). Les valeurs sont les moyennes de 3 expériences indépendantes (avec 3 mesures chacune)  $\pm$  ES. Des lettres différentes pour chaque pigment indiquent une différence significative à  $p = 0,05$  (ANOVA et test LSD).

#### 4.3.4- Effet de $\text{CdCl}_2$ sur la teneur en malondialdéhyde (MDA)

La teneur en malondialdéhyde (MDA) constitue un indicateur de la peroxydation de lipides et a été mesurée au niveau des feuilles.

L'application de  $\text{CdCl}_2$  (75  $\mu\text{M}$ ) pendant 3 j à des plants régénérés en l'absence de Cd se traduit par une augmentation significative (+ 55 %) de la formation de MDA dans les feuilles (Figure 17).

La régénération des plants en présence de  $\text{CdCl}_2$  (150  $\mu\text{M}$ ) ne produit, par rapport au témoin, aucun changement de production du lipoperoxyde qui, par contre, est fortement accrue par le traitement ultérieur de 3 j avec  $\text{CdCl}_2$  (75  $\mu\text{M}$ ) ; en effet, la production du MDA se trouve alors multipliée par un facteur 2,82 (Figure 17).



**Figure 17** : Production de malondialdéhyde (MDA) par les feuilles de plantes de *B. juncea* régénérées à partir des CCMts en présence ou non de CdCl<sub>2</sub> (150 μM) et soumises ultérieurement à un traitement de 3 j à CdCl<sub>2</sub> (75 μM). Moyennes de 3 expériences indépendantes ± ES. (avec 3 mesures chacune). Des lettres différentes indiquent une différence significative à  $p = 0,05$  (ANOVA et test LSD).

#### 4.3.5- Discussion et Conclusion

Les résultats montrent que la présence du CdCl<sub>2</sub> (150 μM) dans le milieu de régénération induit une réduction de la croissance des plantes néoformées. En effet, bien que les plantes régénérées en présence de CdCl<sub>2</sub> aient ensuite été cultivées en l'absence de ce métal pendant 5 semaines, des inhibitions de la biomasse fraîche de 56, 64 et 53 % sont observées respectivement pour les feuilles, tiges et racines. Parallèlement la masse de M.S. de ces différents organes est abaissée avec toutefois un effet moindre au niveau des feuilles et plus marqué pour ce qui est des racines (Tableau 6). Ceci traduit donc un effet de CdCl<sub>2</sub> sur la teneur en eau de ces organes.

A partir des données des tableaux 5 et 6, il apparaît donc que la teneur en eau s'établit pour les feuilles à 812 % de la M.S. (par rapport à 976 % chez le témoin) et, pour les racines, à 445 % de la M.S. (contre 366 % chez le témoin). La teneur en eau des tiges s'avère peu affectée par CdCl<sub>2</sub>, étant de 858 % par rapport à 811 % chez le témoin.



De nombreux travaux font état d'une inhibition de la croissance après traitement par le cadmium de plantes variées telles que le haricot (Poschenrieder *et al.*, 1989), le saule et le peuplier (Lunackova *et al.*, 2003 ; Cosio *et al.*, 2005), le riz (Fodor, 2002 ; Aina *et al.*, 2007), le tournesol (Groppa *et al.*, 2007a) et des plantes du genre *Brassica* comme le colza (Larsson *et al.*, 1998) et la moutarde indienne (Haag-Kerwer *et al.*, 1999), cet effet étant fonction de la concentration et de la durée du traitement avec CdCl<sub>2</sub>.

L'application ultérieure du traitement hydroponique avec CdCl<sub>2</sub> (75 µM) n'affecte pas significativement les paramètres de croissance, à savoir matière fraîche et matière sèche des différents organes de plants régénérés à partir de CCMts.

La teneur en chlorophylles est souvent utilisée pour évaluer l'impact de nombreux stress environnementaux. Les résultats montrent que la régénération en présence de CdCl<sub>2</sub> (150 µM) ne modifie ni la teneur en chlorophylles ni celle des caroténoïdes des plantes néoformées. Il apparaît donc que le retard de croissance engendré initialement par la présence de Cd lors de la néoformation des bourgeons et qui persiste après les 5 semaines d'acclimatation, n'a aucune incidence sur la biosynthèse des pigments. Une très faible teneur en Cd est trouvée dans les feuilles et une production de MDA non modifiée suggèrent un très faible stress oxydatif, sans impact sur les pigments.

En revanche, le traitement de 3j en conditions hydroponiques induit un abaissement de la teneur en chlorophylle a et en caroténoïdes. Ceci s'accorde avec de nombreux travaux qui rapportent une diminution du contenu en chlorophylle sous l'effet du Cd (Padmaja *et al.*, 1990 ; Larsson *et al.*, 1998 ; Groppa *et al.*, 2007a, b) et des métaux lourds en général (Chatterjee et Chatterjee, 2000 ; Mysliwa-Kurdziel et Strzalka, 2002 ; Lei *et al.*, 2007). La diminution de chlorophylle constitue un des événements primaires chez les plantes soumises au stress métallique et résulte de l'inhibition des enzymes responsables de la biosynthèse de chlorophylle (Stobart *et al.*, 1985 ; Mysliwa-Kurdziel et Strzalka 2002). Selon Mysliwa-Kurdziel et Strzalka (2002), le cadmium agit au cours de 2 étapes de cette biosynthèse, en inhibant la synthèse de l'acide aminolévulinique et en réduisant la transformation du protochlorophyllide en chlorophyllide.

Par ailleurs, le traitement hydroponique par le Cd, induit chez la moutarde indienne, une diminution du rapport chlorophylles a / b, en accord avec les travaux de Baszynski *et al.* (1980) et Larsson *et al.* (1998). La teneur en chlorophylle b n'étant pas affectée, il est

vraisemblable que l'abaissement de la chlorophylle a résulte d'une plus grande sensibilité à la toxicité du Cd, et pourrait être dû à une dégradation plus rapide ou à une synthèse moindre de ce pigment. Le Cd induit également une diminution de la teneur en caroténoïdes, en accord avec de nombreux travaux portant sur des plantes variées (Baszynski *et al.*, 1980 ; Larsson *et al.*, 1998 ; Mysliwa-Kurdziel et Strzalka 2002). La forte accumulation de Cd trouvée dans les feuilles est probablement responsable de la production de radicaux libres, attestée par l'augmentation significative de MDA ; ceci peut entraîner une destruction partielle des antioxydants que sont les caroténoïdes mais également de la chlorophylle a.

L'absence d'effet du traitement hydroponique sur la croissance de *B. juncea* est accompagnée d'une accumulation du Cd s'élevant à 0,052 % de la M.S. des parties aériennes. Cette valeur, inférieure à la valeur seuil de 0,1 % définie par Baker et Brooks (1989), pour une plante accumulatrice de métaux, pourrait vraisemblablement être atteinte après une exposition au cadmium de plus longue durée.

L'application du traitement hydroponique ne conduit à aucune inhibition supplémentaire de la croissance enregistrée en réponse à la présence de Cd durant la phase de régénération ; en effet, l'inhibition de la croissance des plants induite par le métal au cours de la néoformation des plants reste là encore établie après 5 semaines de sevrage. Bien que la production de MDA, indicatrice d'un stress oxydatif, soit fortement accrue par la succession des 2 traitements au cadmium, les teneurs en pigments ne sont pas significativement différentes de celles du témoin. Il semble donc que la présence du Cd au cours de la phase de régénération ait permis la mise en place, non seulement de systèmes de protection des pigments, mais également d'exclusion du Cd.

En effet, l'accumulation de Cd chez les plantes néoformées en présence du métal, s'avère après 3j d'absorption du métal, 4 fois moindre que chez les plantes régénérées en l'absence de cadmium. Cette exclusion partielle de Cd est confirmée, quoique atténuée, lorsque l'accumulation du Cd est rapportée au g. de M.S. ; en effet, cette expression ne prend pas en compte la réduction de croissance induite par le cadmium, apporté pendant la phase de néoformation des plantes. Malgré l'exclusion du Cd induite par la régénération en présence de Cd, la teneur de 0,031 % par rapport à la M.S. trouvée dans leurs parties aériennes, montre que les plantes gardent une certaine capacité d'accumulation du métal.

Il est vraisemblable que l'exclusion résulte avant tout d'une inhibition de transporteurs ou de canaux ioniques impliqués dans l'absorption racinaire (Cseh, 2002 ; Ann Peer *et al.*, 2003). En effet, si la quantité de Cd racinaire se trouve réduite de 50 % par rapport au seul traitement hydroponique, en revanche, la quantité de métal retrouvée dans les parties aériennes n'est diminuée que de 28 %. Une augmentation de la production de MDA est observée, indiquant une peroxydation des lipides accrue. Il est bien connu que la peroxydation des acides gras polyinsaturés des phospholipides membranaires entraîne un déficit des fonctions membranaires, au travers notamment d'une diminution de la fluidité et de l'inactivation des récepteurs et enzymes situés au niveau des membranes (Lagadic *et al.*, 1997). Ceci peut alors participer à une modification de la perméabilité membranaire. Il est également possible que l'exclusion partielle du Cd résulte d'un changement de la capacité des parois cellulaires à se lier au métal ou d'une excrétion accrue de substances chélatrices comme rapporté par Ghosh et Singh (2005) et Kirkham (2006).

Cette pression de sélection exercée par CdCl<sub>2</sub> ajouté au milieu de culture a permis d'obtenir des régénérants capables d'exclure le Cd lors d'un traitement ultérieur à CdCl<sub>2</sub>. Ces plants pourraient constituer un modèle intéressant pour l'étude des mécanismes d'exclusion du métal mais également être utilisés pour la culture sur des sols contaminés en métaux. Ceci contribuerait à diminuer les risques pour la santé lors de la consommation de la plante ou de ses produits dérivés.

## 4.4- Effet de traitements combinés : CdCl<sub>2</sub> et polyamines

Les expériences qui suivent portent sur l'effet de CdCl<sub>2</sub> sur des plantes issues de graines pour compléter l'étude précédente effectuée sur des plantes néoformées. Une pulvérisation foliaire de putrescine (1 mM) ou de spermidine (1 mM) a été combinée à un traitement de 3 j avec CdCl<sub>2</sub> (75 µM), en raison des propriétés anti-oxydantes reconnues de ces molécules.

### 4.4.1- Choix du génotype

Pour déterminer le génotype montrant la meilleure absorption de cadmium, une expérience préalable a été réalisée par apport au terreau de CdCl<sub>2</sub> (500 µM) pendant 4j. Les résultats du tableau 9 montrent que le génotype 1 absorbe et accumule davantage de Cd<sup>2+</sup> que les génotypes 2 et 3 et a été retenu pour la suite des expériences.

**Tableau 9** : Accumulation de Cd (µg.g<sup>-1</sup> M.S.) dans les parties aériennes et racinaires des 3 génotypes de *B. juncea* cultivés sur du terreau en présence de CdCl<sub>2</sub> (500 µM) pendant 4 j.

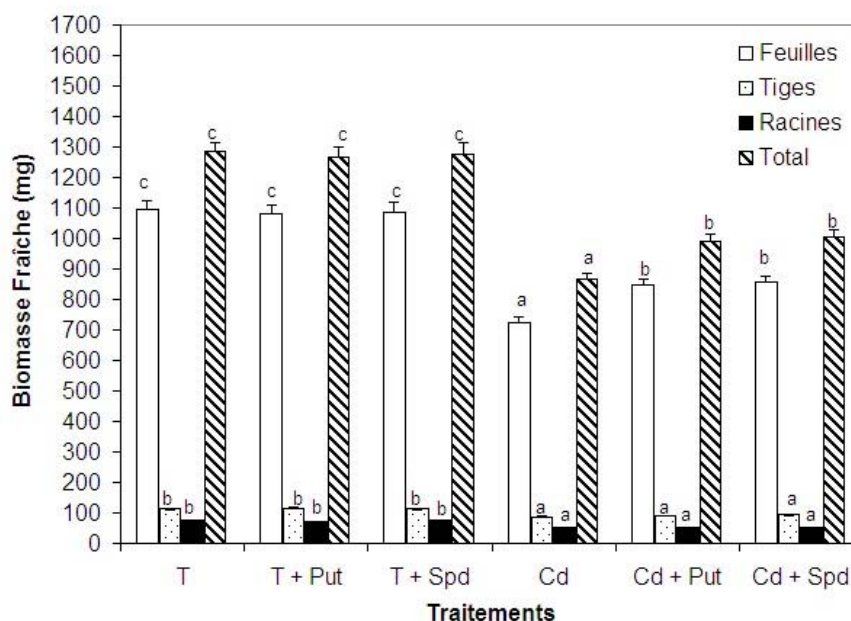
Génotype	Parties aériennes	Racines
1	33,98 ± 0,28 <sup>c</sup>	70,83 ± 0,49 <sup>a</sup>
2	14,90 ± 0,22 <sup>d</sup>	28,77 ± 0,09 <sup>c</sup>
3	27,88 ± 0,09 <sup>c</sup>	59,83 ± 0,16 <sup>b</sup>

Des lettres différentes indiquent des différences significatives à  $p = 0,05$  (ANOVA et test LSD).

### 4.4.2- Effet sur la croissance

#### 4.4.2.1- Effet sur la masse de matière fraîche

L'application exogène de putrescine ou de spermidine ne produit aucun changement significatif de la masse de matière fraîche des différents organes des plantes témoins (Figure 18).



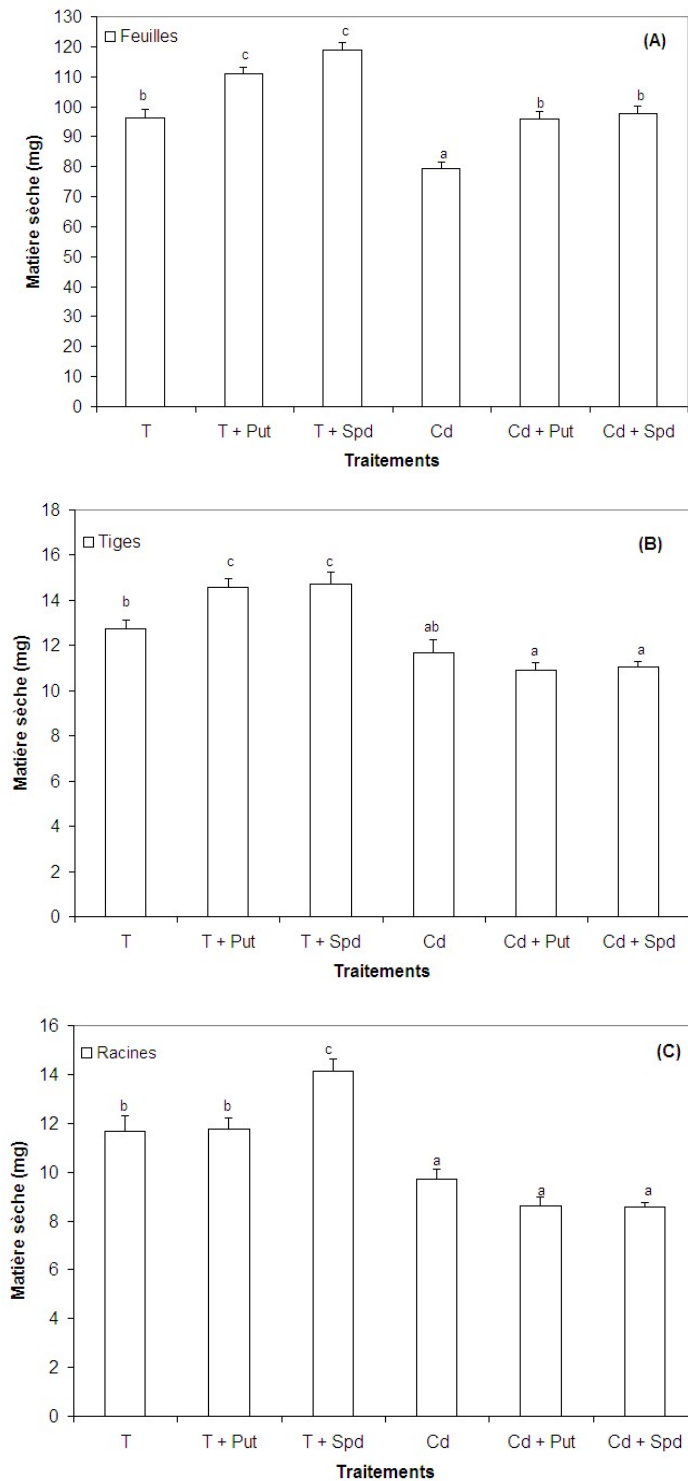
**Figure 18** : Effet d'une pulvérisation foliaire (70  $\mu$ l / plant) de putrescine (1 mM) ou de spermidine (1 mM) sur la biomasse fraîche des différents organes de plants de *B. juncea* âgés de 18 j et soumis en conditions hydroponiques à  $\text{CdCl}_2$  (75  $\mu$ M) pendant 84 h.

Moyennes de 3 expériences indépendantes (avec 3 répétitions chacune)  $\pm$  ES. Des lettres différentes pour un organe donné indiquent des différences significatives à  $p = 0,05$  (ANOVA et test LSD).

En revanche, la combinaison du traitement d'une de ces deux PAs avec  $\text{CdCl}_2$  (75  $\mu$ M) permet d'atténuer l'effet inhibiteur de la croissance foliaire induit par  $\text{CdCl}_2$  utilisé isolément. Ainsi, la réduction de la matière fraîche foliaire qui était de 34 % en présence de  $\text{CdCl}_2$  n'est plus que de 22-23 % lorsqu'une pulvérisation foliaire de PAs y est associée. Ceci se traduit au niveau de la masse fraîche totale de la plante par une variation équivalente de l'effet inhibiteur de  $\text{CdCl}_2$  qui de 32 % est réduit à 22-23 % Ni le traitement à la Put, ni le traitement à la Spd ne modifie la masse de matière fraîche des racines et des tiges dont les valeurs restent identiques à celles enregistrées après action du seul  $\text{CdCl}_2$  (Figure 18).

#### 4.4.2.2- Effet des traitements combinés polyamines et $\text{CdCl}_2$ sur la masse de matière sèche et sur la teneur en eau

L'application exogène de la Put ou de la Spd produit, comparativement aux plantes témoins, une augmentation significative de la masse de matière sèche des feuilles (+ 15 et + 24 %) et des tiges (+14 et + 16 %) (Figure 19).



**Figure 19** : Effet d'une pulvérisation foliaire (70  $\mu$ l / plant) de putrescine (1 mM) ou de spermidine (1 mM) sur la masse de matière sèche des feuilles (A), tiges (B) et racines (C) de plants de *B. juncea* âgés de 18 j et soumis, en conditions hydroponiques, à  $\text{CdCl}_2$  (75  $\mu$ M) pendant 84 h. Moyennes des 3 expériences indépendantes (avec 3 répétitions chacune)  $\pm$  ES. Des lettres différentes indiquent des différences significatives à  $p = 0,05$  (ANOVA et test LSD).

Concernant les racines, il apparaît que, si la pulvérisation de Spd induit également un accroissement de la matière sèche (+ 21 %), en revanche, le traitement avec la Put n'induit aucun effet.

Lorsque la pulvérisation foliaire des PAs est effectuée sur des plantes exposées à CdCl<sub>2</sub> (75 µM), il s'en suit une suppression totale de l'effet inhibiteur de CdCl<sub>2</sub> sur la masse de matière sèche des feuilles qui était de 17 %. En revanche, la combinaison des deux traitements ne permet pas de supprimer l'effet de CdCl<sub>2</sub> sur la masse de matière sèche des tiges et racines qui reste réduite de 13 et 17 % (Figure 19).

L'évaluation de la teneur en eau par rapport à la matière sèche est rapportée dans le tableau 10. Il apparaît que le traitement à CdCl<sub>2</sub> réduit de 22 % le pourcentage d'eau des feuilles et de 16 à 18 % celui des autres organes. Le traitement foliaire avec l'une ou l'autre des polyamines produit une diminution du pourcentage d'eau des différents organes (de 7 à 22 %). Lorsque la pulvérisation foliaire de Put ou de Spd est associée au traitement avec CdCl<sub>2</sub>, elle reste sans effet sur la perte d'eau des feuilles induite par Cd mais permet de maintenir le pourcentage d'eau des tiges et racines aux valeurs du témoin (Tableau 10).

**Tableau 10** : Evaluation du pourcentage d'eau exprimé par rapport à la matière sèche, à partir des données des figures 30 et 31 et en % par rapport aux témoins.

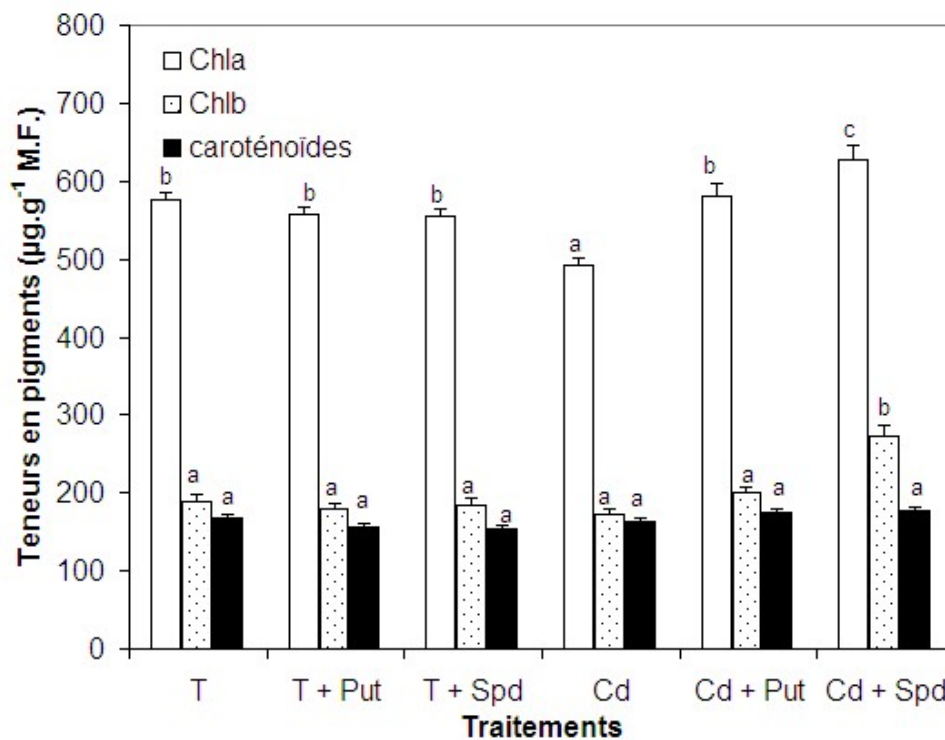
Traitements	Feuilles	Tiges	Racines
T	1043 (100 %)	780 (100 %)	540 (100 %)
T + Put	875 (84 %)	693 (89 %)	503 (93 %)
T + Spd	813 (78 %)	665 (85 %)	438 (81 %)
Cd	813 (78 %)	653 (84 %)	445 (82 %)
Cd + Put	786 (75 %)	732 (94 %)	506 (94 %)
Cd + Spd	778 (74 %)	746 (96 %)	505 (93 %)

#### 4.4.1.3- Effet d'une pulvérisation foliaire de polyamines combinée avec un traitement à CdCl<sub>2</sub> sur la teneur en pigments chlorophylliens

L'application foliaire de Put (1 mM) ou de Spd (1 mM) ne produit aucune modification de la teneur en chlorophylles a, b et caroténoïdes et le rapport chlorophylles a / b

se maintient à la valeur de 3,05 (Figure 20). Par contre, lorsque le traitement avec la Put est appliqué aux plantes exposées à  $\text{CdCl}_2$  ( $75 \mu\text{M}$ ), on observe une restauration à la fois de la teneur en chlorophylle a qui était significativement abaissée (de 15 %) par  $\text{CdCl}_2$  et du rapport chlorophylles a / b.

La combinaison des traitements avec la Spd et  $\text{CdCl}_2$  ( $75 \mu\text{M}$ ) permet non seulement de restaurer la teneur en chlorophylle a mais induit même une stimulation de sa teneur (+ 9 %) ainsi que de celle de la chlorophylle b (+ 42 %), teneurs évaluées par rapport au témoin. Il en résulte un abaissement du rapport chlorophylles a / b qui, de 2,84 en présence de  $\text{CdCl}_2$  chute à une valeur de 2,30.



**Figure 20** : Effet d'une pulvérisation foliaire ( $70 \mu\text{l}$  / plant) de putrescine (1 mM) ou de spermidine (1 mM) sur les teneurs en chlorophylles a et b et en caroténoïdes des Feuilles de plants de *B. juncea* âgés de 18 j et soumis, en conditions hydroponiques, à  $\text{CdCl}_2$  ( $75 \mu\text{M}$ ) pendant 84 h. Moyennes de 3 expériences indépendantes (avec 3 répétitions chacune)  $\pm$  ES. Des lettres différentes pour chaque pigment indiquent des différences significatives à  $p = 0,05$  (ANOVA et test LSD).



## 4.4.2- Accumulation de Cd dans les plants

### 4.4.2.1- Teneurs en Cd exprimées en $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ M.S.

Les données du tableau 11 montrent, qu'en l'absence de tout traitement au Cd, les valeurs rapportées sont toutes similaires et constituent le bruit de fond des mesures. Le traitement avec  $\text{CdCl}_2$  se traduit par une accumulation de Cd au niveau des différents tissus végétaux. Les teneurs les plus importantes sont trouvées au niveau racinaire ( $4506 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  M.S.) suivies par les tiges et les feuilles, avec respectivement 933 et  $355 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  M.S.

La pulvérisation foliaire de Put (1 mM) combinée au traitement avec  $\text{CdCl}_2$  (75  $\mu\text{M}$ ) n'induit aucun changement significatif des teneurs en Cd accumulé dans les différents organes.

**Tableau 11** : Effet d'une pulvérisation foliaire (70  $\mu\text{l}$  / plant) de putrescine (1 mM) ou de spermidine (1 mM) sur la teneur en Cd accumulé par gramme de matière sèche des différents organes de plants de *B. juncea* âgés de 18 j et soumis, en conditions hydroponiques, à  $\text{CdCl}_2$  (75  $\mu\text{M}$ ) pendant 84 h.

Traitements	Feuilles	Tiges	Racines
T	$24,19 \pm 1,26^a$	$22,11 \pm 2,07^a$	$21,67 \pm 2,47^a$
T + Put	$23,24 \pm 1,23^a$	$22,78 \pm 2,30^a$	$22,50 \pm 2,18^a$
T + Spd	$23,33 \pm 1,18^a$	$22,89 \pm 2,18^a$	$22,83 \pm 3,47^a$
Cd	$355,24 \pm 22,31^c$	$932,67 \pm 63,57^d$	$4506,00 \pm 307,98^f$
Cd + Put	$336,67 \pm 26,67^c$	$943,33 \pm 64,67^d$	$4771,83 \pm 336,48^f$
Cd + Spd	$285,09 \pm 15,13^b$	$1139,67 \pm 57,94^e$	$8378,33 \pm 459,39^g$

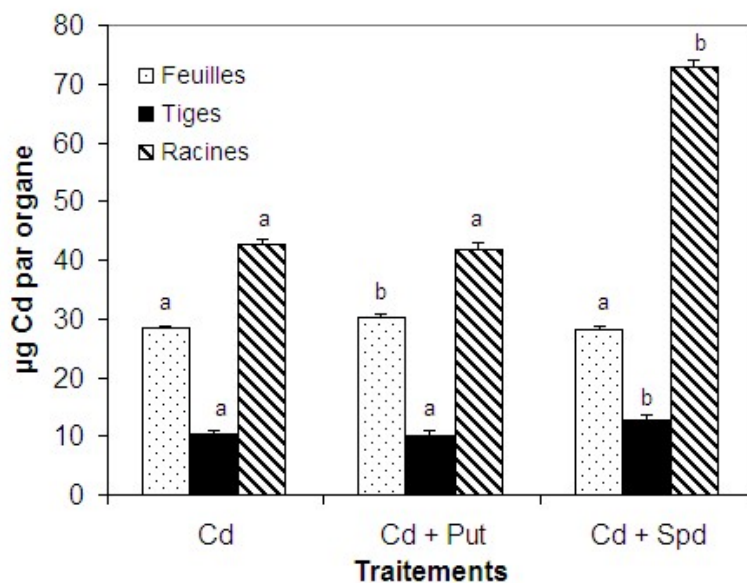
Moyennes de 3 expériences indépendantes (avec 3 répétitions chacune)  $\pm$  ES. Des lettres différentes par organe indiquent des différences significatives à  $p = 0,05$  (ANOVA et test LSD).

En revanche, lorsque le traitement à  $\text{CdCl}_2$  (75  $\mu\text{M}$ ) est associé à l'application exogène de Spd, le profil de distribution du Cd endogène est modifié ; en effet, on observe une plus forte accumulation de Cd dans les racines (+ 86 %) et dans les tiges (+ 22 %) cependant qu'une teneur moindre est retrouvée dans les feuilles (- 20 %).

#### 4.4.2.2- Quantités de Cd exprimées par organe

Les résultats de la figure 19 font état d'une action des traitements sur la teneur en matière sèche des différents organes. Pour s'affranchir de ces effets, les résultats de l'accumulation du Cd ont été exprimés par organe.

Les données de la figure 21 montrent que, quels que soient les traitements appliqués, un changement dans la distribution du Cd est observé. En effet, l'accumulation de Cd se fait préférentiellement dans les racines (43  $\mu\text{g}$ ) et dans les feuilles (28  $\mu\text{g}$ ) ; les tiges étant les organes montrant la plus faible accumulation en cet élément (10  $\mu\text{g}$ ).



**Figure 21** : Evaluation de la quantité de Cd accumulé par organe, à partir des données de la figure 19 et du tableau 11.

La pulvérisation de putrescine ne modifie pas le profil de distribution établi après le seul traitement à  $\text{CdCl}_2$  ; seule une légère augmentation (+ 7 %) de la quantité de Cd retrouvée au niveau des feuilles est observée.

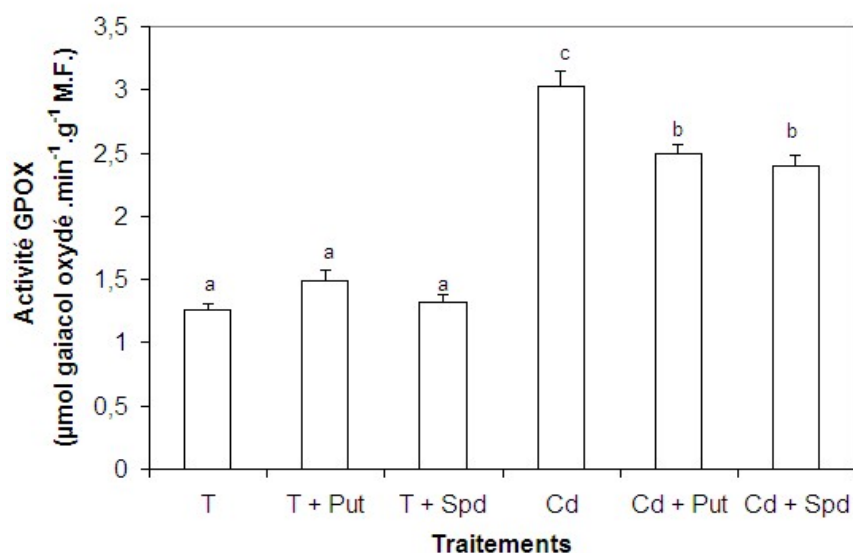
En revanche, lorsque la pulvérisation foliaire de Spd est combinée au traitement avec  $\text{CdCl}_2$  (75  $\mu\text{M}$ ), on observe des augmentations significatives de la teneur endogène en Cd des

racines (73,5  $\mu\text{g}$ ), et des tiges (12,4  $\mu\text{g}$ ) induisant ainsi des stimulations qui sont respectivement de 71 et 24 % ; la teneur en Cd des feuilles s'avérant non modifiée. Il apparaît donc que les plants ayant bénéficié du traitement conjugué Spd-CdCl<sub>2</sub> présentent une accumulation en Cd supérieure de 41% à celle des plants ayant été exposés uniquement à CdCl<sub>2</sub> (113,9  $\mu\text{g/plant}$  contre 81  $\mu\text{g/plant}$ ).

#### 4.4.3- Activité de la gaïacol peroxydase (GPOX) en réponse aux différents traitements

L'application exogène de Put (1 mM) ou de Spd (1 mM) ne produit aucun changement significatif de l'activité gaïacol peroxydase des feuilles (Figure 22).

Le traitement avec CdCl<sub>2</sub> (75  $\mu\text{M}$ ) induit une large augmentation de l'activité GPOX : + 140 % et, lorsque ce traitement est combiné à la pulvérisation foliaire de Put ou de Spd, il induit une réduction partielle de l'activité GPOX de 18-21 % ; cependant, l'activité GPOX demeure très nettement plus élevée que celle mesurée chez les plantes témoins : de + 94 %.



**Figure 22 :** Effet d'une pulvérisation foliaire (70  $\mu\text{l}$  / plant) de putrescine (1 mM) ou de spermidine (1 mM) sur l'activité de la gaïacol peroxydase dans les feuilles de plants de *B. juncea* âgés de 18 j et soumis, en conditions hydroponiques, à CdCl<sub>2</sub> (75  $\mu\text{M}$ ) pendant 84 h. Moyennes de 3 expériences indépendantes (avec 3 répétitions chacune)  $\pm$  ES. Des lettres différentes indiquent des différences significatives à  $p = 0,05$  (ANOVA et test LSD).

#### 4.4.4- Effet des traitements avec CdCl<sub>2</sub> et les polyamines sur la production de malondialdéhyde (MDA) par les feuilles

La pulvérisation foliaire de Put (1 mM) ou de Spd (1 mM) ne modifie pas significativement la production de MDA, indicateur de la peroxydation des lipides (Tableau 12). En revanche, l'exposition à CdCl<sub>2</sub> (75 µM) augmente significativement la formation de MDA, avec une stimulation de + 156 % par rapport au témoin.

L'application foliaire de Put combinée au traitement avec CdCl<sub>2</sub>, permet de supprimer totalement la production de MDA induite par CdCl<sub>2</sub>. Par contre, la combinaison du traitement de la spermidine avec CdCl<sub>2</sub>, ne permet qu'une atténuation de la stimulation produite par la seule exposition à CdCl<sub>2</sub>; la production de MDA restant de 71% plus élevée que chez le témoin.

**Tableau 12** : Effet d'une pulvérisation foliaire (70 µl / plant) de putrescine (1 mM) ou de spermidine (1 mM) sur la formation de MDA dans les feuilles de plants de *B. juncea* âgés de 18 j et soumis, en conditions hydroponiques, à CdCl<sub>2</sub> (75 µM) pendant 84 h. Les résultats sont exprimés en nmol MDA.g<sup>-1</sup> M.F. et en % par rapport au témoin.

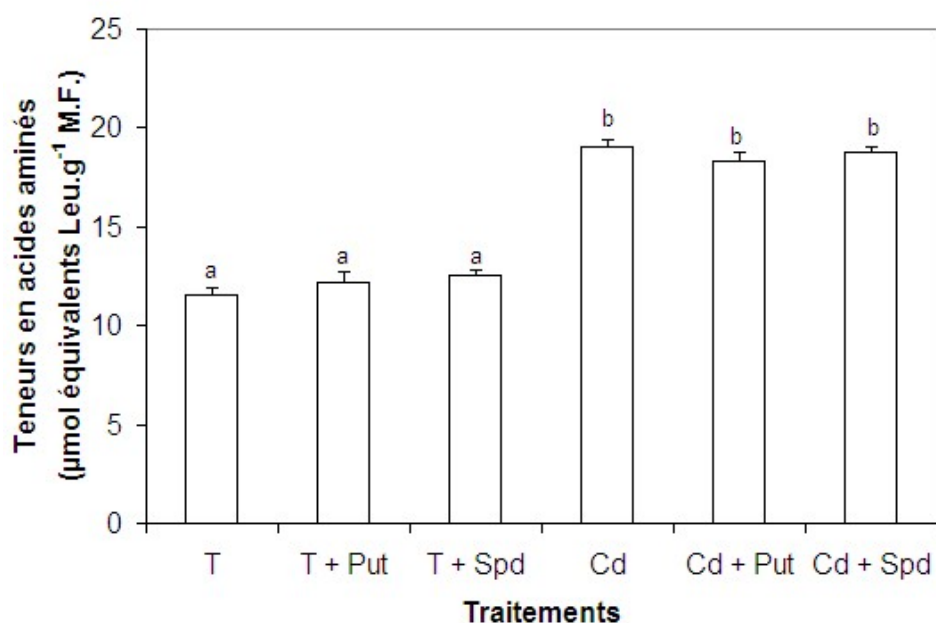
Traitements	Production de MDA (nmol.g <sup>-1</sup> M.F.)	% / témoin
T	13, 24 ± 1,01 <sup>a</sup>	100 %
T + Put	15,02 ± 1,61 <sup>a</sup>	113 %
T + Spd	12,67 ± 1,09 <sup>a</sup>	96 %
Cd	33,96 ± 1,98 <sup>c</sup>	257 %
Cd + Put	14,98 ± 1,16 <sup>a</sup>	113 %
Cd + Spd	22,68 ± 1,79 <sup>b</sup>	171 %

Moyennes de 3 expériences indépendantes (avec 3 répétitions chacune) ± ES. Des lettres différentes indiquent des différences significatives à  $p = 0,05$  (ANOVA et test LSD).

#### 4.4.5- Action des traitements sur la teneur en acides aminés des feuilles

##### 4.4.5.1- Action sur la teneur en acides aminés libres totaux

L'application foliaire de la Put (1 mM) ou de la Spd (1 mM) n'induit aucun changement significatif de la teneur en acides aminés (Figure 23). En revanche, le traitement avec CdCl<sub>2</sub> (75 µM) produit une augmentation significative de la teneur en acides aminés libres qui est de 65 % mais, la combinaison des deux traitements (CdCl<sub>2</sub> avec l'une ou l'autre des PAs), ne modifie en rien l'action de la seule application de CdCl<sub>2</sub> (Figure 23).



**Figure 23 :** Effet d'une pulvérisation foliaire (70 µl / plant) de putrescine (1 mM) ou de spermidine (1 mM) sur les teneurs en acides aminés totaux libres dans les feuilles de plants de *B. juncea* âgés de 18 j et soumis, en conditions hydroponiques, à CdCl<sub>2</sub> (75 µM) pendant 84 h. Les valeurs, exprimées en µmol. Equivalents de leucine.g<sup>-1</sup> M.F. sont les moyennes de 3 expériences indépendantes (avec 3 répétitions chacune) ± ES. Des lettres différentes indiquent des différences significatives à  $p = 0,05$  (ANOVA et test LSD).

##### 4.4.5.2- Action sur la teneur en proline libre

La proline est connue pour être synthétisée en réponse à de nombreux stress ; c'est pourquoi une attention particulière a été portée à cet acide aminé.

L'exposition à CdCl<sub>2</sub> (75 µM) induit une accumulation significative de proline dans les feuilles dont la teneur est multipliée par un facteur 2,28 par rapport au témoin (Tableau 13). L'application de Put ou de Spd ne modifie pas significativement la teneur en proline. En revanche, la pulvérisation foliaire de l'une ou l'autre de ces PAs à des plants exposés à CdCl<sub>2</sub> permet une réduction de l'accumulation de proline induite par CdCl<sub>2</sub> qui, totale avec la Put n'est que partielle avec la Spd ; en effet, le traitement à la Spd ne permet qu'un abaissement de 28% de la teneur en proline qui de 1,26 chute à 0,91 µmol proline.g<sup>-1</sup> M.F (Tableau 13).

**Tableau 13** : Effet d'une pulvérisation foliaire (70 µl / plant) de putrescine (1 mM) ou de spermidine (1 mM) sur les teneurs en proline des feuilles de plantes de *B. juncea* âgées de 18 j et soumises, en conditions hydroponiques, à CdCl<sub>2</sub> (75 µM) pendant 84 h.

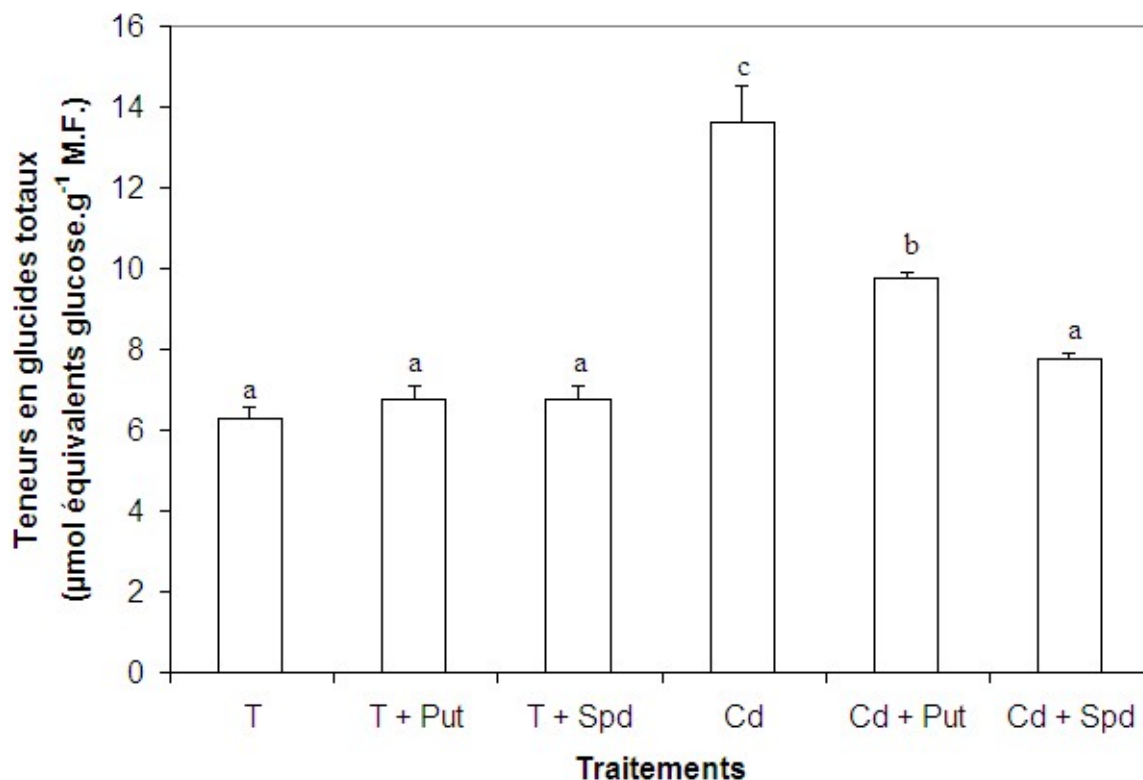
Traitements	Teneurs en Proline (µmol.g <sup>-1</sup> M.F.)	% / témoin
T	0,55 ± 0,02 <sup>a</sup>	100 %
T + Put	0,592 ± 0,04 <sup>a</sup>	107 %
T + Spd	0,56 ± 0,04 <sup>a</sup>	101 %
Cd	1,26 ± 0,06 <sup>c</sup>	228 %
Cd + Put	0,63 ± 0,03 <sup>a</sup>	113 %
Cd + Spd	0,91 ± 0,05 <sup>b</sup>	165 %

Les valeurs exprimées en µmol proline.g<sup>-1</sup> M.F. sont les moyennes de 3 expériences indépendantes (avec 3 répétitions chacune) ± ES. Des lettres différentes indiquent des différences significatives à  $p = 0,05$  (ANOVA et test LSD).

#### 4.4.6- Action des différents traitements sur la teneur en glucides solubles totaux

Lorsque la putrescine ou la spermidine sont apportées par voie foliaire, aucune modification de la teneur en glucides solubles totaux n'est observée au niveau des feuilles (Figure 24). L'addition de CdCl<sub>2</sub> au milieu nutritif produit une forte élévation de la teneur en

glucides, avec une stimulation de + 117 % par rapport au témoin. La combinaison des traitements : PA + CdCl<sub>2</sub> permet, dans le cas de la putrescine de réduire l'effet stimulateur engendré par CdCl<sub>2</sub> à une valeur de + 56 % par rapport au témoin et, dans le cas de la spermidine, de supprimer totalement la stimulation due à CdCl<sub>2</sub> (Figure 24).

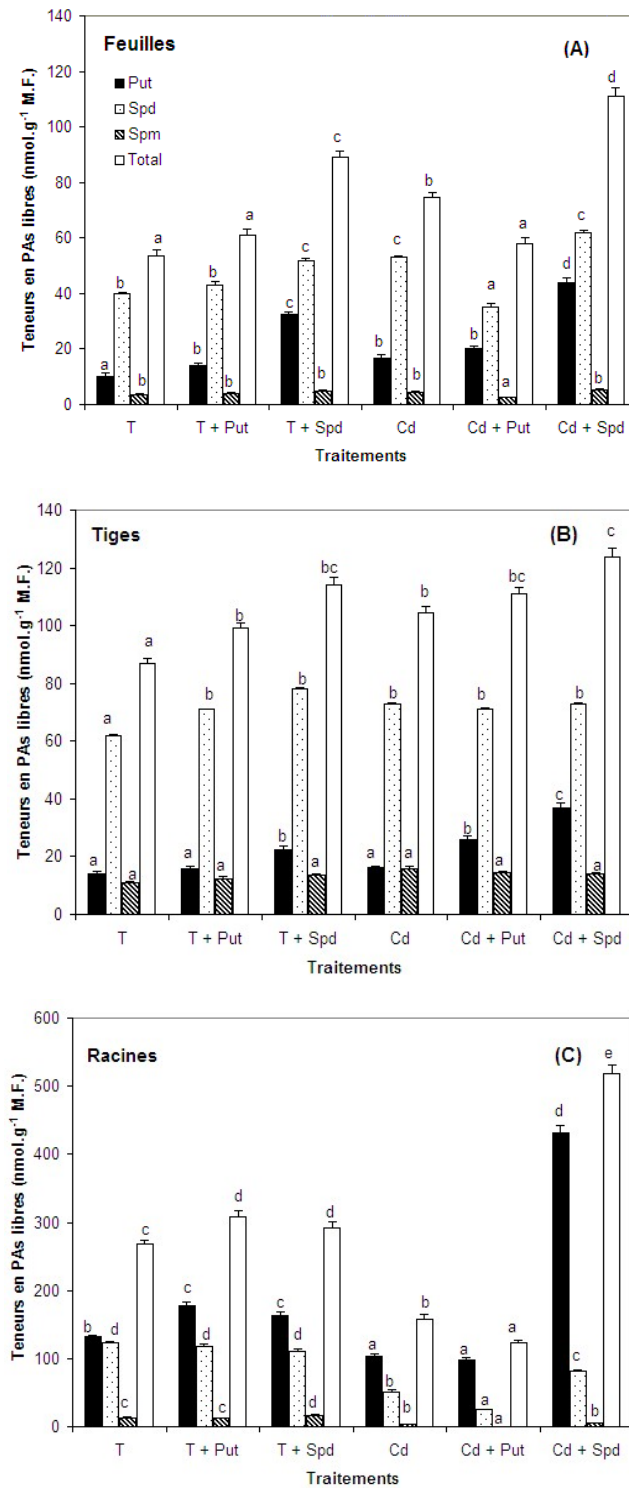


**Figure 24 :** Effet d'une pulvérisation foliaire (70 µl / plant) de putrescine (1 mM) ou de spermidine (1 mM) sur la teneur en glucides solubles totaux des feuilles de plants de *B. juncea* âgés de 18 j et soumis, en conditions hydroponiques, à CdCl<sub>2</sub> (75 µM) pendant 84 h. Les valeurs, exprimées en µmol-équivalents de glucose.g<sup>-1</sup> M.F. sont les moyennes de 3 expériences indépendantes (avec 3 répétitions chacune) ± ES. Des lettres différentes indiquent des différences significatives à  $p = 0,05$  (ANOVA et test LSD).

#### 4.4.7- Effet sur la teneur en polyamines (PAs) libres et conjuguées

##### 4.4.7.1- Teneur en PAs libres

L'effet des traitements sur la teneur en PAs libres a été évalué au niveau des différents organes et les résultats sont rapportés dans la figure 25.



**Figure 25 :** Effet d'une pulvérisation foliaire ( $70 \mu\text{l}$  / plant) de putrescine (1 mM) ou de spermidine (1 mM) sur les teneurs en PAs libres dans les feuilles(A), tiges (B) et racines (C) de plants de *B. juncea* âgés de 18 j puis soumis, en conditions hydroponiques, à  $\text{CdCl}_2$  ( $75 \mu\text{M}$ ) pendant 84 h. Moyennes de 3 expériences indépendantes (avec 3 répétitions chacune)  $\pm$  ES. Des lettres différentes pour chaque PA indiquent des différences significatives à  $p = 0,05$  (ANOVA et test LSD).



Quel que soit le traitement appliqué, les teneurs les plus élevées en PAs sont retrouvées au niveau des racines (Figure 25 C). Dans les parties aériennes des plants, la Spd s'avère la polyamine largement prédominante et, quel que soit l'organe considéré, la Spm la moins abondante.

L'application de CdCl<sub>2</sub> produit au niveau des feuilles et des tiges une augmentation de la teneur des 3 PAs qui se traduit par des accroissements de la teneur en PAs totales qui sont pour les feuilles et les tiges respectivement de 39 % et 21 % (Figure 25 A, B). Il est à noter une stimulation importante de la Put foliaire (+ 62 %) qui se traduit par une légère augmentation du rapport Put / Spd qui passe de 0,26 à 0,32 (Tableau 14). Au niveau racinaire, l'exposition à CdCl<sub>2</sub> induit un abaissement de 41 % des PAs totales résultant d'une réduction des teneurs en Put (- 22 %), Spd (- 58 %) et Spm (- 71 %) conduisant à une augmentation du rapport Put / Spd qui s'élève de 1,08 à 2,00 (Tableau 14).

Quand la Put est pulvérisée sur les feuilles, il s'en suit une légère augmentation des PAs totales des plants, significative dans les tiges et les racines, en raison d'une augmentation de la Spd (tiges) ou de la Put (feuilles, racines).

**Tableau 14** : Evaluation du rapport Put / Spd des différents organes, à partir des données de la figure 25.

Traitements			
	Feuilles	Tiges	Racines
T	0,26	0,23	1,08
T + Put	0,33	0,22	1,51
T + Spd	0,62	0,29	1,48
Cd	0,32	0,22	2,00
Cd + Put	0,58	0,37	3,98
Cd + Spd	0,71	0,51	5,34

L'application de la Spd à des plantes témoins se traduit par un fort accroissement des teneurs en Put dans les feuilles, tiges et racines avec des augmentations qui sont

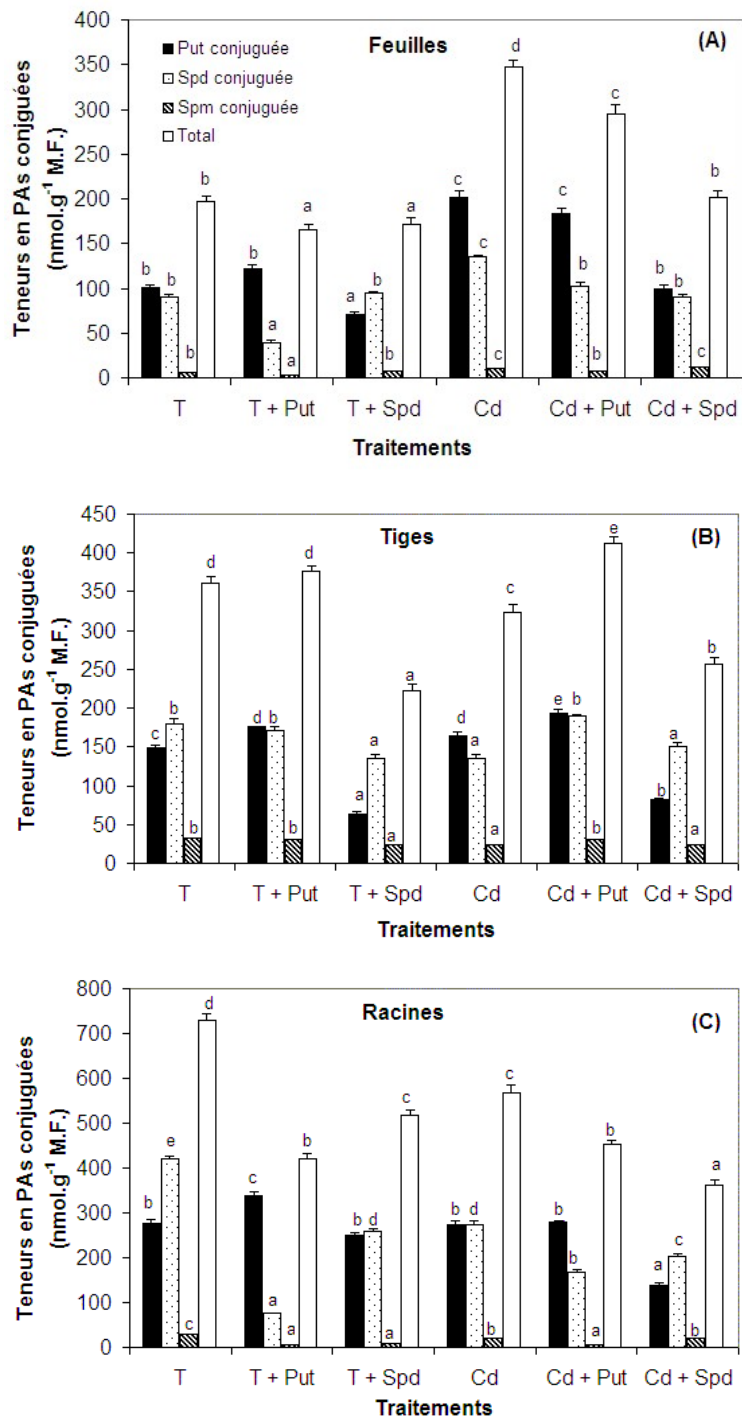
respectivement de + 215, + 58 et + 24 % (Figure 25). Quant à la Spd, sa teneur n'augmente significativement que dans les feuilles (+ 30 %) et dans les tiges (+ 27 %) et celle de la Spm, dans les racines (+ 29 %). Il en résulte des augmentations significatives des teneurs en PAs totales des feuilles (+ 66 %), des tiges (+ 32 %) ; au niveau des racines, l'augmentation n'est que de 9 %, en raison d'une légère diminution de la Spd. La forte stimulation enregistrée au niveau de la Put se traduit par une élévation du rapport Put / Spd qui s'établit à 0,62, 0,29, 1,48 respectivement pour les feuilles, les tiges et les racines contre 0,26, 0,23 et 1,08 chez les témoins (Tableau 14).

Lorsque la pulvérisation foliaire de Put est associée au traitement avec CdCl<sub>2</sub>, on observe une augmentation de la teneur en Put (+ 83 et 96 %) au niveau des parties aériennes, augmentation supérieure à celle observée après application de l'un ou l'autre des traitements (Figure 25 A, B). La combinaison des 2 traitements produit également un accroissement significatif de la teneur en Spd des tiges ; il s'en suit une augmentation de la teneur des PAs totales de + 28 %, supérieure là aussi, à l'effet de chacun des traitements utilisé isolément. La forte stimulation observée pour la Put engendre une modification du rapport Put / Spd qui s'établit à 0,58 dans les feuilles et à 0,37 dans les tiges (Tableau 14). La combinaison des 2 traitements produit une inhibition importante de la teneur en PAs totales des racines (- 54 %) due à une réduction de teneur de la Put (- 26 %) et surtout de la Spd (- 80 %) et de la Spm (- 96 %). Il en résulte une nette augmentation du rapport Put / Spd à la valeur de 3,98.

L'association des traitements de la Spd et de CdCl<sub>2</sub>, entraîne une forte stimulation de la teneur en Put dans les feuilles (+ 326 %), les tiges (+ 160 %) et les racines (+ 227 %), accompagnée d'une élévation plus modérée de la teneur en Spd (de + 18 à + 55 %) et en Spm (de + 28 à + 54 %) dans les parties aériennes. En revanche, une inhibition de la teneur en Spd (- 34 %) et Spm (- 59 %) est observée dans les racines. Dans tous les organes, de la très nette augmentation de Put, découlent des élévations significatives de la teneur en PAs totales (variant de + 42 % à + 107 %) et du rapport Put / Spd (de 2 à 5 fois plus élevé) (Tableau 14).

#### **4.4.7.2- Teneurs en PAs conjuguées**

Quels que soient les traitements, des teneurs importantes en PAs conjuguées très nettement supérieures à celles des PAs libres, sont retrouvées dans les différents organes (Figure 26), avec toutefois une exception, concernant les racines traitées avec Spd + CdCl<sub>2</sub> (Figures 25 et 26).



**Figure 26** : Effet d'une pulvérisation foliaire (70  $\mu\text{l}$  / plant) de putrescine (1 mM) ou de spermidine (1 mM) sur les teneurs en PAs conjuguées des différents organes (feuilles, tiges et racines) de plants de *B. juncea* âgés de 18 j et soumis, en conditions hydroponiques, à  $\text{CdCl}_2$  (75  $\mu\text{M}$ ) pendant 84 h. Moyennes de 3 expériences indépendantes (avec 3 répétitions chacune)  $\pm$  ES. Des lettres différentes pour chaque polyamine indiquent des différences significatives à  $p = 0,05$  (ANOVA et test LSD).

Chez les plants témoins, la Put conjuguée se révèle être la PA conjuguée majoritaire (Figure 26) et sa teneur s'avère 10 fois plus élevée que celle de la Put libre des organes aériens et 2 fois supérieure à celle des racines (Figure 25). Quant à la Spd et à la Spm conjuguées, leurs teneurs ne sont que 2 et 3 fois plus élevées que celles de ces molécules libres au niveau des différents organes.

L'exposition à  $\text{CdCl}_2$  induit une augmentation de la teneur des 3 PAs conjuguées des feuilles (+ 77 %), l'effet étant plus marqué pour la Put (+ 101 %). Concernant les tiges, on observe une réduction de la teneur en Spd et en Spm (- 25 %) contrebalancée par une légère augmentation de la celle de la Put qui font que la teneur en PAs totales s'avère au final peu affectée. Au niveau des racines, de la diminution des teneurs en Spm et Spd de 30-35 % découle un abaissement de la teneur globale des PAs de 22 %.

L'application exogène de la Put produit une élévation de la teneur en Put de 18 et 22 % dans les tiges et racines respectivement mais diminue celle des 2 autres PAs dans les feuilles (- 46 et 56 %) et dans les racines (- 80 %). Il en découle une réduction des PAs conjuguées totales de 16 % dans les feuilles et de 42 % dans les racines.

La combinaison des traitements de la Put avec  $\text{CdCl}_2$  produit, comme  $\text{CdCl}_2$  bien que de façon plus atténuée, une stimulation de la Put conjuguée des feuilles (+ 50 %). Une augmentation de la Put conjuguée est également observée dans les tiges (+ 30 %), de façon comparable aux effets produits par la Put ou le Cd utilisés isolément. L'action de ce traitement au niveau des racines se traduit comme ceux induits par les traitements isolés de  $\text{CdCl}_2$  et de la Put, par des inhibitions des teneurs de la Spd (- 60 %), de la Spm (- 83 %) conjuguées et des PAs conjuguées totales (- 38 %) ; la Put reste non affectée.

La pulvérisation foliaire de Spd entraîne, au niveau des feuilles, une diminution de la teneur en Put (- 30 %) et une augmentation de celle de la Spm (+ 36 %) sans variation de celle de la Spd ; il en résulte un léger abaissement des PAs conjuguées totales (- 14 %).

Concernant les tiges et les racines, le traitement à la Spd produit des réductions des PAs conjuguées totales respectivement de - 38 et - 29 %, résultant d'une inhibition des teneurs en Spd (- 25 et - 38 %), en Spm (- 25 et - 73 %) et en Put (- 57 et - 10 %).

Lorsque le traitement à la Spd est associé à l'exposition à  $\text{CdCl}_2$ , aucun changement significatif des PAs conjuguées totales n'est observé au niveau des feuilles par comparaison au témoin. Concernant les racines, la conjugaison du traitement à la Spd avec le Cd produit une réduction supplémentaire de la teneur en Put et Spd conjuguées, comparativement à ce qui est obtenu après application de l'un ou l'autre des traitements.

#### 4.4.8- Discussion et conclusions

Les résultats montrent que l'application de CdCl<sub>2</sub> (75 µM), en conditions hydroponiques, provoque une baisse de la croissance globale des plantes de 32 % due à une réduction des masses de matière fraîche (de 22 à 34 %) et sèche (de 9 à 17 %) des différents organes (Figures 18 et 19). Les pourcentages d'eau se trouvent également abaissés, chutant de 22 %, 16 % et 18 % respectivement dans les feuilles, les tiges et les racines (Tableau 10). Ces résultats s'accordent avec des travaux antérieurs portant sur des Brassicacées (Larsson *et al.*, 1998 ; Haag-Kerwer *et al.*, 1999 ; Singh et Tewari, 2003).

L'application foliaire de la Put ou de la Spd n'affecte pas la biomasse des différents organes de *B. juncea* mais produit une légère augmentation de leur masse de matière sèche (Figures 18 et 19) accompagnée d'une légère diminution du pourcentage d'eau des parties aériennes (Tableau 10). Lorsque le traitement foliaire avec l'une ou l'autre des PAs est associé à l'exposition à CdCl<sub>2</sub> (75 µM), il permet d'atténuer la réduction de la masse de matière fraîche des feuilles produite par le métal et d'annuler son effet sur la masse de matière sèche sans par ailleurs modifier la réduction du pourcentage d'eau. Aucune modification par les PAs des effets inhibiteurs des masses fraîche et sèche dus au cadmium sur les tiges et racines n'est observée. Seule la teneur en eau de ces organes, diminuée par le cadmium, est rétablie à la valeur du témoin par les PAs.

La mesure de la teneur en pigments permet d'évaluer la toxicité des métaux. L'exposition de 3j au Cd conduit à une diminution significative (- 15 %) de la teneur en chlorophylle a. Cet effet s'accorde avec des travaux antérieurs (Padmaja *et al.*, 1990 ; Larsson *et al.*, 1998 ; Groppa *et al.*, 2007a, b) et résulte, selon Mysliwa-Kurdziel et Strzalka (2002), d'une inhibition par Cd, de la biosynthèse de la chlorophylle ou d'une activation de la chlorophyllase (Abdel-Basset *et al.*, 1995). Le cadmium ne modifie pas la teneur en chlorophylle b et en caroténoïdes et, ici encore, la chlorophylle b apparaît être moins sensible que la chlorophylle a, à la toxicité du Cd. Il en résulte un léger abaissement du rapport chlorophylle a/b, en accord avec les travaux de Baszynski *et al.* (1980), Larsson *et al.* (1998) et Di Cagno *et al.* (1999).

Comparativement avec ce qui est obtenu avec des plantes issues de la régénération des CCMts, la réduction par le Cd du contenu en chlorophylle a s'avère atténuée chez les plantes

issues de graines, bien que les teneurs en pigments des témoins soient similaires dans les deux cas.

L'application exogène de Put ou de Spd ne modifie pas les teneurs en pigments. Cependant, quand la pulvérisation foliaire de l'une ou l'autre des PAs est associée au traitement par le cadmium, elle permet de maintenir la teneur en chlorophylle a et même, dans le cas de la Spd, d'augmenter le contenu en chlorophylles a et b.

Les PAs sont présentes dans les membranes des thylacoïdes, le PS II et dans les complexes de l'antenne collectrice (Kotzabatsis *et al.*, 1993 ; Legocka et Zajchert, 1999) et sont connues pour leurs propriétés antisénescentes (Galston et Kaur-Sawhney, 1987 ; Pandey *et al.*, 2000). Le fait que la seule application de Put ou de Spd exogène ne produise aucun effet sur les pigments semble indiquer que la Put et la Spd protègent avant tout les pigments par un piégeage des ROS produits sous l'effet du Cd, ROS qui entraînent une destruction des pigments. En effet, de nombreux travaux rapportent un effet protecteur des PAs exogènes vis-à-vis des stress oxydatifs générés par des facteurs environnementaux variés tels que l'ozone (Bors *et al.*, 1989 ; Navakoudis *et al.*, 2003), les radiations UV (Sfichi *et al.*, 2004), le paraquat (Chang et Kao, 1997 ; Benavides *et al.*, 2000), les pluies acides (Velikova *et al.*, 2000), la salinité élevée (Tang et Newton, 2005), le déficit hydrique et le froid (Nayyar et Chander, 2004) et les métaux (Tang *et al.*, 2005 ; Groppa *et al.*, 2001, 2007a, b). Par ailleurs, une protection de l'appareil photosynthétique par la Put exogène vis-à-vis de l'ozone et des radiations UV a été rapportée par Navakoudis *et al.* (2003) et Sfichi *et al.* (2004).

Les résultats montrent une absorption de Cd par les racines des plantes exposées pendant 3j à CdCl<sub>2</sub> (75 µM) suivie d'un transport vers les parties aériennes, indiquant ainsi un transport par le xylème comme montré par Salt *et al.* (1995a) et Gong *et al.* (2003). L'application de la Put ne modifie pas la teneur en Cd des différents organes ; toutefois un léger accroissement de la quantité de Cd est observé dans les feuilles, en raison d'une augmentation par la diamine de la masse sèche de ces organes.

La pulvérisation de Spd modifie le profil de distribution de Cd entre les différentes parties de la plante. Ainsi, la Spd induit une très forte stimulation de l'absorption racinaire suivie d'une augmentation du transport dans les tiges et ceci est vrai que les résultats soient exprimés en µg de Cd.g<sup>-1</sup> de M.S. ou en µg de Cd par organe. Une légère diminution de la teneur en Cd est produite par la Spd dans les feuilles pouvant expliquer la teneur plus élevée en chlorophylles (production diminuée de ROS et piégeage par la Spd). Cependant, compte

tenu de l'augmentation par la Spd de la masse de M.S. des feuilles, la quantité en Cd accumulée s'avère au final identique à celle trouvée dans les plants non traités à la Spd.

Pour tenter d'expliquer l'effet de la Spd au niveau racinaire, on peut émettre l'hypothèse d'un transport phloémien de la Spd vers ces organes, transport démontré par des travaux antérieurs (Béraud *et al.*, 1992 ; Antognoni *et al.*, 1998). Une modification de la perméabilité membranaire pourrait alors en découler ; on sait en effet que les polyamines peuvent influencer l'absorption racinaire d'un cation tel que le potassium (De Agazio *et al.*, 1988). Ces résultats diffèrent de ceux obtenus par Hsu et Kao (2007) qui rapportent une réduction de l'absorption de Cd par des feuilles détachées de riz, après prétraitement avec la Spd. L'utilisation de ce système simplifié peut vraisemblablement expliquer cette différence d'effet observée.

Il est maintenant bien connu que les stress abiotiques incluant les métaux lourds engendrent des dommages moléculaires dus à une surproduction d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). La surproduction de ces ROS cause une peroxydation des lipides qui conduit à la formation de produits de dégradation tels que les alcanes et des aldéhydes (malondialdéhyde) (Ferrat *et al.*, 2003).

Le malondialdéhyde (MDA), qui constitue un bon marqueur de la lipoperoxydation, est très nettement augmenté dans les feuilles des plants traités avec le cadmium. La pulvérisation foliaire avec l'une ou l'autre des PAs permet d'annuler (Put) ou de très fortement réduire (Spd) la production de MDA causée par le métal ; l'application de Put ou de Spd seule étant sans effet sur la formation de cet aldéhyde. Ces résultats traduisent donc un stress oxydatif généré par le cadmium et montrent un effet protecteur des PAs vis-à-vis de ce stress. Ces données s'accordent avec les travaux de Groppa *et al.* (2001), Wang *et al.* (2007) et Zhao et Yang (2008) qui rapportent une réduction par la Spd et la Spm exogènes de la peroxydation des lipides induite par Cd et Cu, respectivement dans les disques foliaires d'*Helianthus annuus* et dans les feuilles de *Nymphoides peltatum* et de *Malus hupehensis*.

Pour lutter contre les dommages oxydatifs, les plantes mettent en place des systèmes de défense antioxydants enzymatiques et non enzymatiques qui jouent un rôle en régulant les concentrations de ROS. Parmi les enzymes permettant la destruction des espèces radicalaires figurent les peroxydases.

Une forte augmentation de l'activité de la gaïacol peroxydase (GPOX) est induite dans les feuilles par le traitement avec Cd et ceci suggère un rôle de cette enzyme dans l'élimination de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produit en excès. Plusieurs études ont suggéré l'implication de la gaïacol peroxydase dans le stress oxydatif imposé par les métaux (Shah *et al.*, 2001 ; Schützenbüdel et Polle, 2002 ; Srivastava *et al.*, 2004 ; Smeets *et al.*, 2005 ; Mishra *et al.*, 2006 ; Hsu et Kao, 2007 ; Semane *et al.*, 2007). L'application foliaire de Put ou de Spd combinée avec le traitement par le cadmium, permet d'atténuer l'augmentation de l'activité de la gaïacol peroxydase induite par le métal. Contrairement à ce qui est observé par Tang *et al* (2005), la seule application exogène de Put ou de Spd ne produit aucun changement de l'activité peroxydasique ; on ne peut donc conclure à une induction de la synthèse *de novo* par la Spd de cette enzyme. Il est plus vraisemblable que les PAs exogènes (Spd, Spm) exercent une fonction antioxydante en protégeant les tissus des dommages oxydatifs induits par le cuivre et le cadmium comme rapportée par Groppa *et al.* (2007 a, b) et Wang *et al.* (2007).

L'exposition aux métaux lourds se traduit souvent par une synthèse de métabolites divers qui s'accumulent à des concentrations de l'ordre des millimoles, parmi lesquels figurent certains acides aminés (Costa et Spitz, 1997 ; Sharma et Dietz, 2006 ; Lei *et al.*, 2007), particulièrement la proline, des glucides (Samarakoon et Rauser, 1979 ; Jha et Dubey, 2004) et des polyamines (Taulavuori *et al.*, 2005 ; Sharma et Dietz, 2006 ; Groppa *et al.*, 2007a, b ; Groppa et Benavides, 2008).

L'exposition des plants au cadmium produit un doublement de la teneur en acides aminés libres totaux au niveau des feuilles. L'application foliaire de Put ou de Spd, qu'elle soit réalisée avec ou sans traitement par le cadmium, n'influence en aucune façon la teneur en acides aminés des feuilles. L'accumulation des acides aminés suite au stress métallique peut être expliquée par la dégradation de certaines protéines sensibles au stress soit par la synthèse de nouveaux acides aminés (Berlett et Stadtman, 1997 ; Siedlecka et Krupa, 2002 ; Hsu et Kao, 2003 ; Pena *et al.*, 2006 ; Sharma et Dietz, 2006).

Parmi les acides aminés la proline, bien que ne constituant que moins de 5 % des acides aminés libres (Matysik *et al.*, 2002 ; Lei *et al.*, 2007), est probablement l'un des métabolites de stress les plus répandus. Sa teneur, qui constituait 4,40 % des acides aminés totaux, est significativement augmentée dans les feuilles suite au traitement par le cadmium mais s'avère non affectée par la seule application foliaire de Put ou de Spd. En revanche,



lorsque l'application foliaire de l'une ou l'autre des PAs est associée au traitement par le cadmium, elle permet d'atténuer (avec la Put) voire de supprimer (avec la Spd) l'accumulation de proline induite par le cadmium.

Une augmentation de la proline sous l'effet du cadmium a été rapportée pour des plantes variées telles que le lupin (Costa et Spitz, 1997), le riz (Shah et Dubey 1998a, b), le radis (Chen *et al.*, 2003) et le soja (Balestrasse *et al.*, 2005). Une telle augmentation de la proline a également été observée sous l'effet d'autres métaux tels que le Mn (Lei *et al.*, 2007), le Zn, Pb, Co, Cu (Alia *et al.*, 1995 ; Schat *et al.*, 1997 ; Sharmila et Pardha Saradhi, 2002 ; Sharma et Dietz, 2006) mais aussi sous l'action d'autres types de stress : salin (Demiral et Türkan, 2005), hydrique (Taulavuori *et al.*, 2005), radiations UV (Pardha Saradhi *et al.*, 1995), thermique (Taulavuori *et al.*, 2005). La proline est considérée comme faisant partie d'un syndrome adaptatif général aux conditions environnementales défavorables. Différentes fonctions sont attribuées à l'accumulation de ce soluté compatible : osmorégulation, chélation et détoxification des métaux, protection des enzymes, régulation de l'acidité cytosolique, stabilisation de la machinerie de la synthèse protéique et piégeage des espèces réactives de l'oxygène (radicaux hydroxyles, oxygène singulet) (Sharmila et Pardha Saradhi, 2002).

Les résultats obtenus lors du traitement par le Cd conjugué avec l'application foliaire de Spd, semblent indiquer que la proline pourrait intervenir soit comme osmoticum soit par piégeage des ROS. En effet, une légère diminution du pourcentage d'eau / M.S. accompagnée d'une augmentation de la proline est observée, suggérant un rôle d'osmorégulation de la proline. En revanche, la combinaison des deux traitements (Cd et Put) n'affecte ni le pourcentage d'eau / M.S. des feuilles ni leur teneur en proline (identique à celle du témoin). Par ailleurs, la pulvérisation foliaire de Spd réduit partiellement la production de MDA et de proline induite par l'exposition au cadmium. Cet effet est compatible avec une fonction de protection des membranes contre l'attaque des radicaux libres, s'accordant avec les observations de Smirnoff et Cumbes (1989) qui suggèrent que la proline réagit avec les radicaux hydroxyles pour générer de l'hydroxyproline non toxique et celles d'Alia *et al.* (2001) et de Matysik *et al.* (2002) qui montrent un piégeage de l'oxygène singulet par la proline. De plus, la teneur accrue des chlorophylles pourrait résulter d'une protection par la proline des membranes thylacoïdales contre l'attaque des ROS comme rapporté par Kavi Kishor *et al.* (2005).

Outre les changements de teneur en acides aminés, une accumulation de glucides solubles a été rapportée en réponse à différents stress environnementaux et particulièrement des métaux (Samarakoon et Rauser, 1979 ; Moya *et al.*, 1993 ; Costa et Spitz, 1997 ; Dubey et Singh, 1999).

Les résultats montrent que le traitement par le Cd produit un doublement de la teneur en glucides solubles des feuilles mais la seule pulvérisation foliaire avec la Put ou la Spd n'induit aucun changement au niveau de ces métabolites. En revanche, la combinaison des deux traitements : Cd-PA permet, avec la Spd, une suppression totale de l'accumulation causée par le Cd et seulement une atténuation avec la Put.

Cette accumulation de glucides sous l'effet du Cd pourrait, à l'exemple de ce qui a été rapporté pour l'arsenic par Jha et Dubey (2004), résulter d'une altération des activités enzymatiques notamment l'invertase acide, la saccharose synthase et l'amidon phosphorylase. Costa et Spitz (1997) observent également une perturbation de la teneur en glucides solubles sous l'effet du Cd qui résulterait de l'action des radicaux libres produits. Une augmentation de la photosynthèse paraît en effet peu vraisemblable pour rendre compte de l'augmentation des sucres solubles observée, le Cd produisant un abaissement de 15 % de la teneur en pigments. L'application foliaire de Put ou de Spd à des plants exposés au Cd, se traduit par le maintien des pigments et donc vraisemblablement de la photosynthèse. On peut donc émettre l'hypothèse d'un piègeage par les polyamines, des radicaux libres produits sous l'effet du Cd, empêchant (avec la Spd) ou atténuant (avec la Put) ainsi la perturbation du métabolisme des glucides.

De nombreux travaux montrent l'implication des polyamines dans les mécanismes de défense durant les stress biotiques et abiotiques (Flores, 1991 ; Galston *et al.*, 1997 ; Bouchereau *et al.*, 1999 ; Taulavuori *et al.*, 2005 ; Groppa et Benavides, 2008) et peuvent fonctionner selon Rhee *et al.* (2007) comme des molécules de stress.

L'exposition des plants à Cd produit, au niveau des feuilles, une augmentation de la teneur en PAs libres et plus encore de celle des formes conjuguées, l'effet s'avère particulièrement marqué pour la Put. Ceci s'accorde avec des résultats antérieurs obtenus sous l'effet du Cd et du Cu pour des tissus foliaires de blé, d'avoine et de haricot qui montrent une augmentation de la Put libre due à une stimulation de l'activité ADC (Weinstein *et al.* 1986 ; Groppa *et al.*, 2003, 2007a, b) et également de celle de l'ODC (Groppa *et al.*, 2003, 2007a, b). Par ailleurs, une réduction de l'activité diamine oxydase par le Cd et le Cu, rapportée par Groppa *et al.* (2003) et Balestrasse *et al.* (2005), pourrait contribuer à l'augmentation de la

teneur en Put libre. Une élévation de la teneur en Put conjuguée est également rapportée par Weinstein *et al.* (1986) qui suggèrent que les PAs conjuguées peuvent servir de formes de stockage, pouvant s'échanger avec les PAs libres.

Le traitement des plants avec Cd produit, en revanche, une diminution des teneurs en PAs libres et conjuguées dans les racines. L'abaissement des PAs libres découle d'une réduction de la Put et plus encore de la Spd et de la Spm. La forte élévation du rapport Put/Spd qui en résulte, passant de la valeur 1,08 à 2,00, atteste d'une inhibition par Cd de la Spd synthase et donc de la teneur en Spd, entraînant par voie de conséquence une réduction de la synthèse de la Spm. Toutefois, l'abaissement par Cd des PAs racinaires, pourrait résulter non seulement de la réduction de leur synthèse mais également d'une inhibition de leur transport phloémien. En effet, l'accumulation des PAs observée dans les feuilles pourrait être en partie due à cette inhibition du transport.

La diminution des PAs conjuguées racinaires résulte d'une réduction des formes conjuguées de la Spd et de la Spm et s'accorde avec la notion que les PAs conjuguées peuvent constituer des formes de stockage. On ne peut rendre compte de cet abaissement de PAs conjuguées par une inhibition par le cadmium de leur transport phloémien ; en effet, contrairement aux PAs libres, les PAs conjuguées ne sont transportées ni par le phloème ni par le xylème (Antognoni *et al.*, 1998).

La pulvérisation foliaire de Put, de façon surprenante, modifie peu la teneur en Put libre des différents organes, à l'exception toutefois d'une augmentation légère mais significative dans les feuilles et les racines. En revanche, une élévation de la teneur en Put conjuguée est observée dans les différentes parties de la plante. Ceci suggère que la Put conjuguée pourrait contribuer à maintenir la teneur en Put libre à un niveau plus ou moins constant comme montré par Kuthanova *et al.* (2004). Le traitement avec la Put ne modifie que peu ou pas la teneur en Spd et Spm des différents organes mais réduit très fortement la teneur de leurs formes conjuguées dans les feuilles et les racines.

Ces résultats montrent donc que la Put exogène ne modifie pas la teneur en Put, Spd et Spm libres endogènes, pouvant laisser supposer un manque de pénétration de la diamine en raison de ses propriétés cationiques qui font qu'elle se lie aux sites anioniques de la paroi (Evans et Malmberg, 1989 ; Tiburcio *et al.*, 1990). Cependant, la pulvérisation foliaire de la Put, provoquant d'une part, une augmentation de la teneur en Put conjuguée et, d'autre part, une diminution des formes conjuguées de la Spd et de la Spm dans les feuilles et dans les racines, indique que la Put a non seulement été absorbée au niveau foliaire mais également

transportée par le phloème vers les racines. En effet, l'absorption des PAs a été mise en évidence dans différents systèmes végétaux (Bagni et Pistocchi, 1991 ; Theiss *et al.*, 2004) sans que l'on puisse toutefois conclure à l'existence générale d'un système de transport à haute affinité comme cela a été démontré pour les cellules animales (Huber *et al.*, 1996 ; Seiler *et al.*, 1996 ; Sakata *et al.*, 2000). Par ailleurs, on sait que les PAs sont transportées par le xylème (Friedman *et al.*, 1986 ; Antognoni *et al.*, 1998) mais également par le phloème (Friedman *et al.*, 1986 ; Béraud *et al.*, 1992 ; Antognoni *et al.*, 1998). On peut émettre l'hypothèse que l'homéostasie des PAs libres est maintenue et qu'elle est associée à une perturbation des formes conjuguées.

L'association des traitements de la Put et du Cd permet de maintenir la teneur en PAs totales au niveau de celle des feuilles du témoin avec toutefois un changement du profil de distribution des PAs : augmentation de la Put et diminution de la Spd et de la Spm. Il apparaît donc que le traitement à la Put ne modifie pas l'effet de Cd sur la teneur en Put foliaire mais contrarie l'effet du métal sur les teneurs en Spd et Spm qui deviennent légèrement inférieures à celles du témoin.

Concernant les PAs conjuguées des feuilles, la combinaison du traitement de la Put au Cd se traduit par une atténuation (Put conjuguée) ou une suppression (Spd et Spm conjuguées) des effets du Cd sur la teneur des formes conjuguées.

La teneur en PAs libres et conjuguées totales des tiges sont respectivement accrues de 28 % et 15 % par l'association des traitements de la Put au Cd, en raison essentiellement d'une accumulation de la Put libre et conjuguée.

Il apparaît donc que l'application de Put permet une certaine protection des feuilles, atténuant les effets stimulateurs du Cd sur leurs teneurs en Spd et Spm libres et conjuguées mais ne permet pas de modifier les perturbations induites par le métal seul sur les teneurs en Put libre et conjuguée des feuilles et en Put libre des racines.

La pulvérisation foliaire de Spd produit une augmentation des PAs libres totales au niveau des différents organes, résultant d'un accroissement de la Spd et surtout de la Put. Cet effet est particulièrement marqué au niveau foliaire ; en effet, on y observe une augmentation de la Spd, consécutive à la pulvérisation locale de cette triamine mais surtout un doublement de la teneur en Put. Une telle élévation de la Put a été rapportée par De Agazio *et al.* (1995), et Duhazé *et al.* (2002) après apport exogène de Spd dont la dégradation par une polyamine oxydase génère de la Put ; ceci permet ainsi d'ajuster l'excès de Spd. On ne peut exclure la

participation d'une voie d'interconversion de la Spd en Put, catalysée par la spermidine/spermine N1-acétyltransférase (SSAT), mise en évidence chez les cellules animales (Pegg, 1986 ; Rhee *et al.*, 2007). En effet, l'apport exogène d'acétylspermidine à des germinations d'*Arabidopsis thaliana*, se traduit par une forte augmentation de la Put libre (Tassoni *et al.*, 2000) et, par ailleurs, la présence de Spd et Spm acétylées a été rapportée par Torrigiani *et al.* (1993) et Del Duca *et al.* (1995).

Le traitement avec la Spd induit une diminution des PAs conjuguées totales dans les différentes parties de la plante, imputable à la baisse de Put conjuguée dans les parties aériennes et, pour les tiges et racines, à une baisse des formes conjuguées de la Spd et de la Spm qui ne peut s'expliquer que par une réduction de l'activité des transférases permettant la conjugaison avec les acides hydroxycinnamiques (Sun *et al.*, 1991).

Lorsque le traitement à la Spd est combiné au Cd, une forte augmentation de la teneur en PAs libres est induite dans les parties aériennes, découlant majoritairement d'une très importante élévation de la Put, nettement supérieure à celle observée lors de la seule application de la Spd. Cette accumulation de Put pourrait résulter à la fois d'une stimulation de sa synthèse, induite par le métal mais également d'une interconversion de la Spd en Put. Au niveau des racines, le traitement conjugué Spd-Cd augmente fortement la teneur en Put, contrariant l'effet inhibiteur produit par le Cd seul et amplifiant l'action du traitement avec la Spd exogène.

L'association du traitement de la Spd avec le Cd, permet de maintenir les PAs conjuguées des feuilles à des valeurs proches de celles trouvées chez le témoin, annulant l'effet stimulateur de Cd.

Ces résultats suggèrent que la Spd pourrait jouer un rôle de protection vis à vis de la toxicité du métal. Il est vraisemblable que l'accumulation de Put observée dans les différentes parties de la plante résulte d'une interconversion de la Spd en Put, cette dernière pouvant conférer une certaine tolérance au stress par le Cd.

## Conclusions générales

L'obtention des régénérants de *B. juncea*, par le biais de la culture *in vitro*, technique non OGM (organisme génétiquement modifié), a nécessité la mise au point et l'optimisation d'une méthode de régénération efficace par le biais de la technique des CCMts, avant de procéder à leur sélection en présence de CdCl<sub>2</sub>.

Pendant la mise au point de cette méthode, des différences génotypiques et de la nature des explants ont été mises en évidence. Des conditions optimales de régénération ont été également établies. En effet, le milieu MS supplémenté avec ANA (3,22 µM), BAP (26,6 µM), saccharose (2 %) et AgNO<sub>3</sub> (10 µM) s'est avéré optimal pour la régénération du génotype 2 qui présente une meilleure réactivité par rapport aux génotypes 1 et 3. Pour ces mêmes conditions, les cotylédons montrent une meilleure réactivité, suivis par les pétioles et les hypocotyles respectivement.

Cette méthode pourrait être utilisée pour la régénération d'autres génotypes de *B. juncea* et d'autres espèces de brassicacées, mais également pour étudier l'effet d'autres facteurs physico-chimiques, y compris, la nature et la concentration du glucide utilisé, la nature et l'intensité de la lumière utilisée, la photopériode, la thermopériode, la position sur l'organe de la couche mince excisée...

Pour la suite des expériences, le génotype 2 a été retenu en raison de sa plus grande réactivité ainsi que le milieu de régénération optimal décrit ci-dessus.

L'application de CdCl<sub>2</sub>, même à 5 µM, montre un effet inhibiteur et significatif de la caulogénèse (fréquence de régénération et nombre de bourgeons par CCMt). A partir de 200 µM, seules les CCMts d'hypocotyles sont encore capables de régénérer (3,56 %). Aucune régénération n'est observée à 250 µM qui s'avère létale pour les trois types de CCMts, vraisemblablement en raison d'une très forte production de ROS. En effet, Yakimova *et al.* (2006) rapportent que la mort cellulaire des cellules de tomate induite par le cadmium est accompagnée d'une production importante de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Chez les CCMts de *B. juncea*, en présence de Cd, la baisse d'activité de la GPOX pourrait être expliquée par une oxydation sous l'effet des ROS des groupes thiols de cette enzyme (Davies, 1987 ; Van Assche et

Clijsters, 1990 ; Dietz, 2005), réduisant ainsi l'élimination de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Ceci entraînerait, en fonction de la concentration en CdCl<sub>2</sub> appliquée *in vitro*, une baisse de la régénération voire la mort cellulaire des CCMts.

La concentration de Cd accumulé dans les bourgeons néoformés augmente avec la concentration en CdCl<sub>2</sub> du milieu de culture ; ceci atteste d'une absorption du Cd par les cals issus des CCMts suivie de son transfert aux bourgeons. Il est probable que cette pression de sélection induise des adaptations physiologiques qui incluent des mécanismes de détoxification et de tolérance aux métaux lourds (Hall, 2002).

Les plants néoformés en présence ou non de CdCl<sub>2</sub> ont été acclimatés pendant 5 semaines puis à nouveau exposés à CdCl<sub>2</sub> (75 µM) en culture hydroponique pour analyser leur capacité d'accumulation de ce métal.

L'efficacité du traitement avec CdCl<sub>2</sub> (150 µM) appliqué *in vitro* est attestée par la réduction de croissance chez les plants régénérés et une accumulation significative de Cd dans les racines, observée même après 5 semaines d'acclimatation.

L'application hydroponique de CdCl<sub>2</sub> (75 µM) pendant 3j révèle une adaptation physiologique des plants ayant été régénérés en présence de CdCl<sub>2</sub> (150 µM), avec une exclusion partielle du Cd par les différents organes de la plante (teneurs 3 à 5 fois moindres). La stratégie généralement adoptée par les plantes pour éviter l'accumulation excessive de métaux et ainsi d'empêcher les symptômes de toxicité, inclut une réduction du système d'absorption du plasmalemme comme montré par Hartley-Whitaker *et al.* (2001) pour l'arsenate et /ou un efflux à partir du cytosol (Hall, 2002).

L'adaptation physiologique engendrée par l'application *in vitro* de CdCl<sub>2</sub> est retrouvée au niveau des pigments. En effet, lorsque la régénération est effectuée en l'absence de CdCl<sub>2</sub>, l'exposition hydroponique au métal des régénérants produit un abaissement significatif (-33 %) de leur teneur en pigments. En revanche, malgré la production accrue de MDA, l'exposition des CCMts à CdCl<sub>2</sub> (150 µM) permet aux régénérants de 5 semaines, soumis au traitement hydroponique avec le métal de préserver leur teneur en chlorophylle a et en caroténoïdes. Ce maintien de la teneur en pigments découle vraisemblablement de l'exclusion partielle de Cd ; on sait en effet que le Cd inhibe la biosynthèse de la chlorophylle et/ou active la chlorophyllase.

Les processus impliqués dans la réduction de la toxicité présentent un intérêt certain pour comprendre les moyens de manipuler la tolérance aux métaux afin de pouvoir cultiver des plantes sur des sols hautement contaminés (Salt *et al.*, 1998) et de diminuer les risques liés à la consommation de leurs produits dérivés.

Complémentairement, l'étude de l'impact du cadmium a été menée sur des plantes issues de graines tant sur la croissance que sur quelques paramètres physiologiques. Un intérêt particulier a été porté aux PAs, connues pour être impliquées dans les mécanismes de défense durant les stress et pour participer à l'élimination des ROS.

L'application hydroponique de CdCl<sub>2</sub> (75 µM) produit une baisse de la croissance globale des plants de 32 % due à une réduction des masses de matière fraîche (de 22 à 34 %), de matière sèche (de 9 à 17 %) et de la teneur en eau (de 16 à 22 %) des différents organes. Ces résultats montrent que l'inhibition de la croissance par le Cd est fonction de l'âge des plants ; en effet, le même traitement hydroponique avec CdCl<sub>2</sub> (75 µM) appliqué à des plants issus d'*in vitro* acclimatés 5 semaines, n'affecte en rien leur croissance. En revanche, l'abaissement de la teneur en chlorophylle a des feuilles est observé quel que soit l'âge des plants bien que la teneur de ce pigment soit similaire dans les deux cas.

L'absorption du Cd par les racines est suivie d'un transport vers les feuilles et y induit un stress oxydatif révélé par une production de MDA accompagnée d'une augmentation de l'activité de l'enzyme anti-oxydante GPOX, impliquée dans l'élimination de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Cette accumulation de Cd se traduit également par une synthèse de métabolites variés : acides aminés libres totaux et glucides solubles ; ces molécules proviendraient d'une activation des enzymes hydrolytiques ou d'une stimulation de leur synthèse mais leur rôle reste encore mal élucidé.

Les glucides dont l'augmentation résulte, selon Jha et Dubey (2004), d'une activation de différentes enzymes hydrolytiques, contribueraient à l'élimination des ROS et à l'osmorégulation, augmentant la tolérance de la plante (Morsy *et al.*, 2007). Ligands potentiels des métaux lourds, certains acides aminés joueraient ainsi un rôle dans la tolérance et la détoxification (Hall, 2002 ; Hsu et Kao, 2003 ; Sharma et Dietz, 2006). Parmi les acides aminés, la proline constitue un indicateur de stress environnementaux. Sous l'effet du cadmium, le doublement de sa teneur dans les feuilles accompagnée d'une diminution de la teneur en eau, est en accord avec son rôle d'osmoticum reconnu.



Après exposition à Cd, les PAs, substances antioxydantes non enzymatiques, augmentent fortement dans les feuilles, l'effet étant particulièrement marqué pour la Put ; cette accumulation résulterait d'une activation de la synthèse et/ou d'une réduction de la dégradation mais également d'une inhibition du transport phloémien expliquant la baisse des PAs racinaires. Une variation des PAs conjuguées est également observée sous l'effet de Cd ; ces molécules dont le rôle est mal connu serviraient de formes de stockage, pouvant s'échanger avec les PAs libres.

La pulvérisation foliaire de Put ou de Spd n'affecte que peu ou pas la croissance et le métabolisme des plants. En revanche, ces deux PAs permettent de réduire certaines perturbations foliaires engendrées par le Cd : atténuation de l'inhibition de la croissance, maintien voire stimulation des pigments et de la quantité de Cd accumulé par organe, réduction totale ou partielle de la production de MDA, de l'activité GPOX, de la formation de proline et des glucides solubles. Seule l'accumulation des acides aminés totaux induite par Cd reste peu affectée par l'application foliaire de Put ou de Spd. Ces différents effets confirment le rôle antioxydant reconnu des PAs ici apportées de façon exogène.

Par ailleurs, que les plants aient subi ou non une pulvérisation foliaire de Put, une augmentation équivalente de la Put endogène foliaire est produite par le Cd dans les deux cas. Le rôle des PAs endogènes serait, selon Sharma et Dietz (2006), de stabiliser et de protéger les systèmes membranaires, par interactions ioniques avec les composés chargés négativement, contre les effets toxiques des ions métalliques. Cette protection par la Put interne vis à vis du stress métallique est confirmée par l'apport exogène de Put qui permet de réverser la production de MDA et de la proline et d'atténuer l'activité de la GPOX, induites par Cd.

Cependant, la question se pose de savoir pourquoi la Put endogène, augmentée par le stress, n'a pas les mêmes effets que la Put exogène sur la levée des dommages dus au Cd. La possibilité d'une compartimentation de la Put a été suggérée par Liu *et al.* (2006). Suite au stress, la Put serait majoritairement synthétisée par l'ADC principalement localisée dans les chloroplastes et le noyau et le transport membranaire de la Put serait faible et de ce fait ne pourrait agir sur le lieu de préjudice du métal.

Le Cd produit également une forte augmentation de la Put conjuguée, qu'il y ait pulvérisation foliaire ou non de la Put ; ceci pourrait permettre le maintien de l'équilibre homéostatique des PAs libres cellulaires.

L'effet protecteur de la Put exogène vis à vis de Cd est retrouvé au niveau des tiges où on observe une accumulation de Put libre et conjuguée.

En revanche, la pulvérisation foliaire de Put ne permet pas de contrarier la diminution, induite par Cd, de la Put interne et ni celle des formes libres et conjuguées de la Spd et de la Spm racinaires. Il est vraisemblable que l'accumulation importante de Cd par les racines, en contact direct avec le métal, y induit un stress sévère et une diminution de la croissance, équivalente à celle produite par Cd, qui ne peuvent pas être surmontés par la Put, apportée au niveau foliaire.

L'implication de la Put dans la protection contre le stress dû à Cd est confirmée par la pulvérisation foliaire de Spd. En effet, l'apport de Spd se traduit par une forte augmentation de la teneur en Put interne des feuilles (+ 214 %), augmentation accentuée par le traitement avec Cd (+ 326 %). Cette élévation de la Put résulte soit d'une dégradation par la PAO soit d'une interconversion de la Spd en Put, catalysée par la spermidine/spermine N1-acétyltransférase et permet d'une part, de réguler la teneur endogène en Spd et d'autre part, de protéger contre le stress engendré par Cd. En effet, la teneur en Spd des feuilles n'est que faiblement augmentée (+ 18 et 22 %) par l'apport exogène de cette triamine et la pulvérisation foliaire de Spd avec l'augmentation de Put endogène qui y est associée, permet une inhibition de la production de ROS (diminution du MDA et de l'activité GPOX) et de la proline. Les PAs conjuguées foliaires, non modifiées par la Spd exogène, ne semblent pas participer à l'équilibre des PAs libres contrairement à ce qui est observé après apport de Put.

De la pulvérisation foliaire de Spd résulte également une teneur élevée en Put endogène dans les tiges et racines, accentuée, comme dans les feuilles, par le traitement avec Cd. Ceci suggère un transport phloémien des PAs. La diminution par Cd de la Spd et Spm libres racinaires n'est que faiblement atténuée par l'apport exogène de Spd qui accentue même l'abaissement des PAs conjuguées.

Par ailleurs, la Spd exogène permet une meilleure absorption racinaire de Cd, suivie d'un transport xylémien accru dans les tiges ; ceci se traduit par une accumulation de Cd, supérieure de 41 % à celle des plants ayant été exposés uniquement à CdCl<sub>2</sub>. L'augmentation par la Spd exogène du pouvoir accumulateur de Cd par les plants ainsi que la protection apportée au niveau foliaire (croissance et pigments, piégeage des radicaux libres), permettent d'envisager son utilisation dans le processus de phytoextraction et soulignent l'importance agro-économique des PAs comme cela a été récemment rapporté par Kusano *et al.* (2008).

Ces données montrent que l'application exogène de PAs peut atténuer les perturbations induites par le stress métallique et trouver une utilisation pratique en protégeant les plants contre les dommages oxydatifs, conduisant à une meilleure tolérance au métal.

**-A-**

Abdel-Basset R., Issa A.A. et Adam M.S., 1995 : Chlorophyllase activity : Effects of heavy metals and calcium. *Photosynthetica* 31 : 421-425.

Adams D.O. et Yang S.F., 1979 : Ethylene biosynthesis : Identification of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76 : 170-174.

Adriano D.C., 2001 : *In* : Trace Metals in Terrestrial Environments : Biogeochemistry, Bioavailability and Risks of Metals, Springer-Verlag, New york, pp. 866 Second ed.

Aina R., Labra M., Fumagalli P., Vannini C., Marsoni M., Cucchi U., Bracale M., Sgorbati S. et Citterio S., 2007 : Thiol-peptide level and proteomic changes in response to cadmium toxicity in *Oryza sativa* L. roots. *Environ. Exp. Bot.* 59 : 381-392.

Akasaka-Kennedy Y., Yoshida H. et Takahata Y., 2005 : Efficient plant regeneration from leaves of rapeseed (*Brassica napus* L.) : The influence of AgNO<sub>3</sub> and genotype. *Plant Cell Rep.* 24 : 649-654.

Ali R.M., 2000 : Role of putrescine in salt tolerance of *Atropa belladonna* plant. *Plant Sci.* 152 : 173-179.

Ali G., Srivastava P.E. et Iqbal M. 2000 : Influence of cadmium and zinc on growth and photosynthesis of *Bacopa monniera* cultivated *in vitro*. *Biol Plant.* 43 : 599-601.

Alia, Prasad K.V.S.K., Pardha Saradi P., 1995 : Effect of Zinc on free-radicals and proline in *Brassica juncea* and *Cajanus cajan*. *Phytochem.* 39 : 45-47.

Alia, Mohanty P. et Matysik J., 2001 : Effect of proline on the production of singlet oxygen. *Amino Acids* 21 : 195-200.

Alkorta I., Hernandez-Allica J., Becerril J.M., Amezaga I., Albizu I. et 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. *Environ. Sci. Biotechnol.* 3 : 71-90.

Ames B.N., Shigenaga T.M. & Hagen T.M., 1993: Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 7915-7922.

Ann Peer W., Baxter I.R., Richards E.L., Freeman J.L. et Murphy A.S., 2003 : Phytoremediation and hyperaccumulator plants. *Int. J. Phytorem.* 5 : 89-103.

Ann Peer W., Baxter I.R., Richards E.L., Freeman J.L. et Murphy A.S., 2005 : Phytoremediation and hyperaccumulator plants. *Topics Curr. Genet.*, Jan 2005, DOI 10.1007/4735\_100.

Antognoni F., Fornalè S., Grimmer C., Komor E. et Bagni N., 1998 : Long-distance translocation of polyamines in phloem and xylem of *Ricinus communis* L. plants. *Planta* 204 : 520-527.

Appel K. et Hirt H., 2004 : Reactive oxygen species : metabolism, oxidative stress and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55 : 373-399.

Asada K. et Takahashi M., 1987 : Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis. In *Photoinhibition*, Kyle D.J. Osmond C., Arntzen C.J. eds, Elsevier, New York, pp227-297.

Aziz A., Martin-Tanguy J. et Larher F., 1997 : Plasticity of polyamine metabolism associated with high osmotic stress in rape leaf discs and with ethylene treatment. *Plant Growth Regul.* 21 : 153-163.

## **-B-**

Baccouch S., Chaoui A. et El Ferjani E., 1998: Nickel-induced oxidative damage and antioxidant responses in *Zea mays* shoots. *Plant Physiol.Biochem.* 36: 689-694.

Baccouch S., Chaoui A. et El Ferjani E., 2001: Nickel toxicity induced oxidative damage in *Zea mays* shoots. *J.Plant Nutr.* 24 : 1085-1097.

Bagni N., Serafini-Fracassini D. et Torrigiani P., 1982 : Polyamines and cellular growth processes in higher plants. In Wareing P.F. (ed), *Plant Growth Substances*. Academic Press, pp. 473-482.

Bagni N. et Pistocchi R., 1991 : Uptake and transport of polyamines and inhibitors of polyamine metabolism in plants. In Slocum R.D. and Flores H.E. (ed.) : *Biochemistry and Physiology of Polyamines in Plants*, CRC Press, Boca Raton, London, pp. 105-118.

Bagni N. et Tassoni A., 2001 : Biosynthesis, oxidation and conjugation of aliphatic polyamines in higher plants. *Amino Acids* 20 : 301-317.

Baize D. et Sterckeman T., 2001 : Of the necessity of knowledge of the natural pedo-geochemical background content in the evaluation of the contamination of soils by trace elements. *Sci. Tot. Environ.* 264 : 127-139.

Baker A.J.M. et Brooks R.R., 1989 : Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements. A review of their distribution, ecology and phytochemistry. *Biorecovery* 1 : 81-126.

Baker A.J.M., Reeves R.D. et Hajar A.S.M., 1994 : Heavy metal accumulation and tolerance in British populations of the metallophyte *Thlaspi caerulescens* J. et C. Presl (*Brassicaceae*). *New Phytol.* 127 : 61-68.

Balestrasse K.B., Gallego S.M., Benavides M.P. et Tomaro M.L., 2005 : Polyamines and proline are affected by cadmium stress in nodules and roots of soybean plants. *Plant and Soil* 270 : 343-353.

Barcelo J. et Poschenrieder C., 1990 : Plant water relations as affected by heavy metal stress : a review. *J. Plant Nutr.* 13 : 1-37.

Baryla A., Carrier P., Franck F., Coulomb C., Sahut C. et Havaux M. 2001 : Leaf chlorosis in oilseed rape plants (*Brassica napus*) grown on cadmium-polluted soil : causes and consequences for photosynthesis and growth. *Planta* 212 : 696-709.

Baszynski T., Wajda L., Krol M., Wolinska D., Krupa Z. et Tukendorf A., 1980 : Photosynthetic activities of cadmium-treated tomato plants. *Physiol. Plant.* 48 : 365-370.

Bates L.S., Waldren R.P. et Teare I.D., 1973 : Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant Soil* 39 : 205-207.

Benavides M.P., Gallego S.M., Comba M.E. et Tomaro M.L., 2000 : Relationship between polyamines and paraquat toxicity in sunflower leaf discs. *Plant Growth Regul.* 31 : 215-224.

Benavides M.P., Gallego S.M. et Tomaro M.L., 2005 : Cadmium toxicity in plants. *Braz. J. Plant. Physiol.* 17 : 21-34.

Ben Ghnaya A., Charles G. et Branchard Michel, 2008 : Rapid shoot regeneration from thin cell layer explants excised from petioles and hypocotyls in four cultivars of *Brassica napus*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 92 : 25-30.

Béraud J., Brun A., Féray A., Hourmant A. et Penot M., 1992 : Long-distance transport of <sup>14</sup>C-putrescine in potato plantlets (*Solanum tuberosum* cv. Bintje). *Biochem. Physiol. Pflanzen* 188 : 169-176.

Berlett B.S. et Stadtman E.R., 1997: Protein oxidation in aging, disease and oxidative stress. *Am. Soc. Biochem. Biol. Mol.* 272: 20313-20316.

Bernet E., Claparols I, Dondini L., Santos M.A., Serafini-Fracassini D. et Torné J.M., 1999 : Changes in polyamine content, arginine and ornithine decarboxylases and transglutaminase activities during light/dark phases (of initial differentiation) in maize calluses and their chloroplasts. *Plant Physiol. Biochem.* 37 : 899-909.

Bernier G., Havelange A., Houssa C., Petitjean A. et Lejeune P., 1993 : Physiological signals that induce flowering. *The Plant Cell*, 5 : 1147-1155.

Bertoldi D., Tassoni A., Martinelli L. et Bagni N., 2004 : Polyamines and somatic embryogenesis in two *Vitis vinifera* cultivars. *Physiol. Plant.* 120 : 657-666.

Bertin G., et Averbeck D., 2006 : Cadmium : cellular effects, modifications of biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences (a review). *Biochimie*, 88 : 1549-1559

Biddington N.L., 1992 : The influence of ethylene in plant-tissue culture. *Plant Growth Regul.* 11 : 173-187.

Bolan N.S., Adriano D.C., Duraisamy A., Mani P.A. et Arulmozhiselvan K. 2003a : Immobilization and phytoavailability of cadmium in variable charge soils. I. Effect of phosphate addition. *Plant and Soil* 250 : 83-94.

Bolan N.S., Adriano D.C., Mani P.A. et Duraisamy A., 2003b : Immobilization and phytoavailability of cadmium in variable charge soils. II. Effect of lime addition. *Plant and Soil* 251 : 187-198.

Bolan N.S., Adriano D.C. et Mani P.A., 2003b : Immobilization and phytoavailability of cadmium in variable charge soils. III. Effect of biosolid compost addition. *Plant and Soil* 256 : 231-241.

Bors N., Langebartels C., Michel C. et Sandermann H., 1989 : Polyamines as radical scavengers and protectants against ozone injury. *Phytochemistry* 28 : 1589-1595.

Bouchereau A., Aziz A., Larher F. et Martin-Tanguy J., 1999 : Polyamines and environmental challenges : Recent development. *Plant Sci.* 140 : 103-125.

Briat J.-F. et Lebrun M., 1999 : Plant response to metal toxicity. *C.R. Acad. Sci. Paris, Sciences de la vie* 322 : 43-54.

Brown S.L., Chaney R.L., Angle J.S. et Baker A.J.M., 1994 : Phytoremediation potential of *Thlaspi caerulescens* and bladder champion for zinc- and cadmium-contaminated soils. *J. Environ. Qual.* 23 : 1151-1157.

Burnett L., Arnoldo M., Yarrow S. et Huang B. 1994 : Enhancement of shoot regeneration from cotyledon explants of *Brassica rapa* ssp. *Oleifera* through pre-treatment with auxin and cytokinin and use of ethylene inhibitors. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 37 : 253-256.

Burtin D., Martin-Tanguy J., Paynot M., Carré M. et Rossin N., 1990 : Polyamines, hydroxycinnamoylputrescines and root formation in leaf explants of tobacco cultivated *in vitro*. *Plant Physiol.* 93 : 1398-1404.

### -C-

Cabanne F., Dalebroux M.A., Martin-Tanguy J. et Martin C., 1981 : Hydroxycinnamic acid amides and ripening to flower of *Nicotiana tabacum* var. *Xanthi n.c.* *Physiol. Plant.* 53 : 399-404.

Caffaro S.V. et Vicente C., 1994 : Polyamine implication during soybean flowering induction and early reproductive transition of vegetative buds. *Plant Physiol. Biochem.* 32 : 391-397.

Caille N., Lombi E. et McGrath S.P., 2003 : Phytoextraction of metals : Investigation of hyperaccumulation and field testing. *CL : Aire Annual Project Conference*, March 31<sup>st</sup>.

Cataldo D.A., Garland T.R. et Wildung R.E. 1983 : Cadmium uptake kinetics in intact soybean plants. *Plant Physiol.* 73 : 844-848.

Cerning-Beroard J., 1975 : A note on sugar determination by anthrone method. *Cereal Chem.* 52 : 857-860.

Chaney R.L., Bruins R.J.F., Baker D.E., Korcak R.F., Smith J.E. et Cole D., 1987 : Transfer of sludge applied trace elements to the food chain. *In : Land Application of Sludge-Food*

Chain Implications. Page A.L., Logan T.J., Ryan J.A. (Eds.), Lewis Publishers, Chelsea, MI, pp. 67-99.

Chang C.J. et Kao C.H., 1997 : Paraquat toxicity is reduced by polyamines in rice leaves. *Plant Growth Reg.* 22 : 163-168.

Chaoui A., Jarrar B. et El Ferjani E., 2004 : Effects of cadmium and copper on peroxidase, NADH oxydase and IAA oxidase activities in cell wall, soluble and microsomal membrane fractions of pea roots. *J. Plant Physiol.* 161 : 1225-1234.

Chatterjee J. et Chatterjee C., 2000 : Phytotoxicity of cobalt, chromium and copper in cauliflower. *Environ. Pollut.* 109 : 69-74.

Chaudhry T.M., Hayes W.J., Khan A.G. et Khoo C.S., 1998 : Phytoremediation – Focusing on accumulator plants that remediate metal-contaminated soils. *Austral. J. of Ecotoxicol.*, 4 : 37-51.

Chen H. et Cutright T., 2001 : EDTA and HEDTA effects on Cd, Cr and Ni uptake by *Helianthus annuus*. *Chem.* 45 : 21-28.

Chen Y.X., He Y.F., Luo Y.M., Yu Y.L., Lin Q. et Wong M.H., 2003 : Physiological mechanism of plant roots exposed to cadmium. *Chemosphere* 50 : 789-793.

Chi G.L., Barfield D.G., Sim G.-E. et Pua E.-C., 1990 : Effect of silver nitrate and aminoethoxyvinylglycine on *in vitro* shoot and root organogenesis from seedling explants of recalcitrant *Brassica* genotypes. *Plant Cell Rep.* 9 : 195-198.

Chi G.L., Pua E.C. et Goh C.J., 1991 : Role of ethylene on *de novo* shoot regeneration from cotyledonary explants of *Brassica campestris* ssp. *Pekinensis* (Lour) Olsson *in vitro*. *Plant Physiol.* 96 : 178-183.

Choi Y.E., Harada E., Wada M., Tsuboi H., Morita Y., Kusano T. et Sano H., 2001 : Detoxification of cadmium in tobacco plants : formation and active excretion of crystals containing cadmium and calcium through trichomes. *Planta* 213 : 45-50.

Chugh L.K., 1991 : Effect of cadmium on carbon and nitrogen metabolism of pea (*Pisum sativum* L.). PhD. Thesis, Haryana Agricultural University, Hisar.

Chugh I.K. et Sawhney S.K., 1999 : Effect of cadmium on activities of some enzymes of glycolyse and pentose phosphate pathway in pea. *Biol. Plant.* 42 : 401-407.

Clemens S., 2006 : Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. *Biochimie* 88 : 1707-1719.

Cooper E.M., Sims J.T., Cunningham S.D., Huang J.W. et Berti W.R., 1999 : Chelate-assisted phytoextraction of lead from contaminated soils. *J. Environ. Qual.* 28 : 1709-1719.

Cosio, C., Vollenweider, P., Keller, C., 2005 : Localization and effects of cadmium in leaves of a cadmium-tolerant willow (*Salix viminalis* L.). I. Macrolocalization and phytotoxic effects of cadmium. *Environ. Exp. Bot.* 58. 64-74.



Costa G. et Spitz E., 1997 : Influence of cadmium on soluble carbohydrate, free amino acids, protein content of *in vitro* cultured *Lupinus albus*. *Plant Sci.* 128 : 131-140.

Cowley T. et Walters D.R., 2002 : Polyamine metabolism in barley reacting hypersensitively to the powdery mildew fungus *Blumeria graminis* f. sp. *Hordei*. *Plant Cell Environ.* 25 : 461-468.

Cseh E., 2002 : Metal permeability, transport and efflux in plants. *In* : Physiology and Biochemistry of Metal Toxicity and Tolerance in Plants. Prasad M.N.V. et Strzalka K. (eds). pp 1-36.

#### **-D-**

Das P., Samantaray S. et Rout G.R., 1997 : Studies on cadmium toxicity in plants : A review. *Environ. Pollut.* 98 : 29-36.

Davies K.J.A., 1987 : Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. General aspects. *J. Biol. Chem.* 262 : 9895-9901.

De Agazio M., Giardina M.C. et Grego S., 1988 : Effect of exogenous putrescine, spermidine and spermine on K<sup>+</sup> uptake and H<sup>+</sup> extrusion through plasma membrane in maize root segments. *Plant Physiol.* 87 : 176-178.

De Agazio M., Zacchini M., Federico R. et Grego S., 1995 : Putrescine accumulation in maize roots treated with spermidine : Evidence for spermidine to putrescine conversion. *Plant Sci.* 111 : 181-185.

Del Duca S., Beninati S. et Serafini-Fracassini D., 1995 : Polyamines in chloroplasts : identification of their glutamyl and acetyl derivatives. *Biochem. J.* 305 : 233-237.

Demiral T. et Türkan I., 2005 : Comparative lipid peroxidation, antioxidant defense systems and proline content in roots of two rice cultivars differing in salt tolerance. *Environ. Exp. Bot.* 53 : 247-257.

Desiderio M.A., Tacchini L., Anzon E., Pogliaghi G., Radice L. et Bernelli-Zazzera A., 1996 : Effect of polyamine imbalance on the induction of stress genes in hepatocarcinoma cells exposed to heat shock. *Hepatol.* 24 : 150-156.

Detrez C., Tetu T., Sangwan R.S. et Sangwan- Norreel B.S., 1988 : Direct organogenesis from petiole and thin cell layer explants in sugar beet cultured *in vitro*. *J. Exp. Bot.* 39 : 917-926.

Di Cagno R., Guidi L., Stefani A., et Soldatini G.F., 1999 : Effects of cadmium on growth of *Helianthus annuus* seedlings : physiological aspects. *New Phytol.*, 144 : 65-71.

Dietz K.J., 2005 : Plant thiol enzymes and thiol homeostasis in relation to thiol-dependent redox regulation and oxidative stress. *In* " Antioxidants and reactive oxygen species in plants" N. Smirnoff éd. Blackwell Publishing Ltd. P. 197-214.

DiTomaso J.M., Rost T.L. et Ashton F.M., 1988 : Herbicide-induced diamine accumulation in pea roots. The effect of noproamide on polyamine levels. *Plant Cell Physiol.* 29 : 1367-1372.

Dixit V., Pandey V. et Shyam R., 2001 : Differential oxidative responses to cadmium in roots and leaves of pea (*Pisum sativum* L. cv. Azad). *J. Exp. Bot.*, 52 : 1101-1109.

Do Nascimento C.W.A. et Xing B., 2006 : Phytoextraction : A review on enhanced metal availability and plant accumulation. *Sci. Agric. (Piracicaba, Braz.)* 63 : 299-311.

Downey R.K., 1983 : The origin and description of the *Brassica* oil seed crops. In : High and low erusic acid rape seed oils. Academic Press, Canada (pp 1-20).

Downey R.K., 1990 : *Brassica* oilseed breeding-achievements and opportunities. *Plant Breed.* 60 : 1165-1170.

Drolet G., Dumborff E.B., Legge R.L. et Thompson J.E., 1986 : Radical scavenging properties of polyamines. *Phytochem.* 25 : 367-371.

Dubey R.S. et Singh A.K., 1999 : Salinity induces accumulation of soluble sugars and alters the activity of sugar metabolizing enzymes in rice plants. *Biol. Plant.* 42 : 233-239.

Duhazé C., Gouzerh G., Gagneul D., Larher F. et Bouchereau A., 2002 : The conversion of spermidine to putrescine and 1,3-diaminopropane in the roots of *Limonium tataricum*. *Plant Sci.* 163 : 639-646.

Dushenkov V., Kumar P.B.A.N., Motto H. et Raskin I., 1995 : Rhizofiltration : The use of plants to remove heavy metals from aqueous streams. *Environ. Sci. Technol.* 29 : 1239-1245.

#### **-E-**

Eapen S. et George L., 1997 : Plant regeneration from peduncle segments of oil seed *Brassica* species : Influence of silver nitrate and silver thiosulfate. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 51 : 229-232.

Ebbs S., Lasat M.M., Brady D.J., Cornish J., Gordon R. et Kochian L.V., 1997 : Phytoextraction of cadmium and zinc from a contaminated soil. *J. Environ. Qual.* 26 : 1424-1430.

Egea-Cortines M. et Mizrahi Y., 1991 : Polyamines in cell division. Fruit set and development. In : Biochemistry and Physiology of Polyamines in Plants, Slocum R. D., Flores H. E. (eds), pp. 143-158.

Elmsley J., 2001 : Nature's Building Blocks. A A-Z guide to the elements. Oxford University Press, Oxford, UK.

Epstein A.L., Gussman C.D., Blaylock M.J., Yermiyahu U., Huang J.W., Kapulnik Y. et Orser C.S., 1999 : EDTA and Pb-EDTA accumulation in *Brassica juncea* grown in Pb-amended soil. *Plant Soil* 208 : 87-94.

Eun S.O., Youn H.S., et Lee Y., 2000 : Lead disturbs microtubule organization in the root meristem of *Zea mays*. *Physiol. Plant.* 110 : 357-365.

Evangelou M.W.H., Bauer U., Ebel M. et Schaeffer A., 2007 : The influence of EDDS and EDTA on the uptake of heavy metals of Cd and Cu from soil with tobacco *Nicotiana tabacum*. *Chemosphere* 68 : 345-353.

Evans P.T. et Malmberg R.L., 1989 : Do polyamines have roles in plant development? *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40 : 235-269.

#### **-F-**

Faivre-Rampant O., Kevers C., Dommes J. et Gaspar T., 2000 : The recalcitrance to rooting of the micropropagated shoots of the *rac* tobacco mutant : Implications of polyamines and of the polyamine metabolism. *Plant Physiol. Biochem.*, 38 : 441-448.

FAO (Food Agriculture Organization) 2003 : *FAO bulletin of statistics*, Vol. 4 No 2.

Féray A., Hourmant A., Penot M., Caroff J. et Cann-Moisan C., 1993 : Effect of polyamines on morphogenesis of *in vitro* potato plants (*Solanum tuberosum* cv. Bintje). *C. R. Acad. Sc.*, Paris, 316 : 1446-1451.

Féray A., Hourmant A., Penot M., Caroff J. et Cann-Moisan C., 1994 : Polyamines and morphogenesis – Effects of methylglyoxal-bis (guanylhydrazone). *Bot Acta*, 62 : 422-426.

Ferrat L., Pergent-Martini C. et Roméo M., 2003 : Assessment of the use of biomarkers in aquatic plants for the evaluation of environmental quality : Application to seagrasses. *Aquatic Toxicol.* 65 : 187-204.

Filipic M. et Hei T.K., 2004 : Mutagenicity of cadmium in mammalian cells : implication of oxidative damage. *Mutat Res.* 546 : 81-91.

Flores H.E. et Galston A.W., 1982 : Analysis of polyamines in higher plants by high performance liquid chromatography. *Plant Physiol.* 69 : 701-706.

Flores H., Protaccio C.M. et Signs M.W., 1989 : Primary and secondary metabolism of polyamines in plants. In : *Recent advances in phytochemistry*, Vol. 23, Poulton J.E., Romes J.T. et Conn E.E. (eds). Plenum Press, pp. 239-393.

Flores H.E., 1991 : Changes in polyamine metabolism in response to abiotic stress. In : *Biochemistry and Physiology in plants*, Slocum R.D., Flores H.E. (Eds.). CRC Press, pp. 213-225.

Flores H. et Martin-Tanguy J., 1991 : Polyamines and plant secondary metabolites. In *Biochemistry and Physiology of Polyamines in Plants*, Slocum R.D. et Flores H.E. (Eds), CRC Press pp. 57-76.

Fodor F., 2002 : Physiological responses of vascular plants to heavy metals. In : *Physiology and Biochemistry of Metal Toxicity and Tolerance in Plants*, Prasad M.N.V. et Strzalka K. eds, Kluwer Academic Publishers, Netherlands, pp. 149-177.

Fowler M.R., Kirby M.J., Scott N.W., Slater A. et Elliott M.C., 1996 : Polyamine metabolism and gene regulation during the transition of autonomous beet cells in suspension culture from quiescence to division. *Physiol. Plant.* 98 : 439-446.

Foyer C.H., Lelandais M. et Kunert K.J., 1994 : Photooxidative stress in plants. *Physiol. Plant.* 92 : 696-717.

Friedman R., Levin N. et Altman A., 1986 : Presence and identification of polyamines in xylem and phloem exudates of plants. *Plant Physiol.* 82 : 1154-1157.

Fuller D.J., Gerner E.W. et Russel D.H., 1977 : Polyamine biosynthesis and accumulation during the G<sub>1</sub> to S phase transition. *J. Cell Physiol.* 70 : 1597-1600.

### **-G-**

Gallego S.M., Benavide M.P. et Tomaro M.L., 1996 : Effects of heavy metal ion excess on sunflower leaves : Evidence for involvement of oxidative stress. *Plant Sci.* 121 : 151-159.

Galston A.W. et Kaur-Sawhney R., 1987 : Polyamines as endogenous growth regulators. In : Plant hormones and their role in plant growth and development. Davies P.J. Ed., Martinus Nijhoff publisher. pp. 280-295.

Galston A.W. et Kaur-Sawhney R., 1990 : Polyamines in plant physiology. *Plant Physiol.* 94 : 406-410.

Galston A.W. et Kaur-Sawhney R., 1995 : Polyamines as endogenous growth regulators. In Plant hormones, Davies P.J. (ed), Kluwer Academic Press, pp. 158-178.

Galston A.W., Kaur-Sawhney R., Altabella T. et Tiburcio A.F., 1997 : Plant polyamines in reproductive activity and response to abiotic stress. *Bot. Acta* 110 : 197-207.

Garbisu C. et Alkorta I., 2001 : Phytoextraction : A cost-effective plant-based technology for the removal of metals from the environment. *Biores. Tech.* 77 : 229-236.

Ghosh M. et Singh S.P., 2005 : A review on phytoremediation of heavy metals and utilization of its byproducts. *Appl. Ecol. Environ. Res.* 3 : 1-18.

Gleba D., Borisjuk N.V., Borisjuk L.G., Kneer R., Poulev A., Skarzhinskaya M., Dushenkov S., Logendra S., Gleba Y.Y. et Raskin I., 1999 : Use of plant roots for phytoremediation and molecular farming. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96 : 5973-5977.

Gong J.-M., Lee D.A. et Schroeder J.I., 2003 : Long-distance root-to-shoot transport of phytochelatins and cadmium in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100 : 10118-10123.

Gonzalez De Mejia E., Martínez-Resendiz.V., Castano-Tostado.E. & Loarca-Pica G., 2003: Effect of drought on polyamine metabolism, yield, protein content and in vitro protein digestibility in tepary (*Phaseolus acutifolius*) and common (*Phaseolus vulgaris*) bean seeds. *J. Sci. Food Agricul.* 83: 1022-1030.

Gouia H., Ghorbal M.H. et Meyer C., 2000 : Effects of cadmium on activity of nitrate reductase and on other enzymes of the nitrate assimilation pathway in bean. *Plant Physiol.* 139 : 95-99.

Grimes H.D., Slocum R.D. et Boss W.F., 1986 :  $\alpha$ -Difluoromethylarginine treatment inhibits protoplast fusion in fusogenic wild type carrot protoplasts. *Biochimica Biophysica Acta* 886 : 130-134.

Groppa M.D., Tomaro M.L. et Benavides M.P., 2001 : Polyamines as protectors against cadmium or copper-induced oxidative damage in sunflower leaf discs. *Plant. Sci.* 161 : 481-488.

Groppa M.D., Benavides M.P. et Tomaro M.L., 2003 : Polyamine metabolism in sunflower and wheat leaf discs under cadmium or copper stress. *Plant. Sci.* 164 : 293-299.

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

Groppa M.D., Tomaro M.L. et Benavides M.P., 2007b : Polyamines and heavy metal stress : the antioxidant behavior of spermine in cadmium- and copper-treated wheat leaves. *BioMetals* 20 : 185-195.

Groppa M.D. et Benavides M.P., 2008 : Polyamines and abiotic stress : recent advances. *Amino Acids* 34 : 35-45.

Guerinot M.L., 2000 : The ZIP family of metal transporters. *Biochim. Biophys. Acta* 1465 : 190-198.

Gupta U.C. et Gupta S.C., 1998 : Trace element toxicity relationships to crop production and livestock and human health : Implications for management. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 29 : 1491-1522.

Gussarson M., 1994 : Cadmium-induced alterations in nutrient composition and growth of *Betula pendula* seedlings : The significance of fine roots as a primary target for cadmium toxicity. *J. Plant Nutr.* 17 : 2151-2163.

Gussarson M., Asp H., Adalsteinsson S. et Jensen P. 1996 : Enhancement of cadmium effects on growth and nutrient composition of birch (*Betula pendula*) by buthionine sulphoximine (BSO). *J. Exp. Bot.* 47 : 211-215.

## **-H-**

Ha H.C., Sirisoma N.S., Kuppusamy P., Zweier J.L., Woster P.M. et Casero R.A., 1998 : The natural polyamine spermine functions directly as a free radical scavenger. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 : 11140-11145.

Haag-Kerwer A., Schäfer H.J., Heiss S., Walter C. et Rausch T., 1999 : Cadmium exposure in *Brassica juncea* causes a decline in transpiration rate and leaf expansion without effect on photosynthesis. *J. Exp. Bot.* 50 : 1827-1835.

Hall J.L., 2002 : Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *J. Exp. Bot.* 366 : 1-11.

Halliwell B. et Gutteridge J.M.C., 1999 : Free Radicals in Biology and Medicine. 3<sup>rd</sup> ed. Oxford University Press, New York.

Hanzawa Y., Takahashi T., Michael A.J., Burtin D., Long D., Pineiro M., Coupland G. et Komeda Y., 2000 : ACAULIS5, an *Arabidopsis* gene required for stem elongation, encodes a spermine synthase. *EMBO J.*, 19 : 4248-4256.

Hanzawa Y., Imai T., Michael A.J., Komeda Y. et Takahashi T., 2002 : Characterization of the spermine synthase-related gene family in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* 527 : 176-180.

Hart J.J., Welch R.M., Norvell W.A., Sullivan L.A. et Kochian L.V., 1998 : Characterization of cadmium binding, uptake, and translocation in intact seedlings of bread and durum wheat cultivars. *Plant Physiol.* 116 : 1413-1420 .

Hassan M.J., Zhang G., Wu F., Wei K., et Chen Z., 2005 : Zinc alleviates growth inhibition and oxidative stress caused by cadmium. *J. Plant Nutr. Soil Sci.*, 168 : 255-261.

Havelange A., Lejeune P., Bernier G., Kaur-Sawhney R. et Galston A.W., 1996 : Putrescine export from leaves in relation to floral transition in *Sinapis alba*. *Physiol. Plant.* 96 : 59-65.

Heby O., 1980 : Role of polyamines in the control of cell proliferation and differentiation. *Differentiation* 19 : 1-20.

Henry J.R., 2000 : In An Overview of phytoremediation of lead and mercury. NNEMS Report, Washington, D.C. ; pp. 3-9.

Hew K.W., Ericson W.A. et Welsh M.J., 1993 : A single low cadmium dose causes failure of spermiation in the rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 121 : 15-21.

Hoagland D.R. et Arnon D.I., 1950 : The water-culture for growing plants without soil. *Cal. Agric. Exp. Sta Cir.* 347 : 1-32.

Hsu Y.T. et Kao C.H., 2003 : Changes in protein and amino acid contents in two cultivars of rice seedlings with different apparent tolerance to cadmium. *Plant Growth Regul.* 40 : 147-155.

Hsu Y.T. et Kao C.H., 2007 : Cadmium-induced oxidative damage in rice leaves is reduced by polyamines. *Plant Soil* 291 : 27-37.

Huaipan L., Xiu J, Bingjun Y et Youliang L., 2006 : Relationship between osmotic stress and polyamines conjugated to the deoxyribonucleic acid-protein in wheat seedling roots. *Sci in China : Series C Life Sci.* 49 : 12-17.

Huang J.W., Chen J.J., Berti W.R. et Cunningham S.D., 1997 : Phytoremediation of lead-contaminated soils : Role of synthetic chelates in lead phytoextraction. *Environ. Sci. Technol.* 31 : 800-805.

Hubert M., Pelletier J.G., Torossian K., Dionne P., Gamache I., Charest-Gaudreault R., Audette M. et Poulin R., 1996 : 2,2'-Dithiobis(N-ethyl-spermine-5,5-carboamide) is a high affinity, membrane-impermeant antagonist of the mammalian polyamine transport system. *J. Biol. Chem.* 271 : 27556-27563.

#### **-I-**

Igarashi K. et Kashiwagi K., 2000 : Polyamines : Mysterious modulators of cellular functions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 271 : 559-564.

Inouhe M., Ninomiya S., Tohyama H., Joho M. et Murayama T., 1994 : Different characteristics of roots in the cadmium-tolerance and Cd-binding complex formation between mono- and dicotyledonous plants. *J. Plant Res.* 107 : 201-207.

Iturbe-Ormaetxe I., Escuredo P.R., Arrese-Igor C. et Becana M., 1998 : Oxidative damage in pea plants exposed to water deficit or paraquat. *Plant Physiol.* 116 : 173-181.

#### **-J-**

Järup L., Berglund M., Elinder C.G., Nordberg G. et Vahter M., 1998 : Health effects of cadmium exposure - a review of the literature and a risk estimate. *Scand. J. Work Environ. Health* 24 : 1-52.

Jha A.B. et Dubey R.S., 2004 : Carbohydrate metabolism in growing rice seedlings under arsenic toxicity. *Plant Physiol.* 123 : 1029-1036.

Jones M.A. et Smirnoff N., 2005 : Reactive oxygen species in plant development and plant defence. *In* : Antioxidants and reactive oxygen species in plants. N. Smirnoff Ed. Blackwell Publishing Ltd. Pp. 197-214.

Joseph P., Muchnok T.K., Klishis M.L., Roberts J.R., Antonini J.M., Whong W.Z. et Ong T., 2001 : Cadmium-induced cell transformation and tumorigenesis are associated with transcriptional activation of c-fos, c-jun, and c-myc proto-oncogenes : role of cellular calcium and reactive oxygen species. *Toxicol. Sci.* 61 : 295-303.

Juste C., Chassin P., Gomez A., Linères M. et Mocquot B., 1995 : Les micro-polluants métalliques dans les boues résiduelles des stations d'épuration urbaines. Convention Ademe / I.N.R.A. (contrat INRA n° 22/92.039-contrat Ademe n° 2750007).

#### **-K-**

Kakkar R.K., Nagar P.K., Ahuja P.S. et Rai V.K., 2000 : Polyamines and plant morphogenesis. *Biol. Plant.* 43 : 1-11.

Kapneck S., 1983 : Polyamines and cinnamoylputrescines in normal and sulphur-starved suspension cultures of *Nicotiana tabacum*. *Z. Pflanzenphysiol.* 112 : 275-279.

Kastori R., Petrovic M. et Petrovic N., 1992 : Effect of excess lead, cadmium, copper and zinc on water relations in sunflower. *J. Plant Nutr.*, 15 : 2427-2439.

Kavi Kishor P.B., Sangam S., Amruth R.N., Sri Laxmi P., Naidu K.R., Rao K.R.S.S., Sreenath Rao, Reddy K.J., Theriappan P. et Sreenivasulu N., 2005 : Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants : its implications in plant growth and abiotic stress tolerance. *Current Science* 88 : 424-438.

Kazantzis G., 2004 : Cadmium, osteoporosis and calcium metabolism. *BioMetals* 17 : 493-498.

Keller C., 2006 : Factors limiting efficiency of phytoextraction at multi-metal contaminated sites. *In* : Phytoremediation of Metal-Contaminated Soils, Morel J.-L., Echevarria G. et Goncharova N. (eds.), Book series : Nato Science series : IV : Earth and Environment Sciences, pp. 241-266, Springer, The Netherlands.

Kirkham M.B., 2006 : Cadmium in plants on polluted soils : Effects of soil factors, hyperaccumulation, and amendments. *Geoderma* 137 : 19-32.

Klimaszewska K. et Keller W.A., 1985 : High frequency plant regeneration from thin layer explants of *Brassica napus*. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 4 : 183-197.

Klobus G., Burzynski M. et Buczek J., 2002 : Heavy metals and nitrogen metabolism. *In* : Physiology and Biochemistry of Metal Toxicity and Tolerance in Plants, Prasad M.N.V. et Strzalka K. eds, Kluwer Academic Publishers, Netherlands, pp –355.

Kobayashi E., Okubo Y., Suwazono Y., Kido T. et Nogawa K., 2002 : Dose-response relationship between total cadmium intake calculated from the cadmium concentration in rice collected from each household of farmers and renal dysfunction in inhabitants of the Jinzu River Basin, Japan. *J. Appl. Toxicol.* 22 : 431-436.

Koller E., 2004 : Traitement des pollutions industrielles, Ed Dunod, Paris, , pp 424.

Konieczny R., Libik M., Tuleja M., Niewiadomska E. et Miszalski Z., 2008 : Oxidative events during *in vitro* regeneration of sunflower. *Acta Physiol. Plant.*, 30 : 71-79.

Königshofer H. et Lechner S., 2002 : Are polyamines involved in the synthesis of heat-shock proteins in cell suspension cultures of tobacco and alfalfa in response to high-temperature stress? *Plant Physiol. Biochem.* 40 : 51-59.

Kotzabasis K., Fotinou C., Roubelakis-Angelakis K.A. & Ghanotakis D., 1993: Polyamines in the photosynthetic apparatus. Photosystem II highly resolved subcomplexes are enriched in spermine. *Photosynth. Res.* 38: 83-88.

Krämer U. et Chardonnens A.N., 2001 : The use of transgenic plants in the bioremediation of soils contaminated with trace element. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 55 : 661-672.

Krämer U., 2005 : Phytoremediation : Novel approaches to cleaning up polluted soils. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2 : 133-141.

Krupa Z. et Baszynski T., 1995 : Some aspects of heavy metal toxicity towards photosynthetic apparatus – direct and indirect effects on light and dark reactions. *Acta Physiol. Plant.*, 17 : 177-190.



Krupa Z., Siedlecka A., Skorzynska-Polit E. et Maksymiec W. 2002 : Heavy metal interactions with plant nutrients. *In* : Physiology and Biochemistry of Metal Toxicity and Tolerance in Plants, Prasad M.N.V. et Strzalka K. eds, Kluwer Academic Publishers, Netherlands, pp. 287-301.

Kuldeep S. et Brar J.S., 2002 : Genotypic differences in effects of cadmium on yield and nutrient composition in *Brassica* plants. Symposium No 42, paper No 218, presentation : Poster, 17<sup>th</sup> WCSS, 14-21.

Kümar P.B.A.N., Dushenkov V., Motto H. et Raskin I., 1995 : Phytoextraction : The use of plants to remove heavy metals from soils. *Environ. Sci. Technol.* 29 : 1232-1238.

Kumar A., Altabella T., Taylor M.A. et Tiburcio A.F., 1997 : Recent advances in polyamine research. *Trends Plant Sci.* 2 : 124-130.

Kusano T., Yamaguchi K., Berberich T. et Takahashi Y., 2007 : Advances in polyamine research in 2007. *J. Plant Res.* 120 : 345-350.

Kusano T., Berberich T., Tateda C. et Takahashi Y., 2008 : Polyamines : essential factors for growth and survival. *Planta* 228 : 367-381.

Kuthanova A., Gemperlova L., Zelenkova S., Eder J., Machackova I., Opatrny Z. et Cuikrova M., 2004 : Cytological changes and alterations in polyamine contents induced by cadmium in tobacco BY-2 cells. *Plant Physiol. Biochem.* 42 : 149-156.

**-L-**

Lagadic L., Caquet T., Amiard J.-C. et Ramade F., 1997 : Mécanismes de formation et effets des espèces réactives de l'oxygène. *In* : Biomarqueurs en écotoxicologie : Aspects fondamentaux, pp. 125-147.

Lagriffoul A., Mocquot B., Mench M. et Vangronsveld J., 1998 : Cadmium toxicity effects on growth, mineral and chlorophyll contents, and activities of stress related enzymes in young maize plants (*Zea mays* L.). *Plant Soil* 200 : 241-250.

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

Lasat M.M., 2002 : Phytoextraction of toxic metals : A review of biological mechanisms. *J. Environ. Qual.* 31 : 109-120.

Legaz M.E., De Armas R., Pinon D., et Vicente C., 1998 : Relationships between phenolics-conjugated polyamines and sensitivity of sugarcane to smut (*Ustilago scitaminea*). *J. Exp. Bot.*, 49 : 1723-1728.

Le Guen-Le Saos F. et Hourmant A. 2001 : Stimulation of putrescine biosynthesis via the ornithine decarboxylase pathway by gibberellic acid in the *in vitro* rooting of globe artichoke (*Cynara scolymus*). *Plant Growth Regulation* 35 : 277-284.

Lee T.M., 1997 : Polyamine regulation of growth and chilling tolerance of rice (*Oryza sativa* L.) roots cultured *in vitro*. *Plant Sci.* 122 : 111-117.

Legocka J. et Zajchert I., 1999 : Role of spermidine in the stabilization of the apoprotein of the light-harvesting chlorophyll a/b-protein complex of photosystem II during leaf senescence process. *Acta Physiol. Plant.* 21 : 127-132.

Léguillon S. Charles G. et Branchard M., 2003 : Plant regeneration from thin cell layers in *Spinacia oleracea*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 74 : 257-265.

Lei Y.B., Korpelainen H., Li C.Y., 2007 : Physiological and biochemical responses to high Mn concentrations in two contrasting *Populus cathayana* populations. *Chemosphere* 68 : 686-694.

Leita L., De Nobili M. Cesco S. et Mondini C., 1996 : Analysis of intercellular cadmium forms in roots and leaves of bush bean. *J. Plant Nutr.* 19 : 527-533.

Lesage E., Meers E., Vervaeke P., Lamsal S., Hopgood M.J., Tack F.M.G. et Verloo M., 2005 : Enhanced phytoextraction : II. Effect of EDTA and citric acid on heavy metal uptake by *Helianthus annuus* from a calcareous soil. *Int. J. Phytorem.* 7 : 143-152.

Lesko K. et Simon- Sarkadi L., 2002 : Effect of cadmium stress on amino acids and polyamines content of wheat seedlings. *Period. Polutech. Ser. Chem. Eng.* 46 : 65-71.

Lestan D., 2006 : Enhanced heavy metal phytoextraction. *In* : Phytoremediation Rhizoremediation, Mackova M., Dowling D. et Macek T. (eds.), , pp. 115-132, Springer, The Netherlands.

Lichtenthaler H.K., 1987 : Chlorophylls and carotenoids : Pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology* 148 : 351-382.

Lindberg S. et Greger M., 2002 : Plant genotypic differences under metal deficient and enriched conditions. *In* : Physiology and Biochemistry of Metal Toxicity and Tolerance in Plants, Prasad M.N.V. et Strzalka K. eds, Kluwer Academic Publishers, Netherlands. pp 357-393.

Liu K., Fu H., Bei Q. et Luan S., 2000 : Inward potassium channel in guard cells as a target for polyamine regulation of stomatal movements. *Plant Physiol.*, 124 : 1315-1325.

Liu D., Jiang W., et Liu D., Jiang W. et Gao X., 2003/4 : Effects of cadmium on root growth, cell division and nucleoli in root tip cells of garlic. *Biol. Plant.* 47 : 79-83.

Liu J.-H., Nada K., Honda C., Kitashiba H., Wen X.-P., Pang X.-M. et Moriguchi T., 2006 : Polyamine biosynthesis of apple callus under salt stress : importance of the arginine decarboxylase pathway in stress response. *J. Exp. Bot.* 57 : 2589-2599.

Lombi E., Zhao F.J., Dunham S.J. et McGrath S.P., 2001 : Phytoremediation of heavy-metal contaminated soils : Natural hyperaccumulation versus chemically enhanced phytoextraction. *J. Environ. Qual.* 30 : 1919-1926.

Lovaas E., 1997 : Antioxidant and metal-chelating effects of polyamines. *Adv. Pharmacol.* 38: 119-149.

Lunackova L., Sottnikova A., Masarovicova E., Lux A. et Stresko V., 2003/4 : Comparison of cadmium effect on willow and poplar in response to different cultivation conditions. *Biol. Plant.* 47 : 403-411.

#### **-M-**

MacAdam J.W., Nelson C.J. et Sharpe R.E., 1992 : Peroxidase activity in the leaf elongation zone of tall fescue. *Plant Physiol.* 99 : 872-878

Maiale S., Sanchez D.H., Guirado A., Vidal A. et Ruiz O.A., 2004 : Spermine accumulation under salt stress. *J. Plant Physiol.* 161 : 35-42.

Mallick N. et Rai L.C., 2002 : Physiological responses of non-vascular plants to heavy metals. *In : Physiology and Biochemistry of Metal Toxicity and Tolerance in Plants*, Prasad M.N.V. et Strzalka K. (eds), Kluwer Academic Publishers, Netherlands, pp. 111-147.

Marschner H., 1995 : Mineral nutrition of higher plants. Academic Press, London.

Marseille F., Tiffreau C., Laboudigue A. et Lecomte P., 2000 : Impact of vegetation on the mobility and bioavailability of trace elements in a dredged sediment deposit : a greenhouse study. *Agronomie* 20 : 547-556.

Martin C. et Martin-Tanguy J., 1981 : Polyamines conjuguées et limitation de l'expansion virale chez les végétaux. *CR Acad. Sci. Ser. D* 293 : 249-251.

Martin-Tanguy J., Martin C., Gallet M. et Vernoy R., 1976 : Sur de puissants inhibiteurs naturels de multiplication du virus de la mosaïque du tabac. *C. R. Acad. Sci.*, Paris, 282 : 2231-2234.

Martin-Tanguy J., 1985 : The occurrence and possible function of hydroxycinnamoyl acid amides in plants. *Plant Growth Regulation* 3 : 381-399.

Martin-Tanguy J., 1997 : Conjugated polyamines and reproductive development, biochemical, molecular and physiological approaches. *Physiol. Plant.* 100 : 675-688.

Martin-Tanguy J., 1996 : Flowering, polyamines and reproductive development : biochemical, molecular and physiological approaches. *Physiol. Plant.*, 100 : 675-688.

Martin-Tanguy J., 2001 : Metabolism and function of polyamines in plants : recent development (new approaches). *Plant Growth Regul.* 34 : 135-148.

Matysik J., Alia, Bhalu B. et Mohanty P., 2002 : Molecular mechanisms of quenching of reactive oxygen species by proline under stress in plants. *Current science* 82 : 525-532.

McGrath S.P., Zhao F.J. et Lombi E., 2002 : Advances in phytoremediation of metals, metalloids and radionuclides. *Adv. Agron.* 75 : 1-56.

McGrath S.P. et Zhao F.J., 2003 : Phytoextraction of metals and metalloids from contaminated soils. *Curr. Opin. Biotechnol.* 14 : 277-282.

McLaughlin M.J., Parker D.R., et Clarke J.M., 1999 : Metals and micronutrients – food safety issues. *Field crops Res.*, 60 : 143-163.

Meers E. et Tack F., 2004 : The potential of foliar treatments for enhanced phytoextraction of heavy metals from contaminated soil. *Remed. J.* 14 : 111-123.

Minotti G. et Aust S.D., 1987 : The requirement for iron (III) in the initiation of lipid peroxidation by iron (II) and hydrogen peroxide. *J. Biol. Chem.* 262 : 1098-1104.

Mishra S., Srivastava S., Tripathi R.D., Govindarajan R., Kuriakose S.V. et Prasad M.N.V., 2006 : Phytochelatin synthesis and response of antioxidants during cadmium stress in *Bacopa monnieri* L. *Plant Physiol. Biochem.* 44 : 25-37.

Moral R., Palacios G., Gomez I. Navarro-Pedro J., et Mataix J. 1994 : Distribution and accumulation of heavy metals (Cd, Ni and Cr) in tomato plant. *Freesenius Environ. Bull.* 3 : 395-399.

Moya J.L., Ros R. et Picazo I., 1993 : Influence of cadmium and nickel on growth, net photosynthesis and carbohydrate distribution in rice plants. *Photosynth. Res.* 36 : 75-80.

Mulin M. et Bellio-Spataru A., 2000 : Organogenesis from hypocotyles thin cell layers of *Lupinus mutabilis* and *Lupinus albus*. *Plant Growth Reg.* 30 : 177-183.

Murashige T. et Skoog F., 1962 : A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15 : 473-497.

Mysliwa-Kurdziel B. et Strzalka K., 2002 : Influence of metals on biosynthesis of photosynthetic pigments. *In* : Physiology and Biochemistry of Metal Toxicity and Tolerance in Plants, Prasad M.N.V. et Strzalka K. (eds), Kluwer Academic Publishers, Netherlands, pp. 201-227.

Mysliwa-Kurdziel B., Prasad M.N.V. et Strzalka K. 2002 : Heavy metal influence on the light phase of photosynthesis. *In* : Physiology and Biochemistry of Metal Toxicity and Tolerance in Plants, Prasad M.N.V. et Strzalka K. (eds), Kluwer Academic Publishers, Netherlands, pp. 229-255.

**-N-**

Navakoudis E., Lutz C., Langebartels C., Lutz-Meindl U. et Kotzabasis K., 2003 : Ozone impact on the photosynthetic apparatus and the protective role of polyamines. *Biochim. Biophys. Acta* 1621 : 160-169.

Nayyar H. et Chander S., 2004 : Protective effects of polyamines against oxidative stress induced by water and cold stress in chickpea. *J. Agron. Crop. Sci.* 190 : 355-365.

Nhut D.T., Bui V.L. et Tran Thanh Van K., 2000 : Somatic embryogenesis and direct shoot regeneration of rice (*Oryza sativa* L.) using thin cell layer culture of apical meristematic tissue. *J. Plant Physiol.* 157 : 559-565.

Nhut D.T., Bui V.L., Fukai S., Tanaka M. et Tran Thanh Van K., 2001 : Effects of activated charcoal, explant size, explant position and sucrose concentration on plant and shoot regeneration of *Lilium longiflorum* via young stem culture. *Plant Growth Regul.* 33 : 59-65.

Nhut D.T., Huong N.D.T., Bui V.L., Texeira da Silva J.A., Fukai S. et Tanaka M., : The change in shoot regeneration potentiel of protocorm-like bodies derived from *Lilium longiflorum* young stem explant exposed to medium, volume, pH, light intensity and sucrose, concentration pretreatment. *J. Horticult. Sc. Biotech.* 77 : 79-82.

Nhut D.T., Teixeira da Silva J.A., Le B.V. et Tran Thanh Van K., 2003 : Thin cell layer studies of vegetable, leguminous and medicinal plants. Chapter 10. *In* : Thin cell layer culture system : regeneration and transformation application. Nhut D.T., Le B.V., Tran Thanh Van K., Thorpe T. (eds), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 387-426.

Nieboer E. et Richardson D.H.S., 1980 : The replacement of the nondescript term « heavy metal » by a biologically and chemically significant classification of metal ions. *Environ. Pollut.* 1 : 3-26.

Noctor G. et Foyer C., 1998 : Ascorbate and glutathione : Keeping active oxygen under control. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49 : 249-279.

Nomiyama K. et Nomiyama H., 1998 : Cadmium-induced renal dysfunction : New mechanism, treatment and prevention. *J. Trace Elem. Exp. Med.* 11 : 275-288.

Nomiyama K. et Nomiyama H., 2000 : Cadmium-induced elevation of blood pressure. *J. Trace Elem. Exp. Med.* 13 : 155-163.

Nordberg G., et the ChinaCad Group, 2003 : Cadmium and human health : a perspective based on recent studies in China. *The Journal of Trace Elements in Experimental Medicine* 16 : 307-319.

Nriagu J.O., 1990 : Global metal pollution ; poisoning the biosphere. *Environment* 32 : 7-32.

#### **-O-**

Olmos E., Martinez-Solano J.R., Piqueras A. et Hellin E., 2003 : Early steps in the oxidative burst induced by cadmium in cultured tobacco cells (BY-2 line). *J. Exp. Bot.* 54 : 291-301.

#### **-P-**

Padmaja K., Prasad D.D.K. et Prasad A.R.K., 1990 : Inhibition of chlorophyll synthesis in *Phaseolus vulgaris* L. seedlings by cadmium acetate. *Phytosynthetica* 24 : 399-405.

Pahlsson A.M.B., 1989 : Toxicity of heavy metals (Zn, Cu, Cd, Pb) to vascular plants : A literature review. *Water Air Soil Pollut.* 47 : 287-319.

- Palavan-Ünsal N., 1995 : Stress and polyamine metabolism. *Bulg. J. Plant Physiol.*, 21 : 3-14.
- Pal M., Szalai G., Horvath E., Janda T. et Paldi E. 2002 : Effect of salicylic acid during heavy metal stress. *Acta Biol. Szeg.* 46 : 119-120.
- Pal M., Horvath E., Janda T., Paldi E. et Szalai G. 2006 : Physiological changes and defence mechanisms induced by cadmium stress in maize. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 169 : 239-246.
- Pandey S., Ranade S.A., Nagar P.K. et Kumar N., 2000 : Role of polyamines and ethylene as modulators of plant senescence. *J. Biosci.* 25 : 291-299.
- Pardha Saradhi P., Alia-Arora S. et Prasad K.V.S.K., 1995 : Proline accumulate in plants exposed to UV radiation and protects them against UV induced peroxidation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 209 : 1-5.
- Parizek J., 1960 : Sterilization of the male by cadmium salts. *J. Reprod. Fertil.* 1 : 294-309.
- Patel M.J., Patel J.N. et Subramanian R.B., 2005 : Effect of cadmium on growth and the activity of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> scavenging enzymes in *Colocassia esculentum*. *Plant and soil* 273 : 183-188.
- Patra et al, 2004 page 1
- Pegg A.E., 1986 : Recent advances in the biochemistry of polyamines in eukaryotes. *Biochem. J.* 234 : 249-262.
- Pena L.B., Pasquini L.A., Tomaro M.L. et Gallego S.M., 2006 : Proteolytic system in sunflower (*Helianthus annuus* L.) leaves under cadmium stress. *Plant Sci.* 171 : 531-537.
- Pilon-Smits E., 2005 : Phytoremediation. *Ann. Rev. Plant Biol.*, 56 : 15-39.
- Pirintsos S., Kotzabasis K. et Loppi S., 2004 : Polyamine production in lichens under metal pollution stress. *J. Atm. Chem.* 49 : 303-315.
- Poschenrieder C., Gunsé B. et Barcelo J., 1989 : Influence of cadmium on water relations, stomatal resistance and abscisic acid content in expanding bean leaves. *Plant Physiol.* 90 : 1365-1371.
- Prasad M.N.V., 1995 : Cadmium toxicity and tolerance in vascular plants. *Environ. Exp. Bot.* 35 : 525-545.
- Pua E.-C. & Chi G.-L., 1993: *De novo* shoot morphogenesis and plant growth of mustard (*Brassica juncea*) *in vitro* in relation to ethylene. *Physiol. Plant.* 88: 467-474.
- Pua E.C., 1999 : Role of ethylene and polyamines. In : Morphogenesis in cell and tissue cultures. Soh W.Y. and Bhojwani S.S. (eds), Kluwer Academic publishers Dordrecht / Boston / London, pp 255-302.
- Punz W.F. et Sieghardt H. 1993 : The response of roots of herbaceous plant species to heavy metals. *Environ. Exp. Bot.* 33 : 85-98.

**-Q-**

Quartacci M.F., Argilla A., Baker A.J.M. et Navari-Izzo F., 2006 : Phytoextraction of metals from a multiply contaminated soil by Indian mustard. *Chem.* 63 : 918-925.

**-R-**

Racz I., Kovacs M., Lasztity D., Veisz O., Szalai G. et Paldi E., 1996 : Effects of short-term and long-term low temperature stress on polyamine biosynthesis in wheat genotypes with varying degrees of frost tolerance. *J. Plant Physiol.* 148 : 368-373.

Raskin I., Kumar P.B.A.N., Dushenkov S., et Salt D.E., 1994 : Bioconcentration of heavy metals by plants. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 5 : 285-90.

Reese R.N. et Roberts L.W., 1985 : Effects of cadmium on whole cell and mitochondrial respiration in tobacco cell suspension cultures (*Nicotiana tabacum* L. var. Xanthi). *J. Plant Physiol.* 120 : 123-130.

Reeves R.D. et Baker A.J.M., 2000 : Metal-accumulating plants. *In* : Phytoremediation of toxic metals-using plants to clean up the environment. Raskin I., Ensley, B.D. (Eds.), John Wiley et Sons, New York, pp. 193-229.

Reggiani R., Guissani P. et Bertant A., 1990 : Relationship between the accumulation of putrescine and the tolerance to oxygen-deficient stress in Gramineae seedlings. *Plant Cell Physiol.* 31 : 489-494.

Rhee H.J., Kim E.-J. et Lee J.K., 2007 : Physiological polyamines : Simple primordial stress molecules. *J. Cell. Mol. Med.* 11 : 685-703.

Reid M.S., 1987: Ethylene in plant growth, development and senescence. *In*: Plant Hormones and Their Role in Plant Growth and Development. P.J. Davies (Ed), Martinus Nijhoff Publ. Dordrecht, The Netherlands. ISBN90-247-3498-3, pp. 257-279.

Roberts D.R., Dumbroff E.B. et Thompson J.E., 1986 : Exogenous polyamines alter membrane fluidity in bean leaves- a basis for potential misinterpretation of their true physiological role. *Planta* 167 : 395-401.

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

Romero-Puertas M.C., Rodriguez-Serrano M., Corpas F.J., Gomez M., Del Rio L.A. et Sandalio L.M., 2004 : Cadmium induced subcellular accumulation of O<sup>2-</sup> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in pea leaves. *Plant Cell Environ.* 27 : 1122-1134.

Rout G.R., Samantaray S. et Das P., 1999 : *In vitro* selection and biochemical characterization of zinc and manganese adapted callus lines in *Brassica* spp. *Plant Sci.* 137 : 89-100.

**-S-**

Sakata K., Kashiwagi K. et Igarashi K., 2000 : Properties of a polyamine transporter regulated by antizyme. *Biochem. J.* 347 : 297-303.

Salt D.E., Blaylock M., Kumar N., Dushenkov V., Ensley B.D., Chet I. et Raskin I., 1995a: Phytoremediation : A novel strategy for removal of toxic metals from the environment using plants. *Biotech.* 13 : 468-474.

Salt D.E., Prince R.C., Pickering I.J. et Raskin I., 1995b : Mechanisms of cadmium mobility and accumulation in Indian mustard. *Plant Physiol.*, 109 : 1427-1433.

Salt D.E., Smith R.D. et Raskin I., 1998 : Phytoremediation. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49 : 643-668.

Salt D.E. et Krämer U., 2000 : Mechanisms of metal hyperaccumulation in plants. *In* : Raskin I., Ensley B.D. (Eds.), *Phytoremediation of Toxic Metals : Using plants to Clean up the Environment*. John Wiley, New York, pp. 231-246.

Samarakoon A.B. et Rauser W.E., 1979 : Carbohydrate levels and phosphoassimilate export from leaves of *Phaseolus vulgaris* exposed to excess cobalt, nickel and zinc. *Plant Physiol.* 63 : 1165-1169.

Sandalio L.M., Dalurzo H.C., Gomez M., Romero-Puertas M.C. et Del Rio L.A., 2001 : Cadmium induces changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. *J. Exp. Bot.* 52 : 2115-2126.

Sanita Di Toppi L. et Gabbrielli R., 1999 : Response to cadmium in higher plants. *Environ Exp. Bot.* 41 : 105-130.

Sauvé S., Norvell W.A., McBride M. et Hendershot W., 2000 : Speciation and complexation of cadmium in extracted soil solutions. *Environ. Sci. Technol.* 34 : 291-296.

Schat H., Sharma S.S. et Vooijs R., 1997 : Heavy metal induced accumulation of free proline in a metal tolerant and a non tolerant ecotype of *Silene vulgaris*. *Physiol. Plant.* 101 : 477-482.

Schützenbüdel A. et Polle A., 2002 : Plant responses to abiotic stresses : heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *J. Exp. Bot.* 53 : 1351-1365.

Schwartz C., Echevarria G. et Morel J.L., 2003 : Phytoextraction of cadmium with *Thlaspi caerulescens*. *Plant Soil* 249 : 27-35.

Seiler N., Delcros J.G. et Moulinoux J.P., 1996 : Polyamine transport in mammalian cells. An update. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 28 : 843-861.

Semane B., Cuypers A., Smeets K., Van Belleghem F., Horemans N., Schat H. et Vangronsveld J., 2007 : Cadmium responses in *Arabidopsis thaliana* : glutathione metabolism and antioxidative defence system. *Physiol. Plant.* 129 : 519-528.



Serafini-Fracassini D, Bagni N., Cionini P.G. et Bennici A., 1980 : Polyamines and nucleic acids during the first cell cycle of *Helianthus tuberosus* tissue after the dormancy break. *Planta* 148 332-337.

Sfichi L., Ioannidis N. et Kotzabasis K. 2004 : Thylakoid-associated polyamines adjust the UV-B sensitivity of the photosynthetic apparatus by means of light-harvesting complex II changes. *Photochem. Photobiol.* 80 : 499-506.

Shah K. et Dubey R.S., 1998a : Effect of cadmium on proline accumulation and ribonuclease activity in rice seedlings : role of proline as a possible enzyme protectant. *Biol. Plant.* 40 : 121-130.

Shah K. et Dubey R.S., 1998 b : Cadmium elevates level of protein, amino acids and alters activity of proteolytic enzymes in germinating rice seeds. *Acta Physiol. Plant.* 20 : 189-196.

Shah K., Kumar R.G., Verma S. et Dubey R.S., 2001 : Effect of cadmium on lipid peroxidation, superoxide anion generation and activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. *Plant Sci.* 161 : 1135-1144.

Sharma S.S. et Dietz K.J., 2006 : The significance of amino acids and amino-derived molecules in plant responses and adaptation to heavy metal stress. *J. Exp. Bot.* 57 : 711-726.

Sharmila P. et Pardha Saradhi P., 2002 : Proline accumulation in heavy metal stressed plants : An adaptative strategy. *In : Physiology and Biochemistry of Metal Toxicity and Tolerance in Plants.* Prasad M.N.V. et Strzalka K. (Eds), pp. 179-199.

Shen H.J., Xie Y. et Li R., 1994 : Effects of acid stress on polyamine levels, ions efflux, protective enzymes and macromolecular synthesis in cereal leaves. *Plant Growth Regul.* 14 : 1-5.

Shen W., Nada K. et Tachibana S., 2000 : Involvement of polyamines in the chilling tolerance of cucumber cultivars. *Plant Physiol.* 124 : 431-439.

Siedlecka A., Krupa Z., Samuelsson G., Öquist G. et Gardeström P., 1997 : Primary carbon metabolism in *Phaseolus vulgaris* plants under Cd/Fe interaction. *Plant Physiol. Biochem.* 35 : 951-957.

Siedlecka A. et Krupa Z., 2002 : Functions of enzymes in heavy metal treated plants. *In : Physiology and Biochemistry of Metal Toxicity and Tolerance in Plants.* Prasad M.N.V. et Strzalka K. (Eds), Kluwer Academic Publishers, Netherlands, pp. 303-324.

Singh P.K. et Tewari R.K., 2003 : Cadmium toxicity induced changes in plant water relations and oxidative metabolism of *Brassica juncea* L. plants. *J. Environ. Biol.* 24 : 107-112.

Slocum R.D. et Galston A.W., 1985 : Changes in polyamine biosynthesis associated with post fertilization growth and development in tobacco ovary tissues. *Plant Physiol.* 79 : 336-343.

Smeets K., Cuypers A., Lambrechts A., Semane B., Hoet P., Van Laere A. et Vangronsveld J., 2005 : Induction of oxidative stress and antioxidative mechanisms in *Phaseolus vulgaris* after Cd application. *Plant Physiol. Biochem.* 43 : 437-444.

Smirnoff N. et Cumbes O.J., 1989 : Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochem.* 28 : 1057-1060.

Smith T.A., 1980 : Plant amines. In : Secondary plant products. Bell I.A., Charlwood B.V. (Eds). Springer- Verlag, Berlin *Encycl. Plant Physiol.* New Ser. 8 : 433-460.

Smith T.A., 1984 : Putrescine and inorganic ions. *Recent Adv. Phytochem.* 18 : 7-54.

Smith T.A., 1985 : Polyamines. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 36 : 117-143.

Smith J., Burrit D. et Bannister P., 2001 : Ultraviolet-B radiation leads to a reduction in free polyamines in *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Growth Regul.* 35 : 289-294.

Smits E.A.H.P. et Freeman J.L., 2006 : Environmental cleanup using plants : Biotechnological advances and ecological considerations. *Front. Eco. Environ.* 4 : 203-210.

Srivastava S., Tripathi R.D. et Dwivedi U.N., 2004 : Synthesis of phytochelatins and modulation of antioxidants in response to cadmium stress in *Cuscuta reflexa* – an angiospermic parasite. *J. Plant Physiol.* 161 : 665-675.

Stobart A.K., Griffiths W.T., Ameen-Bukhari I. et Sherwood R.P., 1985 : The effect of Cd<sup>2+</sup> on the biosynthesis of chlorophyll in leaves of barley. *Physiol. Plant.* 63 : 293-298.

Sun L.Y., Monneuse M.O., Martin-Tanguy J. et Tepfer D., 1991 : Changes in flowering and the accumulation of polyamines and hydroxycinnamic acid-polyamine conjugates in tobacco plants transformed by the *rol-A* locus from the Ri TL-DNA of *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Sci.* 80 : 145-156.

## **-T-**

Tabor C.W. et Tabor H., 1976 : 1-4, Diaminobutane (putrescine), spermidine and spermine. *Annu. Rev. Biochem.* 45 : 285-306.

Tabor C.W. et Tabor H., 1984 : Polyamines. *Annu. Rev. Biochem.* 53 : 749-790.

Tadolini B., 1989 : Polyamine inhibition of lipoperoxidation. *Biochem. J.* 249 : 33-36.

Tang G.X., Zhou W.J., Li H.Z., Mao B.Z., He Z.H. et Yoneyama K., 2003 : Medium, explant and genotype factors influencing shoot regeneration in oilseed *Brassica* spp. *J. Agron. Crop Sci.* 189: 351-358.

Tang W. et Newton R.-J., 2005 : Peroxidase and catalase activities are involved in direct adventitious shoot formation induced by thidiazuron in eastern white pine (*Pinus strobes* L.) zygotic embryos. *Plant Physiol. Biochem.* 43 : 760-769.

Tang W. et Newton R.-J., 2005 : Polyamines reduce salt-induced oxidative damage by increasing the activities of antioxidant enzymes and decreasing lipid peroxidation in *Virginia pine*. *Plant Cell Regul.* 46 : 31-43.

Tassoni A., Van Buuren M., Franceschetti M., Fornalè S. et Bagni N., 2000 : Polyamine content and metabolism in *Arabidopsis thaliana* and effect of spermidine on plant development. *Plant Physiol. Biochem.* 38 : 383-393.

Taulavuori K., Prasad M.N.V., Taulavuori E. et Laine K., 2005 : Metal stress consequences on frost hardiness of plants at northern high latitudes : A review and hypothesis. *Environ Pollut.* 135 : 209-220.

Thomine S., Wang R., Ward J., Crawford N. et Schroeder J. 2000 : Cadmium and iron transport by members of a plant metal transporter family in *Arabidopsis* with homology to Nramp genes. *Proc. Natl. Acad. Sc. USA* 97 : 4991-4996.

Tian M., Gu Q. et Zhu M., 2003 : The involvement of hydrogen peroxide and antioxidant enzymes in the process of shoot organogenesis of strawberry callus. *Plant Sci.* 165 : 701-707.

Tiburcio A.F., Kaur-Sawhney R. et Galston A.W., 1990 : Polyamine metabolism. *In* : The Biochemistry of Plants. Miflin B.J. and Lea P.J. (Eds) Vol. 16, pp. 283-325. San diego, Academic Press.

Tiburcio A.F., Altabella T. et Borrell A. et Masgrau C., 1997 : Polyamine metabolism and its regulation. *Physiol. Plant.* 100 : 664-674.

Torné J.M., Claparols I., Marcé M. , Guergué A., Santos M.A., 1994 : Influence of pretreatments with inhibitors of putrescine synthesis on polyamine metabolism and differentiation processes of maize calluses. *Plant Science* 100 : 15-22.

Torrigiani P., Altamura M.M., Capitani F., Serafini-Fracassini D. & Bagni N., 1989: *De novo* root formation in thin layers of tobacco: Changes in free and bound polyamines. *Physiol. Plant.* 77: 294-301.

Torrigiani P., Altamura M.M., Pasqua G., Monacelli B., Serafini-Fracassini D. et Bagni N., 1987 : Free and conjugated polyamines during *de novo* floral and vegetative bud formation in thin cell layers of tobacco. *Physiol. Plant.* 70 : 453-460.

Torrigiani P., Altamura M.M., Scaramagli S., Capitani F., Falasca G. et Bagni N., 1993 : Regulation of rhizogenesis by polyamine in tobacco thin layers. *J. Plant Pysiol.* 142 : 81-87.

Torrigiani P., Rabiti A.L., Bortolotti C., Betti L, Marani F., Canova A. et Bagni N., 1997 : Polyamine synthesis and accumulation in the hypersensitive response to TMV in *Nicotiana tabacum*. *New Phytologist*, 135 : 467-473.

Tran Thanh Van M., 1973 : *In vitro* control of *de novo* flower, bud, root, and callus differentiation from excised epidermal tissues. *Nature* (Lond.) 246 : 44-45.

Tran Thanh Van M., 1980 : Control of morphogenesis by inherent and exogenously applied factors in thin cell layers. *Int. Rev. Cytol. Suppl.* 11A : 175-194.

-U

Uetani M., Kobayashi E., Suwazono Y., Honda R., Nishijo M., Nakagawa H., Kido T. et Nogawa K., 2006 : Tissue cadmium (Cd) concentrations of people living in a Cd polluted area, Japan. *Biometals*, 19 : 521-525.

**-V-**

Van Assche F. et Clijsters H., 1986 : Inhibition of photosynthesis in *Phaseolus vulgaris* by treatment with toxic concentration of zinc : effect on ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *J. Plant Physiol.* 125 : 335-360.

Van Assche F. et Clijsters H., 1990 : Effects of metals on enzyme activity in plants. *Plant Cell Environ.* 13 : 195-206.

Vassil A.D., Kapulnik Y., Raskin I. et Salt D.E., 1998 : The role of EDTA in lead transport and accumulation by Indian mustard. *Plant Physiol.* 117, 447-453

Vassilev A., Lidon F., Scotti P., Da Graca M. et Yordanov I., 2004 : Cadmium-induced changes in chloroplast lipids and photosystem activities in barley plants. *Biol. Plant.* 48 : 153-156.

Velikova V.B., Yordanov I., et Edreva A., 2000 : Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants : Protective role of exogenous polyamines. *Plant Sci.* 151 : 59-66.

**-W-**

Waalkes M.P. 2000 : Cadmium carcinogenesis in review. *J. Inorg. Biochem.* 79 : 241-244.

Wagner G.J., 1993 : Accumulation of cadmium in crop plants and its consequences to human health. *Adv. Agron.* 51 : 173-212.

Wang X., Shi G., Xu Q. et Hu jinzhao H., 2007 : Exogenous polyamines enhance copper tolerance of *Nymphoides peltatum*. *J. Plant Physiol.* 164 : 1062-1070.

Watson M.B., Yu W., Galloway G. et Malmberg R.L., 1997 : Isolation and characterization of a second arginase decarboxylase cDNA from *Arabidopsis* (Accession No. AF009647). *Plant Physiol.*, 114: 1569.

Weinstein L.H., Kaur-Sawhney R., Venkat Rajam M.V., Wettlaufer S.H. et Galston A.W., 1986: Cadmium-induced accumulation of putrescine in oat and bean leaves. *Plant Physiol.* 82: 641-645.

Wenzel W.W., Blum W.E.H., Brandstetter A., Jockwer F., Kochl A., Oberforster M., Oberlander H.E., Riedler C., Roth K. et Vladeva I., 1996 : Effects of soil properties and cultivar on cadmium accumulation in wheat grain. *Z. Pflanzl. Bodenkd.* 159 : 609-614.

Wettlaufer S.H., Osmeloski J. & Weinstein L.H., 1991: Response of polyamines to heavy metal stress in oat seedlings. *Environ. Toxicol. Chem.* 10: 1083-1088.

**-X-**

Xiaomei L., Qitang W., Banks M.K. et Ebbs S.D., 2005 : Phytoextraction of Zn and Cu from sewage sludge and impact on agronomic characteristics. *J. Environ. Sci. Health A Tox. Hazard Subst. Environ. Eng.* 40 : 823-838.

**-Y-**

Yemm E.W. et Cocking E.C., 1955 : The determination of amino acids with ninhydrin. *Analyst* 80 : 209-213.

Zacchini M., Rea E., Tullio M. et de Agazio M., 2003 : Increased antioxidative capacity in maize calli during and after oxidative stress induced by long lead treatment. *Plant Physiol. Biochem.* 41 : 49-54.

**-Z-**

Zayed A., Lytle C.M. et Terry N., 1998 : Accumulation and volatilization of different chemical species of selenium by plants. *Planta* 206 : 284-292.

Zhang F.L., Takahata Y. et Xu J.B., 1998 : Medium and genotype factors influencing shoot regeneration from cotyledonary explants of Chinese cabbage (*Brassica campestris* L. ssp *pekinensis*) . *Plant Cell Rep.* 17 : 780-786.

Zhang G., Fukami M. et Sekimoto H., 2000 : Genotypic differences in effects of cadmium on growth and nutrient compositions in wheat. *J. Plant. Nutr.* 23 : 1337-1350.

Zhao H., Yang H., 2008 : Exogenous polyamines alleviate the lipid peroxidation induced by cadmium chloride stress in *Malus hupehensis* Rehd. *Scientia Hort.* 116 : 442-447.

Zheleva D.I., Alewieva V.S. et Karanov E.M., 1993 : Influence of atrazine on free bound polyamine levels in pea leaves. *J. Plant Physiol.* 141 : 282-285.

## RESUME

La phytoremédiation constitue une nouvelle technologie permettant de dépolluer les sols contaminés par l'utilisation de plantes. Parmi les différents aspects possibles de cette méthode, figure la phytoextraction basée sur l'absorption et l'accumulation du polluant dans les parties aériennes. Pour être efficace, il est nécessaire de disposer de plantes présentant une biomasse élevée. L'objectif de ce travail visait à sélectionner des variétés de moutarde indienne (*Brassica juncea* L.) tolérantes et accumulatrices de cadmium.

La première partie du travail a consisté à mettre au point et à optimiser une méthode de régénération *in vitro* de plantes de moutarde indienne, à partir de couches cellulaires minces transversales (CCMTs) (influence de l'organe utilisé, de AgNO<sub>3</sub> et de la benzylaminopurine). La régénération a été réalisée en appliquant une pression de sélection par le cadmium pour modifier la tolérance au métal.

La deuxième partie aborde l'effet des traitements par le cadmium : *in vitro* et en serre, sur le développement des plants. Une analyse des perturbations physiologiques et biochimiques observées a permis d'évaluer la tolérance des plants vis à vis du cadmium et indiquent que les plantes néoformées en présence de cadmium mettent en place un système d'exclusion du métal.

Dans la troisième partie, pour compléter l'étude précédente sur des plantes néoformées, l'effet du cadmium a été testé sur des plantes de *B. juncea* directement issues de semis. Plusieurs paramètres physiologiques et biochimiques, caractéristiques des stress, ont été étudiés (activité gaïacol peroxydase, peroxydation des lipides, pigments, acides aminés libres, proline glucides, polyamines libres et conjuguées). En raison de leurs propriétés anti-oxydantes, une attention particulière a été portée aux polyamines dont l'application exogène permet d'envisager son utilisation pour améliorer la capacité d'accumulation du cadmium par les plantes.

**Mots clés :** Phytoextraction, *Brassica juncea*, Couches Cellulaires Minces, Culture *in vitro*, AgNO<sub>3</sub>, Cadmium, Polyamines, Stress oxydatif, Pigments, Glucides, Acides aminés.

## ABSTRACT

Phytoremediation is a new technology based on the use of plants to clean up contaminated sites. The strategy of phytoextraction uses plants to extract elemental pollutants from soil into above-ground tissues and store them there for subsequent harvest. To further enhance the efficiency of phytoextraction, there is a need for plants with relatively high biomass production. The aim of this work was to select species of Indian mustard (*Brassica juncea* L.), with high tolerance and accumulation of cadmium.

In the first part, an efficient protocol for *in vitro* shoot regeneration was developed, using transverse thin cell layers from various organs of Indian mustard. The influence of silver nitrate and benzylaminopurine was studied. A selective pressure was applied during the neoformation process, aimed at modifying the cadmium tolerance.

The second part deals with the effects on the plant development of two treatments with cadmium, applied *in vitro* and in the greenhouse. Evaluation of plant tolerance to cadmium was done through measurements of physiological and biochemical modifications and indicates the development of a mechanism of cadmium exclusion.

In the third part, preceding study was completed by using plants grown from seeds. Several physiological and biochemical parameters typical for stress were analysed (guaiacol peroxidase, lipid peroxidation, pigments, amino acids, proline sugars and free and conjugated polyamines). Because of their anti-oxidative properties, a special attention was paid to the polyamines; the deleterious effects resulting from oxidative stress were alleviated by exogenous application of polyamines, enhancing cadmium tolerance of *B. juncea*.

**Mots clés :** Phytoextraction, *Brassica juncea*, Thin Cell Layers, *In vitro* culture, AgNO<sub>3</sub>, Cadmium, Polyamines, Oxidative stress, Pigments, Sugars, Amino acids.