

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

BADJI MOKHTAR- ANNABA UNIVERSITY  
UNIVERSITE BADJI MOKHTAR ANNABA



جامعة باجي مختار - عنابة

**FACULTÉ DES SCIENCES**

**Département de Biologie**

**Année: 2009/2010**

**THESE**

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de **DOCTEUR**

**EFFETS DU CADMIUM ET DES TRAITEMENTS COMBINES  
Cd/Ca<sup>+</sup> A L'ECHELLE CELLULAIRE ET SUBCELLULAIRE.**

**Option**

BIOLOGIE VEGETALE

**Par**

M. CHAGRA Ali

**DIRECTEUR DE THÈSE :** DJEBAR Mohammed-Réda Prof. Université de Annaba.

**Devant le jury :**

<b>PRÉSIDENT</b>	H. BERREBBAH	Pr.	Université de Annaba.
<b>EXAMINATEURS</b>	C. RAHMOUNE	Pr.	Université de Constantine.
	A. TADJINE	MC	Université d'El Tarf
	L. MEKSEM	M.C.	Université de Annaba.

## REMERCIEMENTS

Ces recherches ont été effectuées au Laboratoire de Toxicologie cellulaire de l'Université de Annaba, dirigé par le Professeur Mohammed Réda. DJEBAR. Je tiens à le remercier de l'accueil qu'il m'a réservé dans son laboratoire et de l'intérêt qu'il a témoigné à mon égard. Je tiens aussi à lui témoigner toute ma reconnaissance pour avoir assuré la direction de ce travail. L'attention qu'il a portée à ma recherche, ses conseils, ses discussions critiques ainsi que sa disponibilité attentive et amicale ont permis de mener à bien la réalisation de ce travail.

Je tiens aussi à remercier chaleureusement le Dr. Houria BERREBBAH, Professeur à l'Université de Annaba de me faire l'honneur de présider ce jury.

Madame A. TADJINE, Maître de Conférences à l'Université de Tarf, Monsieur C. RAHMOUNE, Professeur, Directeur de Laboratoire de recherche à l'Université de Constantine et Madame L. MEKSEM, Maître de Conférences à l'Université de Annaba, ont bien voulu accepter de faire partie du jury de cette thèse. Je leur en suis très reconnaissant et leur exprime toute ma gratitude.

Je désire remercier particulièrement Professeur M. Guy pour les multiples conseils et les judicieuses critiques qu'il m'a accordé tout au long de mon séjour en France.

Je remercie enfin ma femme et tous les membres de ma famille pour leur soutien durant toute la période de préparation de ce mémoire. Je ne saurais oublier tous mes amis du laboratoire pour leur aide et leurs encouragements.

## AVANT – PROPOS

Le développement du secteur industriel sans préoccupation des rejets de composés toxiques est à l'origine de l'accélération de la vitesse à laquelle notre environnement est dégradé. Ainsi le "changement global" ou "global change" est défini par les scientifiques comme étant l'ensemble des modifications qui affectent le fonctionnement de la planète sur le long terme. Pour faire face à cela, il devient urgent de lier le plus efficacement possible les résultats des découvertes scientifiques aux décisions politiques.

Souvent, l'homme ne prend conscience de ces dangers que suite à de graves et spectaculaires accidents relatifs à d'importantes pollutions qui sont amplement médiatisées : Parmi ses nombreuses pollutions environnementales, notre travail a ciblé la pollution chimique. En effet, celle-ci est source de retombées aussi dangereuses pour la survie et le fonctionnement des écosystèmes. Souvent, la pollution chimique dite diffuse se traduit par la présence de xénobiotiques assez dangereux mais à de faibles concentrations. Cette présence continue au contact de la faune et de flore aboutit inévitablement à des modifications dont l'étude des impacts constituera l'un des importants enjeux de notre ère.

C'est dans ce contexte que se situe notre travail, dont la partie la plus importante concerne les effets directs que le cadmium (polluant métallique) est susceptible d'exercer sur les propriétés de transduction d'énergie associés aux membranes mitochondriales. Dans une seconde partie, nous avons examiné les effets antagonistes des interactions Cd/Ca au niveau mitochondrial.

## Résumé

Les résultats exposés dans cette thèse montrent que la vitesse de l'oxydation du succinate par les mitochondries isolées est diminuée par le cadmium (50%). D'autre part, on constate que la vitesse en état non phosphorylant n'est que très peu modifiée au cours du traitement. On obtient donc une diminution du contrôle respiratoire. De plus, les valeurs des rapports ADP/O tendent à diminuer au cours de ce traitement. L'effet du cadmium sur les capacités oxydatives des mitochondries n'est réellement observé qu'à partir des concentrations 8, 12 et 20 $\mu$ M. Les mesures de variations de  $\Delta\Psi$  montrent que le cadmium a tendance à réduire fortement ces valeurs (+ de 50%). Cette baisse serait directement responsable de la chute du  $\Delta p\mu H^+$  généré par l'oxydation du succinate. Une activité ATPasique est enregistrée et le traitement par le cadmium modifie celle-ci dans le sens d'une diminution (50%). Cette activité est de type ATPase mitochondriale sensible à l'oligomycine. Parallèlement, on constate qu'une activité ATPasique importante insensible au cyanure se développe au cours du traitement des mitochondries et que le cadmium la stimule fortement. Les résultats relatifs aux effets du cadmium sur les variations de volume des mitochondries montrent qu'une modification importante du volume mitochondrial est observée, celle-ci atteint 90%. Le suivi des variations de protons  $H^+$  ( $\Delta pH$ ) montre qu'une acidification importante du milieu de mesure est observée en présence de cadmium.

Enfin, les mesures des activités enzymatiques catalase et guaiacol-Peroxydase montrent que les faibles concentrations de cadmium stimulent ces activités et les fortes concentrations de cadmium les réduisent fortement. Ceci pourrait traduire en fait la mise en évidence d'un système de détoxification du cadmium. Le dosage de la LOX chez les MP traitées par le cadmium montre que cette activité est très fortement stimulée. Ceci associée aux taux importants en acide linoléique et linoléique, sera traduite par une très forte production de ROS, qui sont de potentiels destructeurs des membranes mitochondriales. Parallèlement le calcium semble plutôt sans effet notable sur les propriétés des mitochondries. L'ensemble de ces résultats indiquent que dans les conditions de traitement utilisées, le cadmium exerce un effet important sur la perméabilité de la membrane interne mitochondriale aux protons et cations monovalents. Il semble donc clair que les effets du cadmium sur le gonflement mitochondrial traduisent une modification profonde de perméabilité des membranes en réponse en partie à une activité ATPasique qui serait indirectement inhibée par le cadmium.

## **Abstract**

## المخلص

# SUMMARY

In this thesis, results show that the speed of the oxidation of the succinate by isolated mitochondria is diminished by the cadmium- (50%).

On the other hand, we can notice that the speed of non- phosphorylant state is only very little changed with treatment.

In addition, ADP/O report values tend to decrease in this time of the treatment. The affect of cadmium on oxidative capacities of the mitochondria is actually observed only from concentration 8,12 and 20 $\mu$ M. Variation measurements of  $\Delta\psi$  show that the cadmium tend to greatly- reduce these values. (+ 50%).

Such a reduction would be directly responsible for the fall of the  $Dp\mu H^+$  generated by oxidation of succinate. An ATPasic activity is saved and the processing by the cadmium modifies this later in the sense of decrease (50%). This activity is of type ATPasic sensitive to oligomycin.

Parallely, use ascertain that and important ATPasic activity insensitive to the cyanide develops in the treatment of the mitochondria and that the cadmium stimulates it strongly.

The effects of cadmium on changes in volume of the mitochondria related results show that a significant change ( $\Delta pH$ ) volume is observed, attaining 90%.

Acidification middle measurement is observed in the presence of cadmium.

At last, the enzyme catalase and guaiacol peroxidase activity measures show that low concentration of the cadmium reduces them strongly. This could actually express the highlighting of a system of detoxification of cadmium. The dose handled by this activity is very strongly stimulated cadmium.

This, associated with linolenic and linoleic acids important rates will give a very high ROS, which are potential destroyers of the mitochondrial membrane production.

At the sometime the calcium seems rather no-significant affect on the proton mitochondrial internal membrane and cation monovalents.

It seems therefore; clear that effect of cadmium on the mitochondrial swelling lead to a deep modification of membranes in response in part to a ATPasic activity which would be indirectly inhibited by cadmium.



## المخلص

النتائج المعروضة في هذه المذكرة تبين معدل أكسدة السكسينات عن طريق الميتاكنديا المعزولة والتي تتناقص بتأثير الكادميوم (50%).

من جهة أخرى ن سجل بأن المعدل في مرحلة غيرالفسفرة قليلة التغير خلال عملية المعالجة، وعليه فإننا نتحصل على نقص في مراقبة التنفس إضافة إلى قيم نسب  $ADP/0$  التي تميل إلى التناقص خلال هذه المعالجة. تأثير الكادميوم على القدرة الأكسدية للميتاكنديا هي في الحقيقة غير ملاحظة إلا ابتداء من تراكيز  $8$  ،  $12$  و  $20 \mu M$ .

قياسات التغيرات للجهد الغشائي ( $\Delta\Psi$ ) تبين أن الكادميوم يميل إلى خفض كبير لقيمه (+50%). هذا الانخفاض يعد مباشرة المسؤول عن هبوط الـ  $\Delta\mu H^+$  الناتج عن أكسدة السكسينات.

ثم تسجيل نشاط **Atpasique** والمعالجة بالكادميوم تغير هذه الأخيرة باتجاه الانخفاض (50%). هذا النشاط هو من النوع **Atpasique** ميتاكوندري حساس للإليفيومايسين وبالتالي مع ذلك نلاحظ نشاط إنزيم **Atpasique** هام غير متأثر للسيانير والذي يتطور خلال معالجة الميتاكنديا وأن الكادميوم يحفزها بشدة.

النتائج المتعلقة بتأثيرات الكادميوم على تغيرات حجم الميتاكنديا تبين بأن هناك تغير شديد في الحجم الميتاكوندري والتي تبلغ 90%.

متابعة تغيرات البروتونات  $H^+$  ( $\Delta pH$ ) تبين حموضة هامة في وسط القياس وذلك في وجود الكادميوم. أخيرا فإن قياسات النشاطات الإنزيمية للكatalاز والكيكول وبيروكسيدياز تبين بأن التراكيز الضعيفة للكادميوم تحفز هذه النشاطات، والتراكيز الشديدة للكادميوم تنقصها بشدة، يمكن ترجمة هذا بوجود ميكانيزم لنزع التسمم بالكادميوم.

إن معايرة الـ **Lox** عند الميتاكنديا النقية المعالجة بالكادميوم تبين بأن هذا النشاط محفز جدا وهذا بالاشتراك مع كميات هامة لأحماض النوليك والنيولينيك والتي تترجم بإنتاج كبير لـ **ROS** والقدرة على تكسير وتحطيم أغشية الميتاكنديا.

موازة مع ذلك فإنه يعتقد بأن الكالسيوم غير مؤثر على خصائص الميتاكنديا.

مجموع النتائج تبين بأنه في شروط المعالجة المستعملة، الكادميوم يمارس تأثير هام في نفاذية الغشاء الداخلي للميتاكنديا للتحرك الأحادي للبروتونات والكاتيونات.

إن فإنه من الواضح بأن تأثيرات الكادميوم على الإنتفاخ الميتاكوندري تترجم تغير عميق في نفاذية الأغشية تجاوبا جزئيا لنشاط الـ **Atpasique** الذي سيكون بصورة غير مباشرة مثبت من طرف الكادميوم.



## Liste des tableaux

N°	Titre	Page
01	Valeurs moyennes des métaux lourds émis à partir de sources naturelles et anthropogéniques (Pope Sun <i>et al.</i> , 1998).	03
02	Caractéristiques physico-chimiques du cadmium.	19
03	Effet du Cadmium sur les activités oxydatives des mitochondries de Pomme de Terre incubées en présence d'ATP. A : ATP 0,1mM, B : ATP 2mM. Les techniques de mesure des vitesses d'oxydation sont décrites dans le chapitre Matériel et Méthodes. Protéines mitochondriales : 0,1mg ml <sup>-1</sup> . La concentration du succinate est de 2mM. Nd : Non déterminé.	61
04	Effets du Cadmium sur le potentiel de membrane des mitochondries de Pomme de Terre déterminé en présence et en absence de phosphate et d'ATP. La concentration de phosphate est de 10mM, celle de l'ATP est de 2mM. Nd : Non déterminé.	62
05	Effets du Cadmium sur les variations du contenu en acides gras des lipides polaires.	73
06	Effets du calcium sur les activités oxydatives des mitochondries de Pomme de Terre incubées en présence d'ATP A : ATP 0,1mM, B : ATP 2mM. Les techniques de mesures des vitesses d'oxydations en état 3 et en état 4 sont décrites dans le chapitre I (Matériel et méthodes). Les protéines mitochondriales sont de 0,1mg/ml. La concentration de succinate est de 2mM.	74
07	Effets du calcium sur le potentiel de membrane des mitochondries de Pomme de Terre en présence et en absence de phosphate et d'ATP. La concentration de phosphate est de 10mM, celle de l'ATP est de 2mM et celle du succinate est de 2mM. Nd : Non déterminé.	75
08	Effets du calcium sur les variations du contenu en acides gras des lipides polaires chez les mitochondries isolées de Pomme de terre.	85
09	Effet du traitement combiné Ca/Cd sur les propriétés oxydophosphoryantes des mitochondries de Pomme de Terre. Concentration de succinate (2mM).	87

## Liste des tableaux

N°	Titre	Page
10	Effets du traitement combiné $\text{Ca}^+/\text{Cd}^+$ sur le potentiel de membrane des mitochondries de Pomme de terre déterminé en absence de phosphate et d'ATP.	88
11	Effets du traitement combiné $\text{Ca}^+/\text{Cd}^+$ sur les variations du contenu lipidique en acides gras des lipides polaires des mitochondries isolées de Pomme de terre.	101

## Liste des figures

N°	Titre	Page
01	Différentes phases induites chez une plante suite à une exposition à un xénobiotique (d'après Lichtenthaler,1998).	12
02	Représentation schématique de la chaîne de transfert des électrons de la membrane mitochondriale interne (Buchanan <i>et al.</i> , 2000).	43
03	Schéma général des changements morphologiques des cellules durant la mort cellulaire par voie nécrotique.	47
04	Schéma général descriptif des changements morphologiques des cellules durant la mort cellulaire par voie apoptotique.	48
05	Schéma illustrant les principales étapes d'isolement des mitochondries de Pomme de Terre. C : Culot ; S : Surnageant.	52
06	Purification des mitochondries de Pomme de Terre sur gradient discontinu de Percoll. Après centrifugation à 12000g d'un gradient discontinu renfermant 15%, 25%, 35% et 70% de Percoll. 4 fractions peuvent être séparées. Les mitochondries intactes sont situées au niveau de la zone inférieure de Percoll 25%.	53
07	Electrode à Oxygène. Le milieu réactionnel renferme du mannitol 300mM , tampon phosphate 10mM (pH 7,2), MgCl <sub>2</sub> 5mM, KCL 30Mm SAB 1g l <sup>-1</sup> et 0,5 à 1mg de protéines mitochondriales ou membranaires. La cellule en verre, (Figure 7) d'un volume réglable de 1 à 2 ml est thermostatée à 25°C ± 0,02°C. La concentration initiale en oxygène du milieu d'électrode, en équilibre avec l'atmosphère est de 240µM (Estabrook, 1967).	54
08	Effets du cadmium sur l'activité ATPasique des mitochondries de Pomme de terre. La concentration d'ATP est de 2 mM. Technique de Rembur <i>et al.</i> , 1983.	64
09a	Evolution des vitesses de libération des protons H <sup>+</sup> liées à d'éventuelles activités d'hydrolyse de l'ATP par les mitochondries de Pomme de Terre traitées par le cadmium à 25°C. Les mesures de pH sont réalisées sur des mitochondries fraîches (0,19 mg protéines ml <sup>-1</sup> , en absence d'oligomycine « a »).	65

## Liste des figures

N°	Titre	Page
09b	Evolution des vitesses de libération des protons H <sup>+</sup> liées à d'éventuelles activités d'hydrolyse de l'ATP par les mitochondries de Pomme de Terre traitées par le cadmium à 25°C. Les mesures de pH sont réalisées sur des mitochondries fraîches (0,19 mg protéines ml <sup>-1</sup> , en présence d'oligomycine « <u>b</u> ».	65
10a	Enregistrement des variations de pH du milieu de mesure des mitochondries de Pomme de Terre traitées par le cadmium à 25°C. Les mesures de pH sont réalisées sur des mitochondries fraîches (0,19 mg protéines ml <sup>-1</sup> , en absence d'oligomycine « <u>a</u> ».	67
10b	Enregistrement des variations de pH du milieu de mesure des mitochondries de Pomme de Terre traitées par le cadmium à 25°C. Les mesures de pH sont réalisées sur des mitochondries fraîches (0,19 mg protéines ml <sup>-1</sup> , en présence d'oligomycine « <u>b</u> ».	
11	Effets du cadmium sur les variations de volume des mitochondries isolées de Pomme de Terre.	68
12	Effets du cadmium sur les activités oxydatives des mitochondries isolées de Pomme de Terre (Vitesses d'oxydations en état non phosphorylant « Vox <sub>4</sub> » de la voie alternative de transfert d'électrons insensible au cyanure). Protéine mitochondriale : 0,1 ml/ml. Concentration de KCN : 1 mM.	69
13	Effets du cadmium sur l'activité enzymatique Catalase des mitochondries isolées de Pomme de Terre. Concentration des protéines : 0,1 mg/ml.	70
14	Effets du cadmium sur l'activité enzymatique Peroxydase (GPX) des mitochondries isolées de Pomme de Terre. Concentration des protéines : 0,1 mg/ml.	71
15	Effets du cadmium sur l'activité enzymatique lipoxygénase (LOX) des mitochondries isolées de Pomme de Terre. Concentration des protéines : 0,1 mg/ml.	72
16	Effets du calcium sur l'activité ATPasique des mitochondries isolées de Pomme de Terre. Concentration des protéines : 0,1 mg/ml.	77

## Liste des figures

N°	Titre	Page
17a	Evolution des vitesses de libération des protons dans les mitochondries de Pomme de Terre au cours du traitement par le calcium à 25°C, en absence d'oligomycine (1,25µM) ; (a) . La mesure de la vitesse de libération des H <sup>+</sup> lors de l'addition de l'ATP est décrite dans le chapitre I.	78
17b	Evolution des vitesses de libération des protons dans les mitochondries de Pomme de Terre au cours du traitement par le calcium à 25°C en présence d'oligomycine (1,25µM) ; (b). La mesure de la vitesse de libération des H <sup>+</sup> lors de l'addition de l'ATP est décrite dans le chapitre I.	79
18	Effets du calcium sur les variations de volume des mitochondries isolées de Pomme de Terre.	80
19	Effets du calcium sur les activités oxydatives des mitochondries isolées de Pomme de Terre (Vitesse d'oxydations en état non phosphorylant « Vox <sub>4</sub> » de la voie alternative de transfert d'électrons insensible au cyanure). Protéine mitochondriale : 0,1 ml/ml. Concentration de KCN : 1 mM.	91
20	Effets du calcium sur l'activité enzymatique Catalase des mitochondries isolées de Pomme de Terre. Concentration des protéines : 0,1 mg/ml.	82
21	Effets du calcium sur l'activité enzymatique Catalase des mitochondries isolées de Pomme de Terre. Concentration des protéines : 0,1 mg/ml.	83
22	Effets du calcium sur l'activité enzymatique lipoxygénase (LOX) des mitochondries isolées de Pomme de Terre. Concentration des protéines : 0,1 mg/ml.	84
23a	Effets du traitement combiné Ca <sup>+</sup> /Cd <sup>+</sup> sur l'activité ATPasique des mitochondries de Pomme de terre. La concentration de calcium est de 0,5mM.	89
23b	Effets du traitement combiné Ca <sup>+</sup> /Cd <sup>+</sup> sur l'activité ATPasique des mitochondries de Pomme de terre. La concentration de calcium est de 1mM.	90

## Liste des figures

N°	Titre	Page
24a	Evolution des vitesses de libération des protons dans les mitochondries de Pomme de Terre au cours du traitement combiné $\text{Ca}^+/\text{Cd}^+$ à 25°C. La mesure de la vitesse de libération des $\text{H}^+$ lors de l'addition de l'ATP est décrite dans le chapitre I.	91
24b	Evolution des vitesses de libération des protons dans les mitochondries de Pomme de Terre au cours du traitement combiné $\text{Ca}^+/\text{Cd}^+$ à 25°C. La mesure de la vitesse de libération des $\text{H}^+$ lors de l'addition de l'ATP est décrite dans le chapitre I.	92
25a	Enregistrement des variations de pH du milieu de mesure des mitochondries de Pomme de Terre traitées par la combinaison $\text{Cd}^+/\text{Ca}^+$ à 25°C. Les mesures de pH sont réalisées sur des mitochondries fraîches (0,19 mg protéines $\text{ml}^{-1}$ , en absence d'oligomycine « <u>a</u> ».	93
25b	Enregistrement des variations de pH du milieu de mesure des mitochondries de Pomme de Terre traitées par la combinaison $\text{Cd}^+/\text{Ca}^+$ à 25°C. Les mesures de pH sont réalisées sur des mitochondries fraîches (0,19 mg protéines $\text{ml}^{-1}$ , en présence d'oligomycine « <u>b</u> ».	93
26a	Enregistrement des variations de pH du milieu de mesure des mitochondries de Pomme de Terre traitées par la combinaison $\text{Cd}^+/\text{Ca}^+$ à 25°C. Les mesures de pH sont réalisées sur des mitochondries fraîches (0,19 mg protéines $\text{ml}^{-1}$ , en absence d'oligomycine « <u>b</u> » à une concentration de calcium = 1mM.	94
26b	Enregistrement des variations de pH du milieu de mesure des mitochondries de Pomme de Terre traitées par la combinaison $\text{Cd}^+/\text{Ca}^+$ à 25°C. Les mesures de pH sont réalisées sur des mitochondries fraîches (0,19 mg protéines $\text{ml}^{-1}$ , en présence d'oligomycine « <u>b</u> » à une concentration de calcium = 1mM.	95
26c	Effets du traitement combiné $\text{Ca}^+/\text{Cd}^+$ sur les variations de volume des mitochondries isolées de Pomme de Terre. Concentration de calcium = 0,5mM.	96
26d	Effets du traitement combiné $\text{Ca}^+/\text{Cd}^+$ sur les variations de volume des mitochondries isolées de Pomme de Terre. La concentration de calcium est de 1mM.	96

## Liste des figures

N°	Titre	Page
27	Effets du traitement combiné $\text{Cd}^+/\text{Ca}^+$ sur les activités oxydatives des mitochondries isolées de Pomme de Terre (Vitesses d'oxydations en état non phosphorylant « $\text{Vox}_4$ » de la voie alternative de transfert d'électrons insensible au cyanure). Protéine mitochondriale : 0,1 ml/ml. Concentration de KCN : 1 mM.	97
28	Effets du traitement combiné $\text{Ca}^+/\text{Cd}^+$ sur l'activité enzymatique Catalase des mitochondries isolées de Pomme de Terre. Concentration des protéines : 0,1 mg/ml.	98
29	Effets du traitement combiné $\text{Ca}^+/\text{Cd}^+$ sur l'activité enzymatique peroxydase (GPX) des mitochondries isolées de Pomme de Terre. Concentration des protéines : 0,1 mg/ml.	99
30	Effets du traitement combiné $\text{Cd}^+/\text{Ca}^+$ sur l'activité enzymatique lipoxygénase (LOX) des mitochondries isolées de Pomme de Terre. Concentration des protéines : 0,1 mg/ml.	100
31	Schéma illustrant l'hypothèse de l'action du cadmium sur l'activité oxydante et phosphorylante des mitochondries isolées d Pomme de Terre (Chagra et Djebar, 2010). PLM : PhosphoLipides Membranaires.	115

# INTRODUCTION

L'industrialisation à un rythme accéléré et incontrôlé se fait au détriment de l'homme et de son environnement. De nombreuses activités humaines, industrielles, chimiques agricoles ou domestiques sont responsables de la dégradation de l'environnement (réchauffement de la planète, changement climatique, perturbations des écosystèmes, diminution de la couche d'ozone etc... (Bonnieux et Desaignes, 1998).

De plus, les pays industrialisés sont les premiers responsables de tous ces dégâts, ainsi 80% des émanations de CO<sub>2</sub> dans l'atmosphère responsables du réchauffement leurs sont imputables (Bar, 2004). La pollution de l'air par exemple auquel l'homme est exposé en permanence constitue à la fois une atteinte à sa qualité de vie et à sa santé, elle affecte également la vie des végétaux et des animaux et contamine les sources d'eau, la chaîne alimentaire et les autres milieux (Mafoua *et al.*,1995).

## **1 - Les métaux lourds.**

La contamination croissante de la biosphère par les métaux lourds est indissociablement liée aux progrès de l'humanité et au développement de la civilisation, elle représente un danger véritable pour l'environnement à long terme de nature irréversible (Popescu *et al.*,1998). Cette contamination ne se limite pas uniquement à la dégradation des écosystèmes avec ses conséquences sur la flore, la faune et sur la biodiversité, mais elle représente un réel problème de santé publique par la menace de contamination des denrées alimentaires ou par des récoltes insuffisantes.

La majorité des métaux lourds, contrairement aux contaminants organiques, ne sont pas bio transformés et persistent dans l'environnement (Kong *et al.*, 1995). Ils ont un temps de rémanence qui est de l'ordre de millions d'années, dans le sol (Sun *et al.*, 2001). Les métaux lourds par leurs propriétés non biodégradables sont toxiques et responsables de nombreuses pathologies (Adriano, 2001; Abraham, 2002).

### **1.1. Les Eléments traces métalliques :**

Il n'existe pas une définition reconnue pour les termes "Métaux lourds" ainsi les géologues les définissent comme ETM : Eléments Traces Métalliques, composés naturels présents à de très faibles concentrations et qui englobent moins de 1% des roches de la croûte terrestre (Harrisson, 1996, Adler 2001). Pour les spécialistes en chimie les métaux lourds sont classés selon leurs propriétés spécifiques (masse volumique)  $5\text{g/cm}^3$ ; capacité à fournir des cations polyvalents . Les agronomes définissent les métaux lourds comme étant des oligo-éléments indispensables à de nombreux organismes vivants (Chappuis, 1991).

En toxicologie, les métaux lourds constituent des éléments à pouvoir cumulatif avec essentiellement des effets néfastes sur les êtres vivants et l'environnement (Viala, 1998; Bounias, 1999). Ils constituent pour eux des éléments potentiellement toxiques dont la toxicité est bien signalée à travers divers documents, directives, OMS etc... (Popescu *et al.*, 1998).

### **1.2. Les origines des ETM :**

Géochimique : les ETM peuvent constituer des éléments naturels du sol où ils peuvent exister sous de très fortes concentrations. Leur source peut aussi provenir des émissions atmosphériques naturelles (volcans, feux de forêts, érosion du sol), (Mass, 1987; Popescu *et al.*, 1998).

Anthropogéniques : Nombreux travaux scientifiques montrent que les ETM existent dans les retombées atmosphériques diffuses dues essentiellement à la production d'énergie par combustion du charbon et du pétrole, à l'extraction et la métallurgie des métaux ferreux et non ferreux et aux gaz d'échappements (Bernard et Lauwerys, 1992, OMS 1992; Sun *et al.*, 2001). Les ETM peuvent aussi se retrouver dans les décharges minières de fonderie (As, Cd, Pb, Ti) et de raffinerie (Harrisson, 1996; Chaoui *et al.*, 1997).

Le tableau 1 représente un aperçu des valeurs moyennes des émissions des ETM de sources naturelles et anthropogéniques (Popescu *et al.*, 1998).

**Tableau 01:** Valeurs moyennes des métaux lourds émis à partir de sources naturelles et anthropogéniques (Pope Sun *et al.*, 1998).

Sources	Cr	C u	Ni	P b	Zn
Combustion du charbon	11 27 5	5 0 0 5	13 76 3	8 1 5 8	11101
Combustion du pétrole	14 08	1 9 5 9	27 06 5	2 4 1 9	2159
Métallurgie de métaux non ferreux	/	2 6 7 3 8	87 81	4 9 0 8 5	71571
Sidérurgie	/	1 1 0	/	7 6 5	855
Incinération des déchets	11 39	1 5 7	36 4	2 3 7	5900

		5		0	
Engrais phosphatés	/	4 1 1	41 1	1 6 5	4110
Industrie du ciment	13 35	/	49 0	7 1 2 9	9790
Sources mobiles	/	/	/	2 4 8 0 3 0	/
Combustion de bois	/	9 0 0	12 00	2 1 0 0	3600
A	/	/	/	4 0 0 0	3254
Totales émissions anthropogéniques	30 77 7	3 8 1 8 9	55 64 2	3 3 1 8 5 4	131866
Totales émissions naturelles	44 00 0	2 8 0 0 0	30 00 0	1 2 0 0 0	45000

Les ETM peuvent aussi provenir de plusieurs composés utiles tels les amalgames, détergents, quelques médicaments, composés agricoles (engrais phosphates: (Cd), les compostes et les pesticides (As, Cu, Pb), (Prasad et Freitas, 2000).

Les déchets urbains peuvent aussi générer des ETM : les eaux usées, les boues d'épuration et les ordures ménagères renfermant papier, plastique, pétrissables (poissons), piles, débris de lampes et thermomètres. L'incinération des déchets ménagers et industriels constitue une source très importante d'ETM (Popescu *et al.*, 1998). Enfin, les ETM peuvent principalement provenir des déchets industriels, dont les huiles usagées ou industrielles, les sous-produits industriels (solvants, déchets de peinture...), les effluents des tanneries, les industries du plastique (Cd, Zn, Sn, Pb), de textile, de pneumatique, de micro-électrique et de conservation de bois (Harrisson, 1996; Popescu *et al.*, 1998; Prasad et Freitas., 2000 et Opecst, 2001).

### **1.3. Bioaccumulation des Métaux Lourds :**

Elle est définie comme étant un processus pour lequel l'organisme assimile et concentre les métaux lourds à des concentrations supérieures à celles existantes dans le milieu (Bineyet Amuzou, 1994). La bioaccumulation des métaux lourds comporte trois phases dont l'assimilation, la bioaccumulation/bioconcentration et enfin la bioaccumulation entre individus ou bioamplification. En présence de métaux lourds, deux voies principales d'exposition se présentent, celle externe (courant eau/air) et qui provoque un phénomène d'absorption (xénobiotique à la surface) et celle interne (assimilation ou absorption).

Durant la bioaccumulation, il apparaît que les organismes vivants concentrent beaucoup plus les métaux lourds que l'eau et l'air avec une certaine hiérarchie entre les différentes espèces selon leur pré disponibilité à concentrer les métaux lourds (Chiffolleau *et al.*, 2001).

La concentration de l'ion libre métallique a une grande importance dans le contrôle de la capture de cet ion. Sa forme libre est proposée comme espèce la plus bio disponible (Campbell, 1995).

La majorité des ETM ne traversent la membrane plasmique hydrophobe qu'à l'aide d'un ligand-transporteur. Une fois à l'intérieur de la cellule, il est rapidement fixé par un autre ligand pour limiter sa diffusion à l'extérieur de la cellule. Ces ligands constituent ce qu'on appelle les systèmes de "piégeage cinétique" caractérisé par le pouvoir de liaison et leur système tous deux spécifiques du métal lourd en jeu (Simkiss *et al.*, 1982, Simkiss et Taylor, 1995).

#### **1.4. Contamination de l'environnement par les ETM**

La pollution atmosphérique : elle est définie comme étant un phénomène due à la présence de xénobiotiques, ou à une modification des composants de l'air dans leurs proportions de sorte à créer des nuisances ou des gênes ou à provoquer des effets nocifs (Viala, 1998).

La pollution métallique de l'air est globale du fait qu'elle contribue à la contamination de tous les composants de l'environnement. Un mélange de particules et d'aérosols acides peut affecter directement la santé de l'homme se traduisant par des irritations respiratoires et oculaires. De plus, ce mélange est responsable de la détérioration des matériaux (véhicules et bâtiments) et de la réduction de la qualité des plantes en réduisant leur photo respiration (Fifield et Haines, 1995).

Les rejets industriels spécifiques : La sidérurgie, l'industrie des accumulateurs, la métallurgie et la cimenterie émettent dan l'air des particules et des poussières métalliques (Viala, 1998).

Les rejets des installations de combustion : ce type de pollution est attribué principalement aux centrales thermiques alimentées au fuel ou au charbon, aux foyers de combustion industrielle et aux usines d'incinération des ordures ménagères. Ces installations rejettent des cendres et des imbrûlés support de nombreux ETM, (Popescu, *et al.*, 1998).

Les rejets automobiles : ils constituent actuellement la source la plus importante de pollution de l'air par le plomb, (Opecst, 2001).

Les facteurs intervenants dans la pollution atmosphériques : les émissions atmosphériques sont le plus souvent sous forme de particules solides à teneurs variables en ETM, de granulométrie également variable ou encore sous forme gazeuse. L'état chimique du métal associé à sa granulométrie déterminent sa durée et son séjour dans l'atmosphère et influe énormément sur sa toxicité (Popescu *et al.*, 1998). A tous ces facteurs s'ajoutent ceux relatifs à la météo ; les propriétés des vents (vitesse, dominance) la température, l'humidité et la pression atmosphérique et l'interaction des autres xenobiotiques sont responsables de la formation des couches d'inversion thermique et des "smogs" photochimiques (Lu, 1992; Viala, 1998).

### **1.5. Contamination du sol par les ETM :**

C'est un enjeu fondamental car ces derniers affectent l'environnement proche de l'homme, menacent l'alimentation en eau potable et réduisent le potentiel agricole (Opecst, 2001). Les ETM sont caractérisés par une accumulation lente et un temps de rémanence très long pour la majorité des ETM (Mc Grath, 1997). Souvent, les sols se comportent comme des tampons naturels facilitant le transport des ETM vers l'hydrosphère et la biocénose. Ainsi leur persistance dans le sol, considérée la plus longue par rapport aux autres compartiments de la biosphère et leur biodisponibilité favorise la contamination de la chaîne trophique à partir des micro-organismes jusqu'au dernier maillon : l'homme (Fifield et Haines, 1995). Outre le fond pédogéochimique, la contamination des sols est en grande partie

imputable à l'activité humaine notamment par les produits agrochimiques, les retombées atmosphériques diffuses et les activités métallurgiques.

L'usage incontrôlé des pesticides/herbicides et le traitement excessif des sols arables par les fertilisants phosphatés enrichissent les couches superficielles de la terre par les ETM au fur et à mesure des amendements, ceci pourrait être un véritable problème de contamination métallique à long terme. Il en est de même pour les parcelles à proximité d'autoroutes et les zones industrielles (Fifield et Haines, 1995).

L'aridité, les processus de méthylation et la complexation des ETM avec des ligands inorganiques (hydroxyle, chlorure, carbonate, bicarbonate, sulfate, forures et borate (Helmke *et al.*, 1997), ou des ligands organiques (substances humiques et acides organiques à faible poids moléculaire) facilitant la mobilisation des ces contaminants, augmentent un degré de solubilité et par conséquent favorise leur biodisponibilité (Alloway, 1997). Parallèlement, le degré d'oxydation et la composition ionique de la phase liquide du sol influencent sensiblement la mobilisation et la spéciation des ETM, ceci par la formation des complexes solubles ou d'autres insolubles et la compétition des ions métalliques vis-à-vis des sites d'adsorption (Alloway, 1997).

### **1.6. Contamination des milieux aquatiques par les ETM :**

L'eau est un élément important pour les polluants en général et les ETM en particulier, car la mobilité, la biodisponibilité et la toxicité de ces derniers dépend des paramètres physico- chimiques de l'eau (pH, dureté, concentration de matière de suspension, MES, salinité, potentiel d'oxydoréduction...) (Kong *et al.*, 1995). Ainsi la concentration en cadmium des eaux de mer est deux fois plus faible que celle des eaux douces (Miquel, 2001).

Le pH des milieux aquatiques influence la spéciation des ETM car il affecte la physiologie et modifie la susceptibilité des organismes vis-à-vis des ETM. En général les métaux lourds existent sous forme ionique libre à pH acide

(Andy et William, 1995) et à pH basique ils précipitent sous forme d'hydroxydes insolubles ou sous forme d'oxydes (Kong *et al.*, 1995).

Selon Hart (1981), les formes ioniques des ETM sont les plus toxiques pour les organismes vivants, tandis que les formes complexées le sont moins (Wüthrich, 2001). La pénétration des ETM dans l'environnement aquatique peut avoir des effets dramatiques sur la biodisponibilité et la toxicité vis-à-vis des processus biologiques. Ainsi la bioamplification par le plancton et la biotransformation par les bactéries dans l'interface eau-sédiment paraît influencer fortement l'impact des ETM. Ces phénomènes donnent naissance à des dérivés métalliques plus toxiques qui seront bio accumulés le long de la chaîne trophique (eau, plancton, poisson, herbivore, carnivore et homme). Ceci rend par conséquent les milieux aquatiques encore plus sensibles à ces contaminants métalliques (Fifield et Haines, 1995). Ainsi la pollution atmosphérique, représentée par des retombées sèches ou liquides accompagnées des pluies acides contribue à la contamination de l'environnement aquatique à proximité des zones industrielles (Steinnes, 1997).

Enfin, les ETM sont apportés directement dans l'eau sous forme de rejets industriels (déchets liquides et eaux résiduaires industrielles) et d'eaux usées urbaines renfermant des excréta humains, détergents et certains médicaments et dans certains cas par les canalisations.

### **1.7. Les ETM dans la plante :**

Certains ETM sont indispensables à certains métabolismes importants tels la photosynthèse, la respiration ou encore la nutrition (Kabala-Pendias and Pendias, 2001). Ils interviennent aussi dans la biosynthèse des protéines, celle des substances de croissance de la chlorophylle, des lipides et dans la réponse des organismes au stress (Rengel, 1999). Souvent l'état d'oxydation des ETM leur confère un rôle très important dans différentes activités enzymatiques (réactions d'oxydoréduction), (Chaignon, 2001). Cependant et malgré toutes ces observations, le rôle joué par les ETM chez les plantes reste très mal élucidé.

**1.7.1. Voie de pénétration des ETM chez les plantes :** La voie principale d'absorption des ETM chez les plantes reste la diffusion au niveau du cortex racinaire. Ainsi, les ETM pénètrent passivement à travers la paroi cellulaire selon une différence de gradient de concentration. Néanmoins une faible quantité de ces ETM peut y accéder par adsorption de l'acide polygalaturonique (pectines), (Briat et Lebrun, 1999). Les mécanismes exacts impliqués semblent plutôt mal connus, en effet, ils varient selon l'espèce métallique ; si par exemple le Pb et Ni utilisent la voie passive (protéines : porine), le Zn et le Cu utilisent plutôt un type de transport actif (protéine de transport spécifique) Kabata–Pendias and Pendias, 2001). Par ailleurs, bien que le transport actif soit le principe spécifique, certains cations toxiques (Cd, Pb, Cu par exemple) sont des compétiteurs potentiels de cations essentiels en empruntant leurs canaux spécifiques (cas du Cd qui semble être un compétiteur du calcium en empruntant les canaux calciques membranaires (Greger, 1999; Sanita di Toppi and Gabbrielli, 1999), ainsi 70% du Cd entrerait dans la racine par ce biais. Une fois à l'intérieur de la plante les ETM sont pris en charge par des agents complexants (acides organiques, acides aminés et divers peptides : citrate, acide polyaminocarboxylique, etc...); (Foy *et al.*, 1978). Cette forme de translocation est dépendante de chaque espèce métallique.

Après translocation, les plantes accumulent les ETM parfois à des concentrations assez importantes qualifiant ses plantes de "type accumulatrices" (Brooks, 1998). Ainsi on a pu recenser une seule espèce bio accumulatrice pour le cadmium. Arrivé au niveau des cellules, les ETM sont captés par différentes molécules afin de les stocker et éviter ainsi tout dommage cellulaire (Boyd 1998).

## **2- Le stress.**

### **2.1. Définition :**

Le stress étymologiquement, le terme "stress" provient du latin "Stringer" : mettre en tension. Le terme stress définit autant la situation subie par l'organisme, que l'état dans lequel se trouve ce dernier ; trois catégories d'agents stressants sont définies par Iwama *et al.*, 2004. Ils distinguent les stress environnementaux,

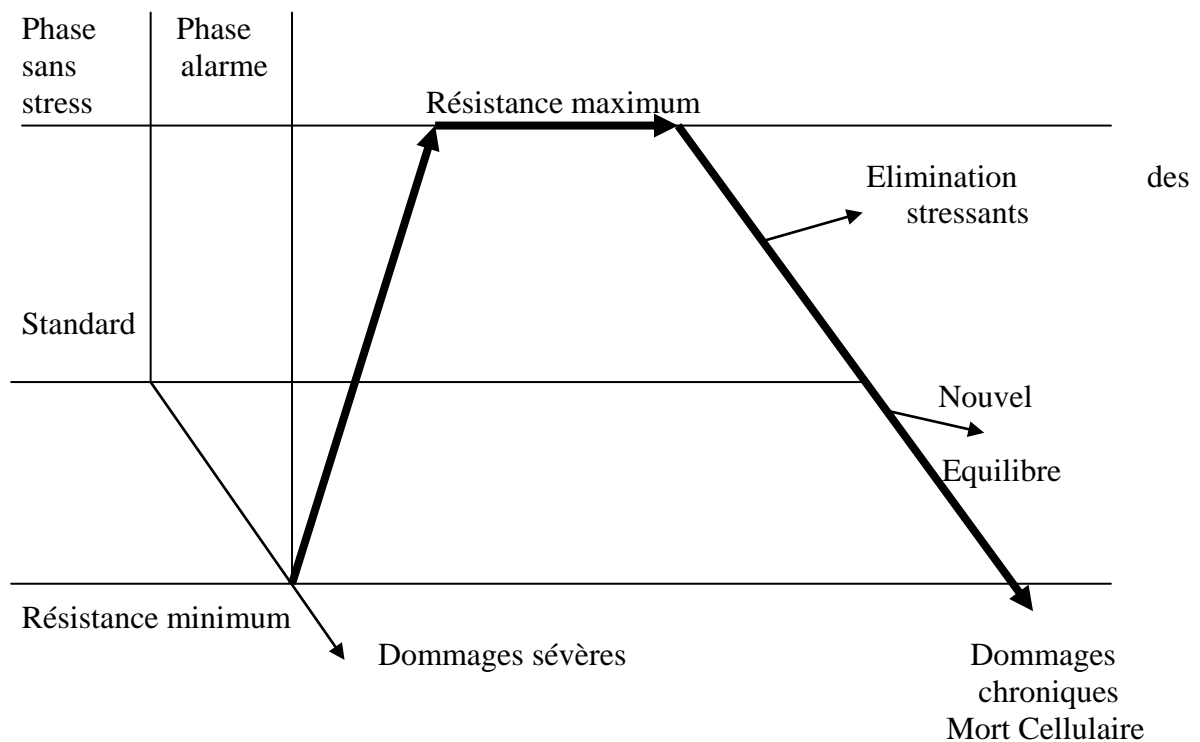
physiques et biologiques. Pour les premiers, la présence de substances polluantes telles que les métaux ou des pesticides sont source de stress. Toutefois, des changements importants des paramètres qualitatifs de l'eau comme le pH, la salinité, l'oxygène dissous, la température etc... peuvent également engendrer un état de stress. Les agents physiques regroupent les manipulations des organismes, le confinement ou le transport. Enfin les agents dits biologiques concernent les différents agents pathogènes ou encore une possible hiérarchisation au sein de la population.

Les agents stressants sont ressentis comme agréables ou non, ils induisent une agression ou une tension sur un organisme. Cette agression provoque une réaction/réponse de l'organisme (biologique) pouvant mener à une adaptation. Ainsi un état de stress peut donc être défini comme étant une lutte menée par un organisme afin de s'adapter à une nouvelle condition environnementale. Les spécialistes en biologie définissent le stress comme un facteur environnemental potentiellement défavorable pour un organisme vivant. (Si les limites de tolérance et les capacités d'adaptation sont dépassées, il en résulte des dommages irréversibles menant parfois à la mort).

Dans le cas d'une plante, la réponse au stress obéit à 4 phases (Lichtenthaler, 1998). En effet, si des paramètres environnementaux sont modifiés, la plante peut entrer dans une phase dite phase d'alarme, pendant laquelle elle répond avec une diminution d'un ou de plusieurs fonctions physiologiques, telles la photosynthèse, le transport des métabolites ou encore la capture d'ions. Ainsi la plante dévie de son homéostasie et perd sa vitalité. Dans certains cas l'espèce en fonction ne possède pas ou peu de mécanismes de tolérance, là alors des dommages assez graves peuvent apparaître assez rapidement. Durant cette phase la plupart des végétaux activent des mécanismes de résistance au stress telles les modifications de flux métabolique, une activation des processus de réparation, ou encore des adaptations morphologiques et métaboliques.

Cette phase est suivie par une deuxième appelée Phase de résistance durant laquelle la plante établit un nouvel équilibre physiologique qui améliore sa résistance. En cas de durée assez longue du stress, la plante entre dans une troisième phase dite Phase d'épuisement pendant laquelle les processus de résistance mis en jeu sont saturés.

Une quatrième phase peut parfois être mise en évidence dans le cas où le stress est diminué ou complètement supprimé: c'est la phase dite de régénération, durant cette phase la plante établit un nouvel équilibre physiologique. Toutes les phases sont représentées sur la figure 1.



**Figure 1.** Différentes phases induites chez une plante suite à une exposition à un xénobiotique (d'après Lichtenthaler, 1998).

Ainsi une plante soumise à une modification de son environnement va d'abord avoir une réaction immédiate pendant laquelle des transformations physiologiques vitales vont être mises en place pour maintenir l'homéostasie de la plante. Durant son stress continu, la plante active d'autres mécanismes qui vont

augmenter sa tolérance au facteur stressant, c'est ce que les scientifiques nomment l'acclimatation.

**2.2. Acclimatation :** Souvent, soumis à un stress, les organismes sont capables d'activer des mécanismes qui leur permettent d'augmenter leur résistance vis-à-vis du xénobiotique en question, (Prosser, 1991). Back, (2003), définit l'adaptation comme étant "tout caractère d'un organisme qui augmente statistiquement son fitness par rapport à d'autres individus d'une population". Ainsi une plante qui s'adapte à son environnement (modifié) est une plante qui a toutes les caractéristiques (génome) lui permettant de mieux se comporter dans cet environnement.

2.3. Niveaux de réponse des plantes aux xénobiotiques : On peut distinguer deux niveaux de réponse au stress : une première réponse qui peut être physiologique et une seconde réponse cellulaire. (Iwama *et al.*, 2004). Ses deux niveaux de réponse peuvent intervenir en présence d'un seul xénobiotique ou plutôt un groupe de xénobiotiques ou encore à un stress en général.

Le premier effet des métaux lourds chez les plantes est une inhibition de la croissance suivie d'autres dysfonctionnements comme la chlorose foliaire, lésions névrotiques, jaunissement, dessèchement des feuilles etc... toutes ces modifications résultent de la genèse d'un stress oxydatif dû à une production accrue de ROS (Reactive Oxygen Species) dont les fonctions principales sont l'inhibition de l'activité enzymatique perturbation de la photosynthèse et la respiration, oxydation de protéines, altération des membranes cellulaires via la peroxydation des lipides, apparition de cassures de l'ADN conduisent à la mort cellulaire (Devi and Prasad, 1999; Dietz *et al.*, 1999, Cheng, 2003).

Pour faire face à ces phénomènes, des systèmes de stockage ou de détoxification des métaux sont mis en jeu. Trois d'entre eux semblent prépondérants : la modification de la perméabilité membranaire, qui permet de

réduire l'entrée des métaux lourds dans la cellule, le système anti-oxydant qui limite les dégâts des ROS et la chélation intracellulaire qui empêche l'activité du métal.

**2.3.1. La barrière plasmique :** la membrane plasmique peut jouer le rôle de barrière pouvant limiter l'accumulation des ions toxiques (Lasat, 2002), et ce soit en modifiant l'ensemble des flux ioniques soit en utilisant des systèmes ultra spécifiques qui permettent un flux ionique qui ne transporterait pas les ions toxiques (Meharg, 1993). Cependant cette première barrière physiologique constitue une cible privilégiée des composés métalliques. Ainsi le cuivre par exemple est capable d'endommager la membrane par oxydation des protéines membranaires (peroxydation lipidique) (Dietz *et al.*, 1999) ou inhibition des ATPases, (Meharg, 1993). Par conséquent, l'imperméabilité n'est plus assurée et les métaux lourds diffusent librement (Kabata-Pendias et Pendias, 2001). Il apparaît clairement que la tolérance pourrait être due en partie à un renforcement de la protection de l'intégrité membranaire.

Parallèlement à tout cela, un rôle important est joué par les protéines associées au plasmalemmes : il concerne le transport des métaux lourds à travers la membrane plasmique, (Eide *et al.*, 1996). Ses transporteurs pourraient être non spécifiques d'un seul métal et seraient alors capables de transporter d'autres métaux lourds (transporteur du fer qui pourrait interagir avec le cuivre et le cadmium, (Briart et Lebrun, 1999). Ce type de compétition par exemple entre différents ions divalents pourrait causer une déficience du fer à l'origine de signes visibles de chlorose, (De Vos *et al.*, 1992).

En conclusion, la tolérance pourrait être due d'une part à la protection de l'intégrité membranaire et d'autre part à la protection des protéines associées au plasmalemmes, tels que les transporteurs, les canaux ioniques et les pompes à protons.

**2.3.2. Les systèmes antioxydants des plantes :** Les systèmes anti-oxydants jouent un rôle primordial vis-à-vis des Métaux Lourds ayant traversés la membrane cellulaire ; ils interviennent dans un phénomène appelé: Détoxification.

Les différents états d'oxydation des métaux lourds confèrent à ces derniers une capacité importante de production de ROS. Les cations des éléments (Fe, Cu, Cr ou Mn) sont capables de céder un ou plusieurs électrons pouvant réduire l'oxygène et ses dérivés; c'est le cas de la réaction de Fenton qui conduit en présence du Fer Ferreux à la réduction du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) en radical hydroxyle ( $\dot{O}H$ ) et en anion hydroxyle ( $OH^-$ ). Les radicaux libres possèdent chimiquement un électron célibataire qui confère à la molécule une très forte réactivité. Le produit de la réaction est le radical hydroxyde  $\dot{O}H$  qui est un puissant agent oxydant.

De plus, le métaux existant sous un seul état d'oxydation (Cd et Ni) sont capables d'induire une accumulation de ROS en raison de la perturbation de certaines voies métaboliques, une inactivation et un "down régulation" des enzymes du système anti-oxydant ou un épuisement du stock de molécules de faible poids moléculaire (glutathion; vit.E; caroténoïdes) présentant des capacités antioxydantes (Sanita di Toppi and Gabrielli,1999).

La production de ROS est sous le contrôle du système antioxydant, en effet, trois activités enzymatiques sont primordiales dans le phénomène de Détoxification des ROS: Il y a les SOD (Superoxyde-Dismutase), les CAT (Catalase) et les POX (Peroxydases). Les enzymes conduisent toutes à la formation d'eau et d'oxygène moléculaire. Ainsi les SOD sont responsables de la dismutation de l'anion superoxyde en  $H_2O_2$ . Selon la nature du métal en jeu on distingue les SOD-Mn (Manganèse) localisés principalement dans les mitochondries, les SOD-Cu/Zn, localisés au niveau du cytosol et les SOD-Fe, localisés dans le chloroplaste. Les catalases (CAT) sont plutôt localisées dans les peroxysomes et dans le cytosol.

Elles interviennent en synergie avec les SOD car elles catalysent la réduction du  $H_2O_2$  en  $H_2O$  et en oxygène moléculaire.

Les peroxydases (POX) réduisent l' $H_2O_2$  en eau et  $O_2$  avec cependant une différence importante dans leur mode de réaction : en effet, les POX nécessitent pour leur activité un substrat tels l'ascorbate ou le glutathion (GSH), (Noctor and Foyer, 1998; Foyer and Noctor, 2000).

Parallèlement à ses systèmes enzymatiques, d'autres mécanismes de détoxification des métaux lourds existent chez les plantes : la Chélation et la compartimentation cellulaire. Actuellement, la détoxification des métaux lourds est pour une grande partie assurée par la chélation (présence de ligands organiques assurant une complexation des métaux lourds).

Parmi tous ces groupes intracellulaires de ligands, quatre sont importants : Les MT ou les Méthallothionéines qui sont des protéines très riches en cations métalliques (Cu et Zn) et en résidus cystéine (30%). Les MT sont directement impliquées dans certains mécanismes de tolérance notamment vis-à-vis du Cadmium, (Murphy and Taiz, 1995). Ainsi il est actuellement établi que la surexpression de gènes MT est accompagnée d'une augmentation de la tolérance à certains métaux lourds, (Misra and Genamu, 1989; Riordan et Vallee, 1991; Roesijadi, 1992; Klaassen *et al.*, 1999). Cependant, la synthèse des MT n'est pas spécifique des M.L. mais peut aussi avoir lieu sous l'action de chocs thermiques ou sous l'effet d'hormones. Ceci suggère que les MT ne constituent guère des réponses spécifiques aux métaux lourds, d'ailleurs, il a été montré que les organismes hyperaccumulateurs ne se distinguent pas par leur richesse en MT.

Parallèlement aux MT, un deuxième groupe de ligands (chélateurs) est présent chez les plantes : ce sont les PC ou phytochélatines. Ses protéines sont riches en cystéine et leur synthèse est stimulée par la présence de métaux lourds. Les PC ont cette particularité d'être synthétisées par une phytochélatine synthase à

partir d'un précurseur : le glutathion. L'activité PC synthase est constitutive chez les plantes (De Knecht *et al.*, 1992; Zhu *et al.*, 2003).

La troisième étape de ligands est représentée par les acides organiques tels les acides dicarboxyliques (malique) ou tricarboxyliques (citrique). Tous ces acides interviennent dans les phénomènes de bioaccumulation et leur synthèse est fortement stimulée en présence des métaux lourds chez les plantes, ils pourraient servir de transporteurs xylémiens des métaux lourds des racines vers les parties aériennes de la plante. Il sont parfois même directement impliqués dans les mécanismes de tolérance; (Harrington *et al.*, 1996; Mc Grath, 1997).

Un dernier groupe de ligands est constitué par les acides aminés libres (proline, cystéine etc...) qui sont capables de s'accumuler lors de stress métallique (Kramer *et al.*, 1996; Bert, 2000).

Concernant la compartimentation, le phénomène constitue la voie la plus fréquente d'explication du processus de tolérance vis-à-vis des métaux lourds. Ainsi plusieurs groupes de transporteurs protéiques interviennent dans ce phénomène tels les GTP (Zn) dépendants de la présence de Mg et qui permettent la détoxification du zinc (Chardonens *et al.*, 1999). Chez d'autres plantes le cadmium se lie au PC pour former des complexes de faible masse moléculaire (Low Molecular Weight – LMW) qui s'accrochent les uns aux autres pour donner lieu à des complexes plus volumineux et de masse plus élevée: les High Molecular Weight ou (HMW) dans la vacuole. La variation du pH vacuolaire va provoquer la dissipation des HMW et les différents ions seraient pris en charge par les acides organiques présents (malate, oxalate, ...) (Sanita di Toppi and Gabriella, 1999).

Parallèlement à tous ses systèmes de défense au stress métallique, d'autres mécanismes existent chez les plantes parmi eux les transporteurs membranaires (type pompe ATPasique) spécifique du cadmium et qui seraient capables de stimuler des afflux des ions métalliques à l'extérieur des cellules (Briat, 1999); ou

encore les systèmes responsables d'accumulation des métaux dans les feuilles âgées qui juste avant l'abscission accumuleraient des quantités importantes de métaux lourds. Ainsi Dahmani-Muller *et al.*, (1999) montre que les quantités de ML accumulées chez des feuilles âgées sont parfois 8 fois supérieures à celles rencontrées chez les jeunes feuilles. Cela suppose que les ML sont transportés des feuilles vertes et jeunes (photosynthèse active) vers les feuilles âgées (sur le point de tomber) préservant ainsi la photosynthèse tout en détoxifiant la plante; (Salt *et al.*, 1995).

Les plantes sont aussi pourvues d'un autre système de défense qui utilise ce qu'on appelle les protéines de choc thermique ou (HSP), qui comme l'indique leur appellation, sont impliquées dans le stress lié à un choc thermique. Il semblerait que ces mêmes protéines soient impliquées aussi dans le phénomène de tolérance des plantes aux ML. En effet, le stress protéotoxique (dénature les protéines) est capable d'induire les HSP ce qui permet à la cellule de réparer les dommages protéiques occasionnés soit par mésolabilisation des agrégats, soit par ménaturation des polypeptides ou dans le cas où cela devient impossible, par l'orientation des protéines dénaturées vers les voies de dégradation; (Banzet *et al.*, 1998; Newman *et al.*, 1994).

Un dernier système de défense existe au niveau des plantes, c'est la voie de la biosynthèse de l'éthylène (Djebar et Moreau, 1990). Ainsi cette voie serait stimulée par la présence de ML (Cd). L'Ethylène stimulerait la lignification (en tant que messenger) capable de limiter les flux de métaux lourds dans les systèmes vasculaires et accélèrent la réponse anti-oxydante par réduction de l'activité ascorbate-peroxydase, ainsi que la synthèse de MT (Sanita di Toppi and Gabrielli, 1999; Remon *et al.*, 2005).

### **3. LE CADMIUM**

**3.1. Etymologie et description générale:** le cadmium a été découvert à Göttingen (Allemagne) en 1817 par Friedrich Stromeyer à partir d'impureté dans le carbonate

de zinc. En fait, le mot cadmium vient du mot latin "Cadmia" ou grec "Kad meia", c'est le nom ancien de la colamine car le cadmium s'élabore partir de fusion de la "smithsonite" ou calanine qui signifie carbonate de zinc (American mineralogist, 1980).

Le cadmium est un élément métallique blanc argenté, d'éclat métallique, brillant mais qui se ternit, il est malléable ductile, sa pression de vapeur est assez élevé et il n'a d'odeur ou de goût définis. Les principales caractéristiques physico-chimiques du cadmium sont résumées ci-dessous dans le tableau 2:

**Tableau 2.** Caractéristiques physico-chimiques du cadmium.

Nombre atomique	48
Masse atomique relative	112,411 g mole <sup>-1</sup>
Masse volumique	8,7g cm <sup>3</sup> à 20°C
Rayon ionique (+2)	0,097 nm
Configuration électrique	[Kr] 4d <sup>10</sup> 5 S <sup>2</sup>

**3.2. Origine et Fabrication :** Le cadmium est un élément relativement rare et n'existe pas naturellement à l'état actif. Il est présent dans la croûte terrestre à des concentrations d'émission à 1 ou 2 ppm où il est principalement associé aux minéraux de zinc. Il est obtenu comme sous produit de traitement du zinc ou de raffinage du plomb et du cuivre (Richburg, 2000). Il se trouve aussi relargué près des mines de fonderies de ces métaux (Lu, 1992).

En général, le cadmium est présent à l'état isomorphe dans la quasi-totalité des minerais de zinc, il est fréquemment rencontré à l'état de sulfure (Greemockite Cds) comme impureté dans le minerai de zinc appelé sphalésite (Zns). Il se trouve dans l'environnement comme un minéral combiné à d'autres éléments tels que

l'oxygène (oxyde de cadmium), le chlore (chlorure de cadmium) ou le soufre (sulfure et sulfate de cadmium) (Bourrelier *et al.*, 1998).

Le cation métallique  $\text{Cd}^{++}$  est un accepteur d'électrons dits mous car il est très polarisable, et très électro négatif (Chappuis, 1991). C'est un accepteur intermédiaire capable de former des complexes stables avec des molécules renfermant des atomes donneurs tels que l'oxygène, l'azote ou le phosphore mais il a plus d'affinité vis-à-vis des atomes de soufre. Il se manifeste presque toujours à l'état divalent (CSHPF, 1996).

**3.3. Utilisations :** En raison de ses propriétés physico-chimiques, le cadmium est principalement utilisé pour la métallisation des surfaces, comme revêtement anticorrosif des métaux, dans la fabrication des accumulateurs électriques, des batteries alcalines, des stabilisateurs pour les matières plastiques et des alliages dans l'industrie automobile (Pichard, 2000).

Ses principaux composés minéraux tels que l'oxyde, le chlorure, le bromure, le nitrate, le cyanure, le sulfure et le séléniure servant à la fabrication des bâtons de soudure, des fusibles, des cellules photos électriques, des semi-conducteurs, de substances luminescentes (luminophores des écrans de télévision) et dans l'industrie électronique (Viala, 1998). Ils sont employés également dans la fabrication de fongicides pour pelouses de golf, des huiles à moteurs, des miroirs spéciaux et des écrans de protection des réacteurs nucléaires (Popescu *et al.*, 1998, Viala, 1998).

**3.4. Sources de contamination :** Le Cadmium atmosphérique provient de rejets, dans la nature, des activités industrielles telles les aciéries, les raffineries, les mines, les fonderies de zinc, de plomb, de cadmium, la fabrication de pigments ainsi que les huiles à moteurs et pneumatiques (Pichard, 2000). La combustion des fuels et du charbon, l'incinération intempestive des déchets et les engrais phosphatés constituent des sources importantes des émissions atmosphériques de cadmium

(Günter, 2000; Viala, 2000). Nriagu, 1989. Toutes ces émissions se retrouvent dans 3 principaux compartiments que sont l'air, l'eau et le sol, parallèlement d'importants transferts peuvent se faire entre eux. La source de cadmium retrouvée dans l'environnement provient des activités humaines: c'est une source indirecte.

Dans les terres arables, le cadmium provient des engrais phosphatés, des boues d'épuration et des rejets industriels. Les dépôts atmosphériques ajoutent une fraction infime aux couches supérieures du sol (de Meeûs *et al.*, 2002). Le Cadmium s'accumule à un taux annuel de 0,1 à 0,2% dans les terres arables (NU, 2000). Dans les anciens états d'Allemagne par exemple, le cadmium entre à des valeurs de 2 à 35g/ha/an (Günter, 2000).

Dans l'eau, le cadmium provient du lessivage des sols, des décharges industrielles et du traitement des effluents industriels. Dans l'eau potable, le Cadmium peut également provenir des tuyaux de distribution (Pichard, 2000). La distribution du Cadmium entre les différents composés se trouvant dans l'eau est appelée spéciation. Celle-ci dépend essentiellement de la salinité mais aussi du pH, du potentiel oxydant et des ligands potentiels- En eau douce, le cadmium existe très peu sous forme de chlorure et pour un pH inférieur à 8,0. L'espèce dominante est l'ion  $Cd^{2+}$  Par contre plus la salinité augmente et plus il se lie avec  $Cl^-$ . Ainsi dans de l'eau de mer 35,5‰, pH 8,2, moins de 1% du cadmium est présent sous forme ionique alors que plus de 98% est présent sous forme de chlorure. Cette spéciation du cadmium en fonction de la salinité est importante car il est généralement admis que seule la forme ionique  $Cd^{2+}$  peut être accumulée par les organismes (Sunda *et al.*, 1978, Gutkrech, 1983). Ce phénomène explique, du moins en partie, pourquoi le Cadmium est plus toxique et s'accumule davantage chez les organismes acclimatés à de l'eau douce que chez les organismes acclimatés à l'eau de mer (Wright, 1977, Frank et Robertson, 1979, Hall et Anderson, 1995).

### 3.5. Devenir du Cadmium dans l'environnement :

- Dans l'air, le Cadmium est présent sous forme particulaire la principale forme étant l'oxyde de Cadmium. Ses composés sont stables au contact de l'air et ne subissent pas de réaction de dégradation ou de transformation. En fait, le Cadmium et ses composés ne sont pas ou très peu volatiles (Pitchard, 2000).

- Dans le sol, le Cadmium a tendance à s'accumuler dans les horizons supérieurs du sol riches en matières organiques en particulier dans la rhizosphère. Dans les sols, le Cadmium existe sous forme soluble dans l'eau du sol,  $\text{CdCl}_2$ ,  $\text{CdSO}_4$  ou sous forme complexes insolubles inorganiques ou organiques avec des constituants du sol. Sa solubilité est essentiellement fonction du pH du sol et de la teneur en bases échangeables.

Dans les sols acides ( $\text{pH} < 6$ ) le Cadmium est très mobile donc peu accumulé tandis qu'à pH +/- basique ( $\text{pH} > 6$ ) le Cadmium s'attache aux hydroxydes de fer, d'aluminium et de manganèse. Sa biodisponibilité augmente ainsi que sa fixation sur les plantes (Günter, 2000).

Les formes ou espèces chimiques majeures du cadmium trouvées dans les sols et les solutions du sol sont :  $\text{CdS}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{CdCl}^-$ ,  $\text{Cd OH}^-$ ,  $\text{Cd HCO}_3^-$ ,  $\text{CdCl}_3^-$ ,  $\text{CdCl}_4^-$ ,  $\text{Cd(OH)}_3^-$ , et  $\text{Cd(OH)}_4^-$  (Fifield et Haines, 1995).

En milieu aquatique, le Cadmium est relativement mobile et peu être transporté sous forme de cations hydratés ou de complexes organiques ou inorganiques (Pitchard, 2000). Les espèces chimiques majeures du Cadmium trouvées dans les eaux naturelles sont :  $\text{CdCl}^-$ ,  $\text{CdCl}_2$ ,  $\text{CdCl}_3^-$  et  $\text{Cd}^{++}$ .

Les métaux lourds se retrouvent dans l'eau, l'air, les sols, les sédiments et par conséquent les plantes, les animaux et les poissons, trois éléments de l'alimentation humaine. En fait l'alimentation reste la source majeure d'exposition aux ETM, elle fournit plus de 90% du Cadmium pour les non fumeurs (Opecst,

2001). Selon un ordre d'importance décroissant de la part prise par la contamination par le Cadmium il y a les légumes et les fruits (environ 30%) tels que laitue, épinard, carotte, brocoli, chou, (Farago, 1994; Bouniais, 1999) et Pomme de Terre qui sont, en raison de leur consommation pondérale importante, les principaux vecteurs du Cadmium alimentaire. En plus, les abats (5,5%) la charcuterie (2,71%) les fromages et les produits laitiers (18,5%) et les produits à base de céréales (16%) et les poissons (2,6%); (CSHPPF, 1996 et Opecst, 2001).

### **3.6. Toxicité et bioaccumulation du Cadmium :**

- Chez l'homme : En plus des sources environnementales, les principales causes d'exposition au Cadmium sont l'alimentation et le tabagisme (Opecst, 2001), la fumée d'une cigarette pourrait en apporter à l'organisme de 0,1 à 0,2 $\mu$ g (Viala, 1998). La vaisselle décorée et mal cuite est une autre source de Cadmium. La toxicité professionnelle se manifeste surtout dans les fonderies (Lu, 1992). Le Cadmium pénètre dans l'organisme principalement par voie respiratoire et par voie digestive avec l'alimentation et l'eau de boisson (Viala, 1998). Après ingestion, les symptômes observés sont : un épisode de gastro-entérite avec des crampes épigastriques, des vomissements, des diarrhées et des myalgies. L'effet émétique du Cadmium pourrait expliquer la faible mortalité par voie orale (Pitchard, 2000). L'inhalation de vapeurs de fumées concentrées ou de poussières de Cadmium peut être à l'origine d'une pneumopathie pouvant constituer un œdème aigu du poumon (Viala, 1998) et évoluer vers la mort dans 15 à 20% des cas (Pitchard, 2000).

Le Cadmium peut être responsable d'une hépatite aiguë cytolytique appelée hépatite toxique vraie conduisant à la nécrose hépatique. La toxicité chronique du Cadmium s'explique par le transport de ce dernier dans le sang en étant fixé à l'hémoglobine ou aux métallothionéines (Pitchard, 2000). Ces dernières sont impliquées dans la fixation sélective du Cadmium, sa concentration dans le foie et dans le rein et dans son transport du foie vers le rein. Le Cadmium se retrouve aussi dans le pancréas, la glande thyroïde, les testicules, les glandes salivaires et le placenta (CSHPPF, 1996; Pitchard, 2000). Le Cadmium est excrété principalement

dans l'urine et fèces et en quantité négligeable par les phanères. En raison de la lenteur de l'excrétion, il possède une durée de vie biologique de l'ordre de 20 à 30 ans (Pitchard, 2000). Des troubles respiratoires sont essentiellement liés aux effets irritants de particules de Cadmium, notamment la fumée de cigarette et l'oxyde de Cadmium. Ils correspondent à une diminution des fonctions respiratoires, de l'odorat, la survenue de rhinite, de bronchite et d'emphysème consécutif à la destruction des alvéoles pulmonaires (Lu, 1992). Dans les milieux professionnels, l'altération de la fonction pulmonaire se manifeste après une vingtaine d'années d'exposition (Pitchard, 2000).

Le Cadmium peut aussi affecter le métabolisme osseux en perturbant celui du calcium. Le premier signe caractérisant l'ostéopathie est la "dent jaune" qui est une dépigmentation jaune de l'émail à partir du collet des dents, elle apparaît après quelques semaines d'exposition au Cadmium (Viala, 1998). Après une dizaine d'années, l'intoxication chronique entraîne l'ostéomalaxie, l'ostéoporose avec des douleurs osseuses intenses. Ces troubles constituent une partie de la maladie de "Itai-Itai" des japonais par suite de la contamination hydrique et alimentaire (le riz contaminé). Ces atteintes osseuses sont observées surtout dans les pays industrialisés (Lu, 1992; Pitchard, 2000).

Enfin, il est probable que le Cadmium soit à l'origine des neuropathies périphériques après exposition aux cours des activités professionnelles (Pitchard, 2000). Il est également considéré comme agent immunosuppresseur (Lu, 1992).

- Chez l'animal : Chez les animaux, le Cadmium possède une toxicité aiguë variable en fonction de sa forme chimique, de l'espèce étudiée et de la voie d'exposition. Ainsi par voie respiratoire, en particulier par inhalation d'oxyde de Cadmium, les rongeurs apparaissent plus sensibles que les lapins et les chiens beaucoup plus sensibles que les singes. Dans ce cas, le  $Cl_{50}$  varie entre 0,5 et 15g  $Cd/m^3$ . Lors de l'exposition par voie orale, les souris ont une  $Dl_{50}$  entre 0,05 et 0,89g  $Cd/m^3$  dépendante de la forme chimique du Cadmium. Chez les rats, la  $Dl_{50}$

se situe dans l'intervalle [0,1 – 3,89]g Cd/Kg (Pitchard, 2000). Chez le rat, une seule injection d'un sel de Cadmium peut engendrer, dans quelques heures, des désordres métaboliques en particulier hépatiques (Casalino *et al.*, 2000) et thyroïdiens (Pavia Junior *et al.*, 1997). Enfin d'après Pitchard (2000) le Cadmium peut exercer une action tératogène lors d'exposition aiguë. Concernant la toxicité chronique du Cadmium, chez certains espèces d'oiseaux, celui-ci s'accumule à des taux significativement élevés dans leur foie, leur rein et à des taux moins importants dans leurs muscles, leur cerveau ainsi que dans leurs plumes (Saeki *et al.*, 2000 et Dauwe *et al.*, 2002).

Dans le milieu aquatique, le Cadmium s'accumule dans les mollusques (Giguère *et al.*, 2003), dans les poissons et certains mammifères marins (Bustamante *et al.*, 2003). Il affecte la croissance des poissons, inhibe leur assimilation du calcium et altère leur fonction hépatique (Almeida *et al.*, 2001). Chez les rongeurs, l'ingestion chronique de 50 ppm de Cadmium aboutit à son accumulation dans les yeux en altérant les taux des ETM essentiels (Arvidson, 1986, Jamall et Roques, 1990). Le Cadmium est aussi responsable de la diminution des taux plasmatiques des hormones thyroïdiennes T<sub>3</sub> et T<sub>4</sub> (Yoshizuka *et al.*, 1991, Fujita, 1992) H. comme il peut entraîner chez (les souris et les poulets) une augmentation de la peroxydation lipidique (Gupta et Kar, 1998 et 1999, Yiin *et al.*, 1999).

- Chez les végétaux : Le coefficient du transfert sol- plante du Cadmium est de l'ordre de 1 à 10, celui-ci est assez grand par rapport aux autres ETM (Alloway, 1997) ; ce qui explique que le Cadmium n'est pas seulement biodisponible mais son excès empêche la plante de s'enrichir des oligo-éléments (Chappuis, 1991).

En général, le Cadmium induit une perturbation du contrôle homéostatique qui se traduit par des altérations morphologiques et physiologiques pouvant entraîner la mort du végétal lorsque la teneur en cadmium atteint un seuil critique.

Le transport des ETM par les plantes débute par les racines où cela dépend des formes chimiques dissoutes dans les solutions du sol (ionique, chélatées ou complexées), du pH, de la température, de l'aération ainsi que la présence d'autres ions, la matière organique et les potentiels redox. Elle dépend, aussi de l'espèce et l'âge de la plante (Fifield et Haines 1995).

Dans la rhizosphère, le Cadmium est absorbé sous forme d'ions par les cellules épidermiques avec l'eau et les minéraux. En traversant les cellules du cortex, le Cadmium est transporté jusqu'au système vasculaire par un transport symplastique, puis à travers l'endoderme jusqu'au xylème (Farago, 1994). Ce dernier passage est tout à fait similaire à un mouvement de soluté traversant un milieu poreux (Prasad, 1995). Chez certaines espèces, le Cadmium peut être retenu dans les vacuoles des cellules racinaires influençant, ainsi son transport symplastique radial vers le xylème et sa translocation vers la partie aérienne (Stolt *et al.*, 2003). Dans l'avoine, le Cadmium est transporté à partir du cytoplasme vers la vacuole en traversant le tonoplaste au moyen d'un antiport  $Cd^{++}/H^{+}$  (Cobbett 2000).

Le Cadmium peut également être assimilé par les feuilles en deux phases la première est non métabolique (passive) où le cadmium traverse la cuticule par diffusion ; la deuxième étant métabolique (active) est caractérisée par le passage du Cadmium à travers la membrane plasmique vers le protoplaste. Williams *et al.*, (2000) ont pu identifier trois classes de transporteurs membranaires de nature protéique jouant aussi un rôle vital dans l'homéostasie des ETM dont le Cadmium fait partie ce sont : métaux lourds- ATPase (CPx-type), N RAMP (Natural Resistance Associated Macrophage Protein) et le CDF (Cation Diffusion Facilitator). En outre, d'après Cobbett (2000), les phytochélatons ont eux aussi une activité de transporteurs de Cadmium vers les vacuoles.

### **3.7. Localisation de l'accumulation du Cadmium chez la plante :**

L'accumulation d'un métal lourd dans les plantes est une stratégie importante d'adaptation ; laitue et épinard dotés de cette capacité sont considérés comme étant des hyper accumulateurs de cadmium en raison des grandes teneurs détectées dans leurs feuilles.

Plusieurs études réalisées sur différentes espèces végétales montrent une accumulation du cadmium soit dans les racines de certaines plantes (Leita et *al.*, 1991, Bounias, 1992; Chakravarty et Srivastavo, 1997, Hegedüs *et al.*, 2001, Vitoria *et al.*, 2001, Iannelli *et al.*, 2002, Zhang *et al.*, 2002; Ekvall et Greger, 2003), soit dans la partie aérienne (tige et feuille) chez d'autres (Klang-Westin et Perttu, 2002; Peralta-Videa *et al.*, 2002). Chez l'ail, le cadmium est localisé dans les vacuoles et les noyaux des cellules corticales des racines (Liu and Kottke, 2003); d'autres travaux l'ont localisé dans les vacuoles et le cytoplasme et non pas dans les parois des cellules épidermiques des racines, Chakravarty et Srivastavo, 1997). En fait des analyses de bois de certains angiospermes et gymnospermes ont montré que le Cadmium s'accumule principalement dans leurs xylèmes (Prasad, 1995).

**3.8. Effet du Cadmium sur la germination et la croissance :** L'impact du Cadmium sur la germination et la croissance est variable selon l'espèce végétale et la concentration du cadmium à laquelle, elle est exposée. La germination et la croissance racinaire de la carotte, de radis et de pois sont inhibées à une concentration de 20mg Cd/l, (Chugh et sawhney, 1995, Chen *et al.*, 2003). Lorsque la teneur en Cadmium atteint 1,5 mg/Kg, la germination et la croissance des grains de riz sont significativement inhibées , (Bounias, 1999). Les faibles concentrations de cadmium (5 à 10  $\mu$ M) engendrent une inhibition de la croissance du maïs (Rauser, 1987) et une réduction de celle de l'haricot (Chaoui *et al.*, 1997) tandis que chez le poivrier, l'inhibition de la croissance n'est significative qu'à des concentrations supérieures à 0,125mM de cadmium (Léon *et al.*, 2002). Néanmoins, Schiitzendübel *et al.*, (2002) ont détecté une stimulation de la croissance racinaire à 5 $\mu$ M de cadmium chez le peuplier. En général, la réduction

de la production de biomasse et de la qualité nutritionnelle est observée dans les récoltes cultivées dans les sols contaminés avec de faibles teneurs en métaux lourds (Öncel *et al.*, 2000 ; Chen *et al.*, 2003). De même le cadmium affecte la production de biomasse (Mendelsohn *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2003) est réduit le rendement (Leïta *et al.*, 1991). Cependant, l'étude de Klang-Westin et Perttu (2002) a montré une augmentation dans la biomasse de deux clones de Salix (saule) qui résultait de l'utilisation de fertilisants renfermant du cadmium.

**3.9. Effet du Cadmium sur la photosynthèse :** Le Cadmium est un inhibiteur effectif de la photosynthèse (Farago, 1994, Prasard 1995, Chugh et Sawhney, 1999, Szalontai *et al.*, 1999, Chen *et al.*, 2003). Dans le poivrier, il inhibe significativement la photosynthèse à la concentration de 0,125Mm (Léon *et al.*, 2002). Le cadmium inhibe la biosynthèse de la chlorophylle dont la teneur totale est réduite (Hegedüs *et al.*, 2001) ainsi que le rapport chlorophylle a/b. En fait cette diminution dans la teneur en chlorophylle totale est observée ainsi dans les algues vertes (*Englena gracilis*). Dans l'orge le cadmium affecte l'étape finale de la formation de la chlorophylle en inhibant la photochlorophyllide réductase (Farago, 1994).

Le Cadmium peut interagir avec la protéine du complexe collecteur de la lumière (LHC-II) (Chugh et Sawhney, 1999) comme il altère le contenu de la plante en acide gras spécifique (phosphatidyl glycérol Trans. hexadécénoïque) considéré comme étant responsable de l'oligomérisation du complexe chlorophyllien.

En plus, le cadmium inhibe la transpiration d'une part, par la fermeture des stomates qui deviennent plus résistants y compris à l'absorption du CO<sub>2</sub>, de même l'infection des mésophiles aboutit à la réduction de la photosynthèse (Prasard, 1995); d'autre part, l'inhibition de la transpiration et due à la réduction de la croissance des cellules foliaires et de la surface des feuilles. *In Vitro*, l'exposition des chloroplastes d'épinard isolés à 10µM de cadmium entraîne une inhibition de

62% de la fixation du CO<sub>2</sub> tandis qu'*in vivo* l'inhibition enregistrée n'est que de 34% lorsque la concentration du cadmium atteint 450µM.

Au niveau des biomembranes, il a été démontré que le cadmium n'a pas d'effets sur les constituants lipidiques et protéiques (Szalontai *et al.*, 1999) ni d'interactions avec les réactions photochimiques du système membranaire des thyllocoïdes (Prasad, 1995). Le transport des électrons semble, aussi insensible au cadmium.

Diverses études réalisées sur les algues, la tomate et l'haricot montrent que le photosystème II est la première cible du cadmium (Krupa *et al.*, 1993, Skorzynska-Polit et Baszynski, 1997) alors que Szalontai *et al.*, 1999 ont montré que le Cadmium n'a pas d'effets significatifs sur le photosystème. En effet, le PS II des chloroplastes isolés et exposés à 0,1mM de cadmium est inhibé à 46% (Chugh et Sawhney, 1999). Cependant, selon les mêmes auteurs l'activité du PSI est aussi altérée.

Au niveau métabolique, plusieurs réactions du cycle du Calvin sont inhibées, le site d'action du Cadmium étant l'étape de la carboxylation et/ou la phase régénérative de ce cycle; par conséquent, le métabolisme des carbohydrates est perturbé, (Costa *et al.*, 2002) ainsi que d'autres activités métaboliques telles que la phosphorylation, la production et les besoins en ATP (Farago, 1994).

**3.10. Effet du Cadmium sur la respiration :** Le Cadmium est connu comme inhibiteur de la respiration et de certaines enzymes particulières telles que les enzymes NADH-dépendantes, le complexe de cytochromes bc<sub>1</sub> et la succinate déshydrogénase (Kessler et Brand, 1994 b). Des études réalisées durant les années 70 ont révélé *qu'in Vitro* plusieurs ions métalliques sont des inhibiteurs effectifs du transport électronique dans la chaîne respiratoire mitochondriale dont le dernier (NADH-oxydase) serait spécifiquement inhibé par le cadmium.

*In Vivo*, le cadmium simule la respiration des plantules de soja, cet effet attribué à la production d'ATP par phosphorylation oxydative, est dû à la réduction photophosphorylation (Farago, 1994). Cependant, d'autres études ont porté sur l'impact du cadmium sur la respiration des mitochondries de pomme de terre par Kessler et Brand (1994 a et b). Elles révèlent une modification de la régulation de la phosphorylation oxydative donc du taux de respiration à des concentrations supérieures à 20µM. Elles démontrent que le cadmium inhibe l'oxydation des substrats, la synthèse de l'ATP et toute la chaîne respiratoire. Par contre, le cadmium stimule la fuite des protons à travers la membrane mitochondriale et il a un effet négligeable sur les réactions de phosphorylation.

En 1995, Chugh et Sawhney ont montré que le cadmium inhibe l'activité respiratoire des grains de pois en phase de germination à partir de 0,25mM et il l'abolit totalement à 1mM. Selon Prasad *et al.*, (2001), le cadmium affecte la respiration et tous les échanges de l'oxygène d'une plante aquatique vasculaire (*Lemna Frisulea* L.) à des concentrations supérieures à 5 mM.

**3.11. Relation Cadmium – Eau sur le plan racinaire :** Le cadmium réduit l'absorption et le transport de l'eau (Gouia *et al.*, 2000) vers les autres parties de la plante; cette perturbation est due principalement à la réduction de la croissance racinaire et elle entraîne une dégradation de la paroi cellulaire dans le xylème et une perte d'éclat de toute la plante.

Généralement, le cadmium réduit la tolérance des plantes envers le stress hydrique à la suite d'une diminution de l'élasticité: des parois cellulaires en aboutissant à une perte de turgescence ; chez le blé dur, le cadmium réduit le potentiel d'eau ainsi que le potentiel de turgescence sans affecter la teneur relative en eau (Milone *et al.*, 2003). En fait, le cadmium influe sur la transpiration par action sur le flux d'eau à travers les racines beaucoup plus que son effet sur l'ouverture des stomates.

**3.12. Effet du Cadmium sur les enzymes :** Le Cadmium exerce sa toxicité sur les enzymes par oxydation des groupements sulfhydryle (SH) nécessaires pour l'activité catalytique ou par substitution des autres cations divalents dans les métalloenzymes (Farago, 1994).

- Effet inhibiteur : *In Vitro* le Cadmium inhibe l'activité de certaines enzymes telles que la malate déshydrogénase de *Silene cucubulus*, la NADPH-oxydoréductase et certaines enzymes du cycle de calvin comme la glycéraldéhyde-3-P-Kinase et la ribulose-5-P-Kinase dans les protoplastes des mésophiles de *Valerianella Locusta* (Farago, 1994) ; ainsi que l'activité des enzymes du chloroplaste : la rubisco d'orge, la fructose 1-6 diphosphate carboxylase, la phosphorubilo kinase, l'anydrase carbonique du soja et de la protochlorophyllide réductase.

Chugh et Sawhney, (1995) montrent que les  $\alpha$  et  $\beta$  amyloses des graines de pois, inhibées dans une solution contenant 0,25mM de cadmium sont inhibées à partir du 3<sup>ème</sup> jour. Chez l'haricot, le cadmium inhibe l'activité du glutamate synthèse et la nitrate réductase (Gouia *et al.*, 2000).

Dans les feuilles de tournesol, les activités de l'ornithine décarboxylase et l'arginine décarboxylase sont inhibées par le cadmium, de même que la diamine oxydase dans les feuilles de blé (Groppa *et al.* , 2003).

- Effet stimulateur : le Cadmium stimule la malate déshydrogénase de soja et celle de l'haricot, l'arginine décarboxylase et l'ornithine décarboxylase dans les feuilles de blé ainsi que la  $Mg^{2+}$  ATPase des membranes plasmiques des pousses de riz après application de 0,5mM de cadmium pendant 10 jours. Cette même enzyme est inhibée dans les racines de maïs ; *In Vitro*, dans les racines de *Agrostis tenuis*, ceci est dû à l'inhibition compétitive du  $Mg^{2+}$ -ATPse en réduisant la concentration du substrat Mg-ATP (Farago, 1994).

Chez l'haricot, le Cadmium stimule aussi certaines enzymes telles que la glutamate déshydrogénase, la glucose-6-P-déshydrogénase, l'isocitrate déshydrogénase et certaines enzymes hydrolytiques comme la ribonucléase, la désoxyribonucléase et la phosphatase acide (Prasad, 1995).

**3.13. Effet du Cadmium sur certains paramètres biochimiques :** Les perturbations enzymatiques imputables au cadmium s'expriment dans la plante par l'accumulation et/ou la réduction de certains paramètres biochimiques dont quelques uns sont connus comme étant bio marqueurs de stress. Chez l'haricot, des concentrations de 1 à 2,5mM le Cd (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> réduisent légèrement le poids du (PS) des tiges et significativement celui des racines tandis que cet effet ne devient remarquable dans les feuilles qu'à des concentrations supérieures à 2mM (Leita *et al.*, 1991). Les travaux de Costa et Morel (1994) montrent une diminution du PS chez une culture cellulaire de lupin traitée par 0,1µM de Cd NO<sub>3</sub>. Öncel *et al.*, (2000) de leur part ont montré que CdCl<sub>2</sub> augmente le pourcentage du PS des racines et des tiges du blé tendre à des concentrations supérieures à 0,1mM; résultats contradictoires avec ceux obtenus par Zhiang *et al.*, (2002).

Concernant les produits métaboliques, d'une part, le cadmium augmente la teneur de certains tels que : le raffinose, le mannose et l'hydroxyproline dans une culture cellulaire de lupin traitée par 1µM de Cd NO<sub>3</sub>. Chez le blé le cadmium augmente la teneur en phénols totaux et la proline libre à des concentrations supérieures à 0,1mM de CdCl<sub>2</sub>, ainsi que la teneur en putrescine et la production d'éthylène dans les feuilles. L'accumulation de la proline libre a été observée aussi dans les racines de la carotte et de radis à des concentrations supérieures à 20mg/Kg de CdSO<sub>4</sub> (Chen *et al.*, 2003).

D'autre part, le cadmium induit la diminution de la teneur en putrescine et en spermidine dans les feuilles de tournesol ainsi que la teneur en spermine dans les feuilles de blé.

**3.14. Cadmium et stress oxydatif :** Le stress oxydant est représenté par les dommages au niveau des membranes cellulaires et subcellulaires dues aux interactions des formes réactives de l'oxygène (ROS), issus du métabolisme respiratoire avec les acides gras insaturés des membranes qui se transforment en produits hydroperoxydes pouvant promouvoir une chaîne de réactions avec les autres constituants de la cellule. Ces réactions sont appelées "peroxydation lipidique". Dans les conditions normales le taux de production des formes réactives "ROS" est faible. Néanmoins, les cellules végétales en milieu aérobie sont pourvues d'un système antioxydant efficace, comprenant plusieurs mécanismes enzymatiques et non enzymatiques dont l'induction ou l'inhibition, utilisées en tant que bio marqueurs du stress oxydant (Lagadic *et al.*, 1997).

Les ETM connus comme ayant une grande affinité pour les groupements sulfhydryle et carboxyle à cause des propriétés physico-chimiques de leurs cations, peuvent induire une peroxydation lipidique des membranes et un stress oxydant directement ou indirectement. L'effet indirect est à l'origine des interactions des métaux avec les processus biochimiques d'oxydoréduction.

**3.15. Peroxydation lipidique et effet sur les membranes :** Des études "*in vivo et in vitro*" ont montré que le cadmium est "un stresseur oxydant" ; il augmente l'activité de la peroxydation lipidique, dans tous les organes de la plante, même à des concentrations modérées (Chaoui *et al.*, 1997; Piquears *et al.*, 1999; Shah *et al.*, 2001).

**3.16. Bio marqueurs non enzymatiques du stress oxydant :** Certains biomarqueurs indiquent qu'il y a stimulation de la peroxydation lipidique, cas de l'accumulation de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans les racines du peuplier exposé à 50µM de cadmium (Schützendubel *et al.*, 2002) et dans une culture cellulaire de tabac By2 traité par 0,5mM de cadmium (Piquears *et al.*, 1999). L'augmentation de la teneur en peroxydes lipidiques et en anions superoxydes a été observée chez le riz exposé à 0,5mM Cd (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (Shah *et al.*, 2001).

Le malonyldialdéhyde (MDA) principal biomarqueur s'accumule dans les feuilles de riz, dans celles de l'orge traité par 1 et 5mM de cadmium (Wu *et al.*, 2003) et dans les racines de la carotte et du radis à des concentrations supérieures à 20mg/Kg de CdSO<sub>4</sub>.

- Peroxydases (POD) : L'induction des peroxydases en particulier le gâicol-peroxydase et l'ascorbate-peroxydase a été observée dans les feuilles et les racines de différentes espèces végétales cultivées en présence de cadmium (Sbartai *et al.*, 2008). C'est le cas de la laitue, du poivrier traités par 0,5mM Cd (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (Léon *et al.*, 2002) ou encore la tomate (Sbartai, 2008). Il en est de même pour certaines céréales telles que le riz, l'orge (Hegedüs *et al.*, 2001) et le blé dur (Milone *et al.*, 2003).

Chez certaines légumineuses comme le soja, l'augmentation de l'activité des peroxydases et de certains enzymes hydrolytiques sous l'effet du cadmium constitue une réponse de sénescence accélérée. Chez l'haricot, l'induction des peroxydases par le cadmium est associée avec l'apparition de deux isoenzymes anioniques dans les racines et les feuilles primaires (Lagadic *et al.*, 1997).

Néanmoins, le cadmium peut inhiber l'activité des peroxydases dans d'autres espèces végétales comme le peuplier les racines et les cultures de carotte et de radis exposées à des concentrations allant de 20 à 100mg/Kg Cd SO<sub>4</sub> (Chen *et al.*, (2003). Cette inhibition a été testée par Key Hani *et al.*, (2003) après incubation de la peroxydase de raifort dans 1mM cadmium. Les résultats obtenus affirment que le cadmium peut être un inhibiteur non compétitif ou un inhibiteur mixte de l'enzyme qui change de conformation après liaison avec 3 ions de Cd<sup>2+</sup>. En fait, le Cadmium inhibe 50% de la peroxydase du raifort à une concentration égale à 4,17mM (ISMAL, 1970).

- Superoxyde dismutase (SOD) : Comme les peroxydases, le superoxyde dismutase est stimulé dans les feuilles de nombreuses espèces végétales telles que le riz, l'orge, le tabac. Selon Vitoria *et al.*, (2001) plusieurs isoenzymes de superoxyde dismutase apparaissent dans les feuilles de radis après exposition du chlorure de

cadmium. Les superoxydes dismutases peuvent être inhibées sous l'effet du cadmium dans le peuplier, les graines de mangue et dans les racines et les feuilles de blé dur (Milone *et al.*, 2003). Leur activité est légèrement déprimée chez le poivrier.

D'après Lagadic *et al.*, (1997) le cadmium inhibe presque complètement l'activité de CuZn-SOD chez l'haricot à cause de la déficience de zinc induite par le cadmium et cela sans affecter l'activité totale de superoxydes dismutases.

- Catalase (CAT) : L'induction de cet enzyme a été observée dans les feuilles et les racines de radis, chez le riz et dans feuilles d'orge (Wu *et al.*, 2003). Par contre l'activité de la catalase est inhibée par le cadmium dans les feuilles de haricot, les graines de mangue, le peuplier et les racines et radis (Chen *et al.*, 2003).

**3.17. Effet du Cadmium sur le cycle du glutathion :** La stimulation du glutathion réductase a été notée chez le poivrier traité avec 0,5 mM CdCl<sub>2</sub> (Léon *et al.*, 2002) et dans les feuilles et les racines de radis accompagnée de l'activation du cycle de l'ascorbate-glutathion afin d'assurer la disponibilité de ce dernier (Vitoria *et al.*, 2001).

Par contre chez les racines de maïs (Rauser, 1987) la concentration du glutathion diminue. Ce résultat explique Farago (1984) est dû à la formation des complexes stables par le cadmium avec le glutathion ce qui perturbe l'interconversion de sa forme oxydée vers la forme réduite en diminuant ainsi le taux de cet antioxydant dans les cellules.

- Production de phytochelatation (PC) : La production de PC en présence de cadmium coïncide avec la diminution des taux de GSH (Cobbett, 2000). En fait le Cadmium est meilleur activateur de la synthèse des PC *in Vitro*. Chez le riz, la serine-PC est la forme prédominante de PC des plantes exposées au cadmium (Stolt *et al.*, 2003).

Au niveau cellulaire, une fois à l'intérieur de la cellule, le cadmium active la métabolisme du soufre et la production de PC (Liu et Kottke, 2003) ensuite il se lie aux groupements thiols des résidus cystéine des PC en formant des complexes stables (PC-Cd) qui sont 1000 fois moins toxiques pour les enzymes de la plante que l'ion libre  $\text{Cd}^{2+}$ . Les complexes PC-Cd sont transportés et séquestrés dans les vacuoles où le cadmium se détache des PC et se lie à des acides organiques tels que le citrate et malate. Enfin, les PC libres retournent vers le cytoplasme afin de fixer d'autres ions cadmium (Liu et Kottle, 2003).

Cependant le fait qu'il y a des espèces végétales sensibles au cadmium revient au déficit en PC syntaxe. Cette déficience naturelle a été observée chez *Vigne angularis* dont les racines sont plus sensibles à des concentrations  $< 10\mu\text{M}$  de cadmium, par contraste avec la tomate, comme espèce tolérante au cadmium en accumulant des taux considérablement élevés de PC (Inouhe *et al.*, 2000, Sbartai *et al.*, 2008).

#### **4. Le Calcium:**

Le Calcium est un élément très abondant dans les sols et il est rare de trouver des sols déficients en cet élément (Farago, 1994). Sa teneur dans la croûte terrestre est de l'ordre de 35g/Kg (Chappuis 1991). Le Calcium est en outre un oligo-élément très important pour la vie des végétaux ; son déficit peut aboutir à des malformations des parties en croissance.

**4.1. Teneur en calcium intracellulaire :** Dans les plantes supérieures, le calcium peut constituer 10% du poids sec avec des fruits matures. Sa teneur dans les cellules est relativement grande mais la majorité (60%) est soit liée aux parois cellulaires, (Farago, 1994) soit stockée dans les divers organites (Alberts *et al.*, 1999). En fait il y a un total de 1- 2mM de calcium principalement lié à des protéines et à d'autres substances qui ne peuvent pas quitter la cellule. La concentration du  $\text{Ca}^{2+}$  libre est maintenue basse au voisinage de la cellule, 100 nM

(Alberts *et al.*, 1999; Callen, 1999; Robert et Roland, 1998 et White, 2000) par rapport à celle du liquide extracellulaire; 1-2mM, alors qu'elle est de l'ordre de 0,1-100mM dans le réticulum endoplasmique, dans la paroi et dans la vacuole. Les vacuoles des cellules matures sont les principaux stocks et la source majeure du calcium intracellulaire (White, 2000; Sanders *et al.*, 2002).

Le Calcium se trouve aussi combiné avec des acides organiques comme l'acide oxalique, qui est un métabolite toxique soluble converti en oxalate de calcium ( $\text{COO}_2$ ) Ca insoluble et cristallin (Farago, 1994) par cristallisation spontanée en présence de l'air  $\text{Ca}^{2+}$  (Robert et Roland, 1998). Les oxalates de calcium sont localisés le plus souvent dans les vacuoles en particulier celles des parenchymes et des tissus conducteurs. Chez certaines espèces, le calcium peut être sous forme de cristaux de calcite ( $\text{CO}_3$  Ca) dans les parois de divers bois ou sous forme d'accumulations pariétales de carbonate de calcium Ca ( $\text{HCO}_3$ )<sub>2</sub>.

**4.2. Rôles du Calcium :** Le Calcium est le composant le plus connu des voies de transduction des signaux. Dans les plantes supérieures, le Calcium est considéré comme un second messager couplé à une gamme très large de stimuli extracellulaires abiotiques (lumière, température, contact, sécheresse, stress hyperosmotique et stress oxydant) ou biotiques (hormones, acide abscissique ABA, Gibbèrelline et les facteurs de modulation), (Geisler *et al.*, 2000; White, 2000; Sanders *et al.*, 2002). Il peut par conséquent activer et contrôler plusieurs processus cellulaires tels que l'élongation, la division cellulaire, le métabolisme, le transport et la sécrétion.

Les signaux extracellulaires provoquent un changement transitoire et rapide de  $\text{Ca}^{2+}$  cytoplasmique à cause de l'ouverture transitoire de canaux ioniques perméables au calcium dans les systèmes membranaires permettant le passage de  $10^6$  ions  $\text{Ca}^{2+}$  par seconde et par canal générant ainsi un signal calcium. Ce dernier est un flux de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le sens décroissant de son gradient électrochimique. Il déclenche des modifications au niveau des protéines cytoplasmiques par effet

indirect réalisé par d'autres protéines de transduction.

Parmi les protéines cytoplasmiques, la plus ubiquiste est la calmoduline qui après liaison au  $\text{Ca}^{2+}$ , modifie sa conformation et devient capables de se lier à une grande variété de protéines cibles ; ceci résulte de la modification de leurs activités. La calmoduline est présente aussi dans la membrane plasmique et les sphères endomembranaires (Geisler *et al.*, 2000).

L'expression des stress environnementaux sur la plante entière, en particulier les stress ioniques dépend du calcium qui affecte rigoureusement la perméabilité de la membrane cytoplasmique Le calcium peut avoir aussi un rôle dans l'assemblage correct des protéines au niveau du réticulum endoplasmique (Geisler *et al.*, 2000).

**4.3. Transport du Calcium :** Le Calcium pénètre dans les plantes passivement et seulement par les bouts des racines. Les mouvements transmembranaires de calcium sont assurés par des canaux perméables au  $\text{Ca}^{2+}$  (CPC) intégrés dans les membranes grâce auxquels le gradient électrochimique du calcium libre est maintenu (Collen, 1999) d'où l'héméostasie du  $\text{Ca}^{2+}$  (White, 2000).

**4.3.1. Canaux Perméables au Calcium (CPC) :** Les CPC sont localisés dans la membrane plasmique, le tonoplaste, le réticulum endoplasmique, le chloroplaste et la membrane nucléaire (Sanders *et al.*, 2002). Les CPC ont été envisagés selon des approches électrophysiologiques biochimiques et moléculaires (White, 2000). Selon leurs activités et leur dépendance du voltage, les CPC sont classés dans 3 catégories

- CPC activés par dépolarisation de la MB (DACC).
- CPC activés par hyperpolarisation de la MB (HACC).
- CPC insensibles aux voltages.

**4.3.1.1. Les DACC :** Ils sont présents dans les cellules racinaires, feuilles et cultures cellulaires. Ils induisent l'augmentation de  $\text{Ca}^{2+}$  cytoplasmique mais leur action dépend de la dépolarisation de la MB plasmique. Ils jouent un rôle dans la croissance des poils absorbants et l'acclimatation des plantes aux variations thermiques (White, 2000).

**4.3.1.2. Les HACC :** Ils règlent la turgescence, les stomates et la traduction des stress mécaniques. Ils jouent un rôle dans le maintien de la polarisation des systèmes en croissance (Sanders *et al.*, 2000). Ils peuvent aussi être stimulés par  $\text{H}_2\text{O}_2$  aboutissant à l'augmentation de  $\text{Ca}^{2+}$  cytoplasmique, alors que leur activité diminue lorsque le milieu extracellulaire devient acide : de pH 7 à pH 5 (White, 2000).

**4.3.1.3. CPC de la vacuole :** Ils sont situés au niveau de la MB vacuolaire, certains sont voltage dépendants et les autres sont ligand-dépendants (Sanders *et al.*, 2002).

**4.3.1.4. Canaux voltage-dépendants :** Il existe 2 types : des canaux dépendants de la dépolarisation de la membrane et des canaux dépendants de son hyperpolarisation : Ils sont appelés Canaux SV (Slowly Vasular Channels) ils sont activés par l'augmentation de  $\text{Ca}^{2+}$  cytoplasmique au-dessus du seuil physiologique. Les canaux SV sont perméables à  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^{2+}$ .

**4.3.1.5. Les CPC du réticulum endoplasmique :** La membrane du réticulum endoplasmique renferme deux types de CPC :

- Canaux voltage-dépendants (Sanders *et al.*, 2002).
- Canaux ligand-dépendants : inositol triphosphate (IP3), ADP ribose cyclique (CADPR) et acide adénine dinucléotide phosphate nicotinique (NAADP) (Sanders *et al.*, 2002).

**4.3.1.6. CPC de chloroplaste :** situés au niveau des thylloïdes. Ils sont perméables aux  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ . Leur rôle physiologique consiste à fournir mouvements compensatoires durant l'épuisement des protéines  $\text{H}^+$  à la lumière (White, 2000).

**4.3.1.7. CPC de la membrane nucléaire:** Ils sont activés par hyperpolarisation de la membrane lorsque  $\text{Ca}^{2+}$  dans l'espace préliminaire s'approche de  $1\mu\text{M}$  mais ils sont insensibles aux changements de  $\text{Ca}^{2+}$ , cytoplasmiques. Les CPC jouent un rôle dans la régulation des processus nucléaires (White, 2000).

**4.3.2. Les pompes à calcium ( $\text{Ca}^{2+}$  - ATPase) :** Ils appartiennent à la super famille des ATPases de type P, qui forment des intermédiaires enzymatiques phospho-aspartate durant le cycle réactionnel (Geisler *et al.*, 2000). Elles utilisent directement l'ATP pour la translocation des ions et sont dotées d'une grande affinité pour le calcium (Geisler *et al.*, 2000).

Les  $\text{Ca}^{2+}$ - ATPases permettent les variations spatiotemporelles des  $\text{Ca}^{2+}$ , maintiennent les fonctions du second messenger du calcium dans la transduction des signaux, catalysent les échanges nutritionnels et déterminent le repos physiologique de la cellule végétale (White, 2000). Ils sont responsables du maintien de l'activité de protéines impliquées dans l'adaptation au stress (Geisler *et al.*, 2000).

**2.3.3. Systèmes antiport H<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> :** Les cellules végétales utilisent principalement un gradient électrochimique transmembranaire de protons ( $\Delta P_{\mu H^+}$ ) afin de permettre le transport des solutés (Alberts *et al.*, 1999). Dans le cas du calcium, le calcium libre traverse les membranes grâce à un système d'antiport H<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> consommateur d'énergie (ATP). Les antiporteurs H<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> qui sont localisés dans la membrane plasmique et le tonoplaste (Robert et Roland, 1998; Sanders *et al.*, 2002) favorisent le transport du calcium et sa séquestration dans le compartiment endomembranaire par le maintien d'une force motrice de protons. Ceci explique les observations obtenues sur les racines de plusieurs espèces au niveau desquelles, l'absorption du Ca<sup>2+</sup> est très stimulée par l'ATP et directement liée à l'importance du gradient de pH.

Les antiports H<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> appelés aussi pompes à protons, permettent d'expulser uniquement les protons (Collen, 1999) afin de garder un pH acide dans le milieu environnant de la cellule et à l'intérieur de la vacuole et un pH neutre dans le cytoplasme.

## **5. Les interactions Cadmium/Calcium:**

Dans le sol, le cation Ca<sup>2+</sup> est un compétiteur vis-à-vis des métaux toxiques et l'augmentation de sa teneur dans la solution réduit l'absorption des métaux comme le cadmium par les plantes (Bourrelier *et al.*, 1998; Herrieche, 2004).

Des observations faites sur les racines de la betterave montrent que les effets toxiques dus à l'action du cadmium ressemblent aux symptômes du déficit en calcium (Skörzynski-Polit *et al.*, 1998).

Dans la cellule végétale, le cadmium emprunte les voies de transport du calcium et peut ainsi le déplacer. Un canal de type DACC de la membrane plasmique est bloqué par la présence de 0,1mM de cadmium dans le cytoplasme dans une culture cellulaire de tabac alors que des concentrations micromolaires de cadmium peuvent bloquer les canaux voltage dépendants du réticulum endoplasmique, ce qui perturbe l'homéostasie du calcium (Piqueras *et al.*, 1999).

## **6. Les Mitochondries:**

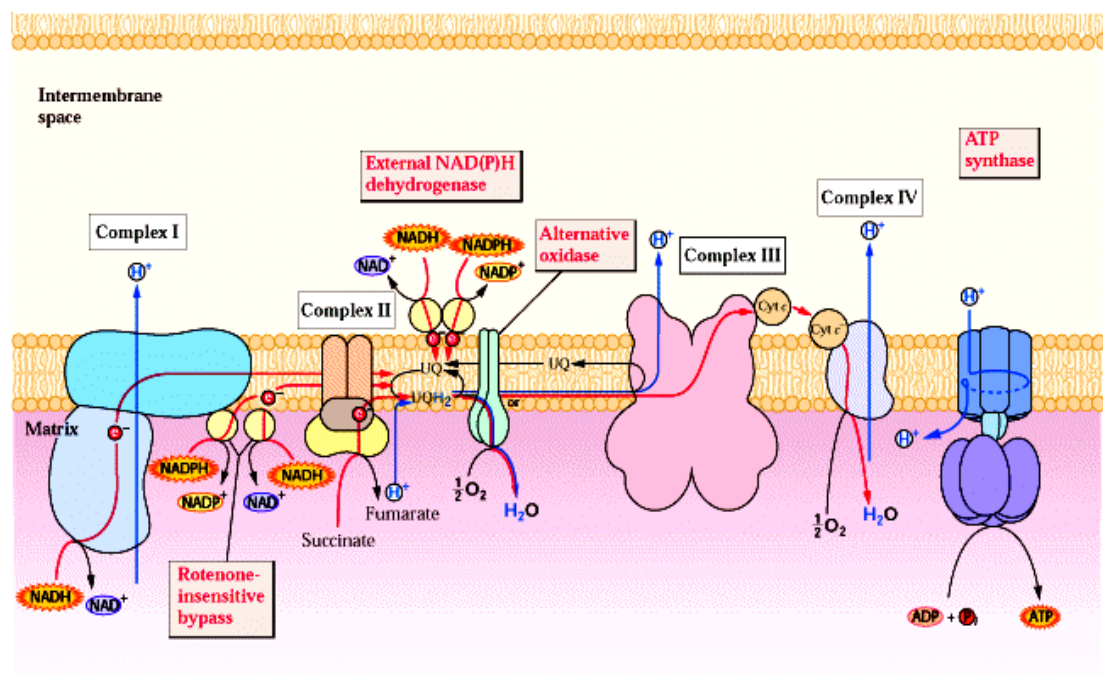
Les mitochondries sont des organites intracellulaires pourvus d'une double membrane, elles sont probablement issues d'un phénomène de symbiose entre une bactérie pourpre ( $\alpha$ -protéobactérie) et une cellule protoeucaryotique (une bactérie anaérobie sûrement proche des archaebactéries) (Gray and Doolittle, 1982). Cette symbiose permet à la cellule hôte de vivre en conditions aérobies grâce à l'acquisition de la respiration.

**6.1. La respiration mitochondriale :** La respiration aérobie est le processus de transfert des électrons du NADH ou FADH<sub>2</sub> sur l'O<sub>2</sub> moléculaire. Le NADH et le FADH<sub>2</sub> sont produits lors de la glycolyse et/ou du cycle de Krebs (ac.citrique). Ces deux mécanismes utilisent les acides organiques et autres composés résultant de la dégradation des sucres ou de l'amidon. La respiration, qui se déroule dans les mitochondries, produit un gradient de protons qui est utilisé pour la synthèse d'ATP lors de la phosphorylation oxydative.

**6.2. Glycolyse :** Ce cycle fait appel à des enzymes qui dégradent les C<sub>6</sub> en pyruvate (C<sub>3</sub>). Certaines de ces enzymes, sont fonctionnellement associées aux mitochondries végétales (Giégé *et al.*, 2003). L'oxydation des C<sub>6</sub> produit du NADH et de l'ATP. Ce pyruvate est importé dans la matrice mitochondriale.

**6.3. Cycle de Krebs :** Ou Cycle des C<sub>3</sub>, il se déroule dans la matrice mitochondriale et fait intervenir 8 enzymes. D'abord, le pyruvate est oxydé et décarboxylé par la pyruvate déshydrogénase pour former du CO<sub>2</sub>, de l'acétyl COA et du NADH. L'acétyl COA entre dans le cycle par l'intermédiaire de l'acide citrique synthase qui transfère le groupement acétyl sur l'acide oxaloacétique pour synthétiser l'acide citrique. Il s'en suit une série de déshydratation oxydations, décarboxylations qui conduisent à la régénération de l'acide oxaloacétique.

**6.4. Le Transfert des électrons :** Le transfert d'électrons a lieu au niveau de la chaîne respiratoire, localisée dans la membrane mitochondriale interne. Elle est composée de 04 complexes multiprotéiques (I à IV ; Figure 2).



**Figure 2 :** Représentation schématique de la chaîne de transfert des électrons de la membrane mitochondriale interne (Buchanan *et al.*, 2000).

Les substrats de la chaîne respiratoire sont le NADH au niveau du Complexe I et le FADH<sub>2</sub> produit au niveau du Complexe II lors de l'oxydation du succinate en fumarate. Les complexes I et II transfèrent les électrons au pool ubiquinone. Celle-ci réduite en ubiquinol achemine les électrons vers le complexe III qui les transfère vers le cyt. *c.* Au niveau du complexe IV les électrons sont utilisés pour réduire l'O<sub>2</sub>. Les transferts des électrons sont accompagnés au niveau des Complexes I, III et IV par une expulsion de protons dans l'espace intermembranaire. Le gradient de protons créé est alors utilisé au niveau du Complexe V pour synthétiser l'ATP.

**6.5. Particularités des mitochondries végétales :** Les mitochondries végétales existent dans les cellules qui contiennent des chloroplastes qui sont capables de produire de l'ATP et de nombreux substrats de la respiration. Elles ne peuvent pas fuir les stress environnementaux, et nécessitent une grande quantité de précurseurs pour la synthèse de métabolites primaires et secondaires. Elles photo respirent (Mackenzie and Macintosh , 1999). Ainsi les mitochondries végétales ont donc développé des systèmes qui permettent de court-circuiter la voie des cytochromes. Tous ces mécanismes sont très peu connus à l'heure actuelle.

**6.5.1. NAD (P) H déshydrogénases insensibles à la roténone :** En plus de la NADH déshydrogénase présente dans le complexe CI de la chaîne respiratoire, il existe au niveau de la membrane interne, 4 NAD (P)H déshydrogénases, deux "externes" (orientée vers l'espace intermembranaire) et deux "internes" (orientées vers la matrice (Moller, 2002). Ces déshydrogénases oxydent la NADH ou le NADPH et transfèrent les électrons au pool ubiquinone mais elles ne contribuent pas au gradient de H<sup>+</sup>. Les déshydrogénases "internes" ont une plus faible affinité pour le NADH que le complexe I ainsi elles ne fonctionnent que lorsque la concentration en NADH dans la matrice est élevée.

L'activité des déshydrogénases "Externes" dépend fortement de la présence du calcium. En plus ces enzymes peuvent influencer la balance redox du pool de nucléotides pyrimidiques cytoplasmiques (Le rapport  $\text{NAD(P)}^+ / \text{NAD(P)H}$ ) et ainsi elles peuvent influencer de nombreuses réactions cytoplasmiques.

**6.5.2. Voie de l'oxydase alternative :** Une voie alternative comportant une oxydase terminale qui transfère directement les électrons de l'ubiquinol à l'oxygène moléculaire est présenté dans les mitochondries végétales, d'algues, de champignons et de certains protozoaires (Vanlerberghe *et al.*, 1995).

Cette voie ne génère pas de gradient de protons, elle ne produit donc pas d'ATP mais elle a un rôle de régulation. Elle est activée lorsque la voie des cytochromes est saturée (augmentation des rapports ATP/ADP et NADH/NAD<sup>+</sup>). Normalement, des rapports ATP/ADP et NADH/NAD<sup>+</sup> trop élevés entraînent un ralentissement du cycle de l'acide citrique.

Lorsque la voie alternative est activée, elle permet d'éviter le ralentissement. Le cycle de l'acide citrique tournera donc essentiellement pour fournir des précurseurs pour la synthèse de métabolites. Ainsi, la voie alternative et le cycle de Krebs travaillent en tandem pour fournir un nombre plus important de molécules carbonées nécessaires à la plante.

**6.5.3. Importance des protéines dans les mitochondries :** Les complexes respiratoires sont composés d'un grand nombre de protéines, seules 16 sont produites dans la mitochondrie chez *Arabidopsis Thaliana* (Unseld *et al.*, 1997); les autres sont importées du cytoplasme. La mitochondrie comporte plusieurs centaines de protéines différentes. L'importation des protéines dans les mitochondries a été essentiellement étudiée chez la levure mais les mécanismes mis en œuvre semblent bien conservés dans le règne des eucaryotes (Wiedemann *et al.*, 2004).

**6.6. Implication des mitochondries dans le stress oxydatif des ROS :** La chaîne respiratoire est une source importante de ROS et de ce fait elle est impliquée dans la genèse de la plupart des pathologies. Il est estimé que dans les conditions normales 4% de l'O<sub>2</sub> consommé est incomplètement réduit en superoxyde.

Dans la mitochondrie, il existe 9 sites responsables de cette production. Parmi ces sites, les complexes I et II jouent un rôle très important dans la production de ROS (Morin *et al.*, 2004; Andreyev *et al.*, 2005).

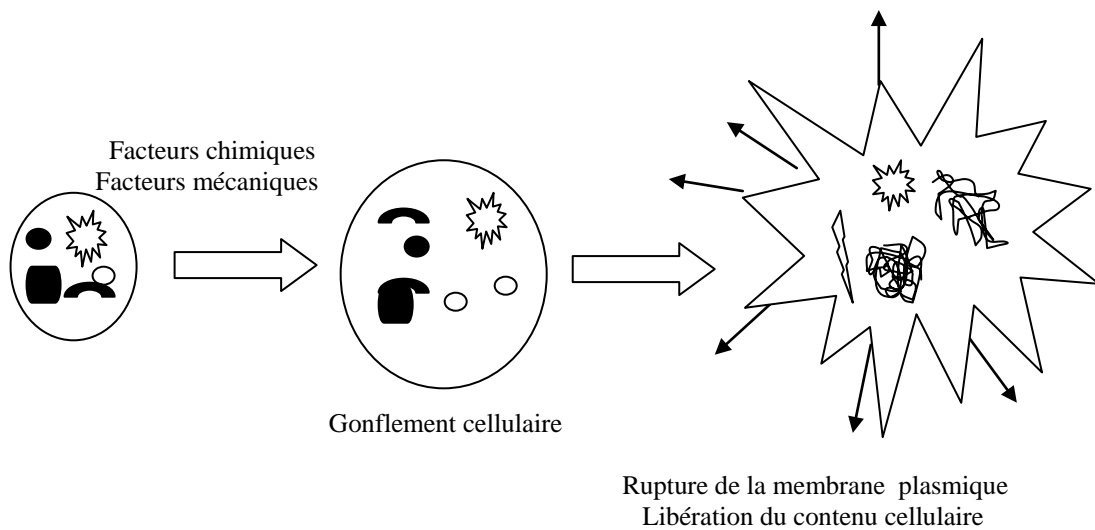
**6.7. Mitochondries, Apoptose et Nécrose :** La mort cellulaire programmée est connue comme un évènement essentiel dans le fonctionnement des organes pluricellulaires : c'est l'apoptose. C'est un processus spontané qui permet le renouvellement cellulaire, ainsi si la mitose permet le renouvellement cellulaire, l'apoptose induit la disparition des cellules, (Kerr *et al.*, 1972) ; (Vaux and Korsmeyer, 1999).

Cependant, l'apoptose indispensable au renouvellement cellulaire est dans certains cas perturbée et peut dans ces cas là conduire à la disparition de population de cellules (genèse de différentes maladies) ou carrément devenir défailante ce qui favorise l'existence de cellules anormales et conduire à l'apparition de maladies assez graves.

Il existe 2 types de mort cellulaire sur le plan biochimique et morphologique, l'apoptose et la nécrose.

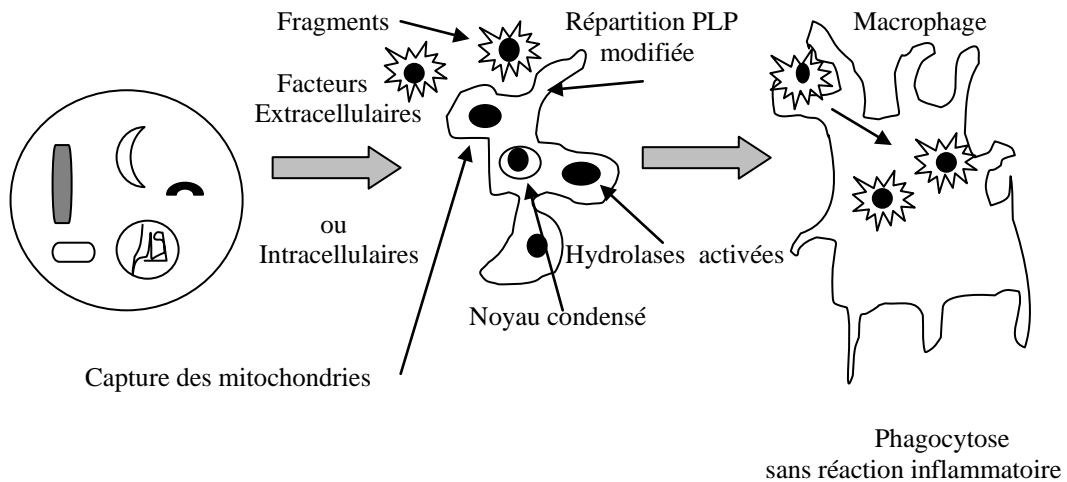
- La nécrose : Phénomène qui se traduit par la dégradation de la structure membranaire avec destruction des fonctions mitochondriales. Ainsi après rupture de la membrane plasmique (générant une destruction massive des gradients osmotiques et ioniques), l'eau et les différents électrolytes pénètrent dans la cellule ce qui provoque son gonflement accompagné d'une entrée massive des molécules extra cytoplasmiques.

Ainsi on assiste à un dysfonctionnement des mitochondries et une disparition de l'ensemble des organites cellulaires dans le cytoplasme (Figure 3). Ceci est suivi par une dégradation de l'ADN, (Dong *et al.*, 1997). Les cellules nécrosées secrètent des substances inflammatoires spécifiques des nécroses qui vont participer à la production de débris cellulaires qui seront phagocytés par les cellules immunitaires (Kagiyama *et al.*, 1989; Kroemer, 1998).



**Figure 3** : Schéma général des changements morphologiques des cellules durant la mort cellulaire par voie nécrotique.

- L'Apoptose : Phénomène de mort cellulaire spécifique et assez particulier, durant lequel, la cellule commence d'abord par s'isoler et coupe tout contact avec les autres cellules avoisinantes. Son noyau et son cytoplasme se condensent ce qui fait réduire son volume. Le cytoplasme se remplit par la suite de vacuoles et la membrane plasmique bourgeonne et se fragmente en plusieurs corps apoptotiques. (Figure 4).



**Figure 4** : Schéma général descriptif des changements morphologiques des cellules durant la mort cellulaire par voie apoptotique. [[http : medidacte.timone.univ-mrs.fr/webcours-biocell/biopath\\_cell/prion/apoptose.jpeg](http://medidacte.timone.univ-mrs.fr/webcours-biocell/biopath_cell/prion/apoptose.jpeg)].

Les corps apoptotiques sont par la suite reconnus par les phagocytes qui vont les éliminer. Durant ce phénomène assez rapide (quelques heures). La mitochondrie n'est pas lysée ce qui tend à rapprocher les 2 phénomènes apoptose et nécrose (car une cellule apoptotique peut finir en cellule nécrotique).

L'Apoptose peut être induite par divers facteurs (Facteurs de croissance, hormones, réduction, produits chimiques, xénobiotiques, ROS, etc...). Deux voies sont responsables de la transduction des signaux reçus, une voie utilise des récepteurs de la mort et une voie mitochondriale. Les 2 voies utilisent une série de familles de protéines appelées caspases qui sont responsables des altérations morphologiques de la cellule (Amara *et al.*, 2005; Lahouel, 2006; Claes, 2008).

Une troisième voie existe aussi, elle est indépendante des caspases et récemment mise en évidence. Elle implique la mitochondrie et un facteur porté par AIF (Apoptosis Inducing Factor) (Susin *et al.*, 2000; Cande *et al.*, 2002).

## **7.Objectif du travail:**

Notre travail a un double objectif. Il concerne d'une part, les effets d'un métal lourd: le cadmium sur les propriétés oxydophosphorylantes des mitochondries isolées et purifiées de Pomme de Terre et, d'autre part, l'analyse des effets du calcium vis à vis du cadmium et les éventuelles interactions pouvant exister chez les mitochondries isolées.

Le premier Chapitre de notre étude est consacré à la description des techniques qui ont été utilisées dans ce travail. Le deuxième Chapitre est consacré aux effets du cadmium sur le fonctionnement métabolique et enzymatique des mitochondries isolées. Le troisième Chapitre concerne l'étude de interactions  $Ca^{+}$  / $Cd^{+}$  au niveau mitochondriale.

Le dernier Chapitre est consacré une à discussion générale des différents résultats obtenus au cours de ce travail et à une comparaison avec l'ensemble des travaux rapportés dans la littérature et portant sur les effets des métaux lourds à l'échelle cellulaire et subcellulaire.

Dans ce chapitre, les techniques de fractionnement et de purification de la fraction membranaire sur gradient de Percoll sont décrites. Par ailleurs, au cours de ce travail, il a été fait appel à une grande diversité de techniques dans le but de caractériser les effets du Cadmium sur les mitochondries isolées et plus particulièrement ceux en rapport avec les interactions  $\text{Cd}^+ / \text{Ca}^+$ .

### **1. Matériel expérimental :**

Le travail a été réalisé sur la Pomme de Terre (*Solanum tuberosum* L., Var Binjte). Les échantillons proviennent du marché local.

### **2. Fractionnement cellulaire des tissus de Pomme de Terre :**

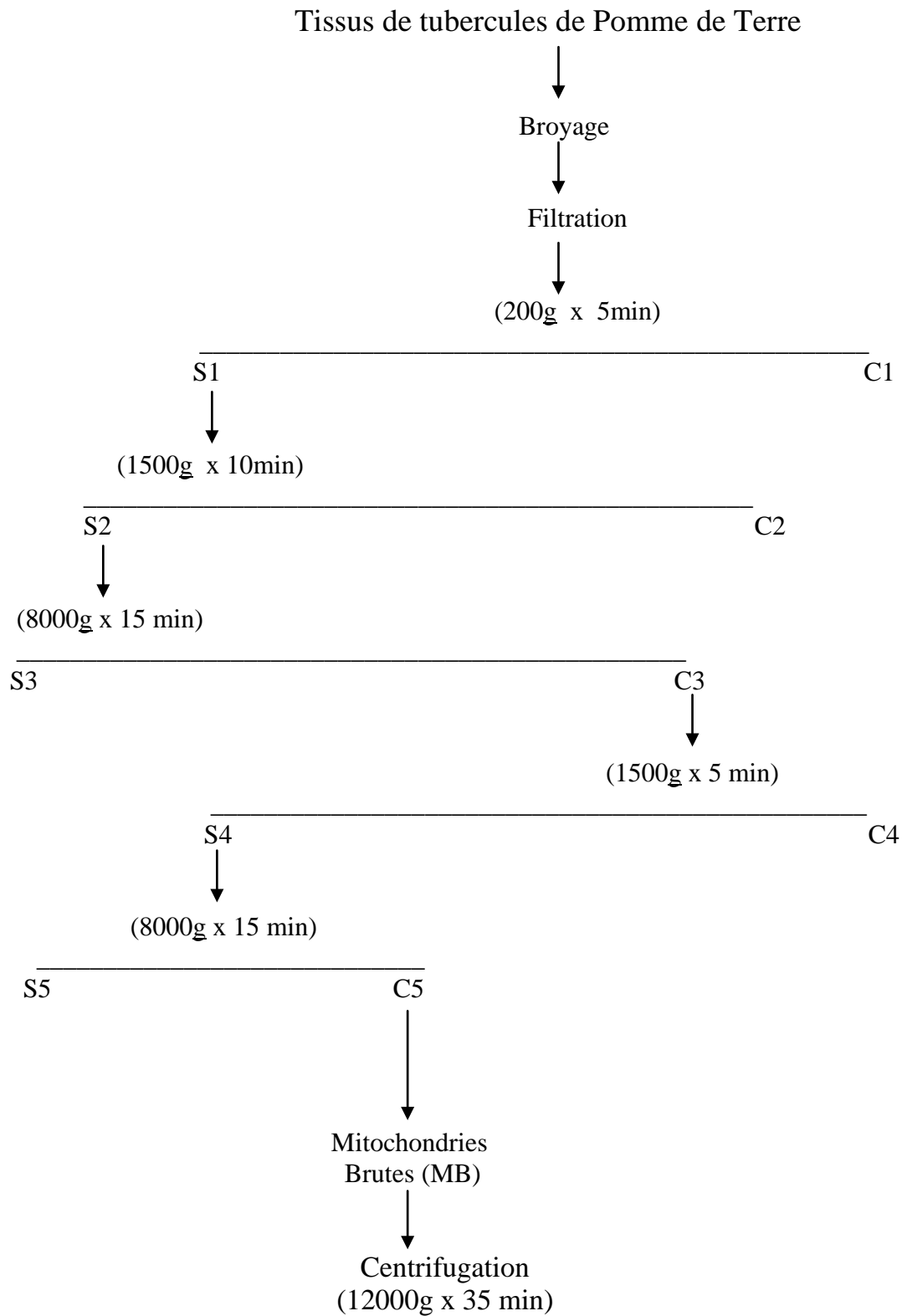
La méthode utilisée pour la préparation des mitochondries de Pomme de Terre est adaptée de la méthode décrite par Djebbar (1988); (Figure 5). Les tubercules (environ 2,5Kg) sont d'abord lavés à l'eau de robinet puis épluchés, coupés et placés dans de l'eau distillée (4°C). Le broyage est réalisé à l'aide d'une "centrifugeuse" à jus de fruits (Moulinex, type 140), permettant de recueillir le broyage dans un milieu d'extraction dont la composition finale est la suivante Mannitol 300mM, EDTA 2,5mM, cystéine  $1\text{g l}^{-1}$ , Sérum Albumine de Boeuf [SAB, fraction V Sigma]  $1\text{g l}^{-1}$ , PVP (PolyVinylPyrrolidone)  $4\text{gl}^{-1}$  et MOPS (Acide Morpholino Propane Sulfamide) 100mM, pH =7,0. Le volume final du milieu après broyage est de 2l. Après filtration sur toile à bluter, le filtrat est soumis à une série de centrifugations différentielles (centrifugeuse Sorvall rotor GSA).

Une centrifugation à faible vitesse, 200g (1500rpm) pendant 5min, permet d'éliminer les culots d'amidon. Une deuxième centrifugation à 1500g (3500rpm) pendant 10min permet de sédimenter les débris cellulaires les plus lourds. Le surnageant ainsi obtenu est centrifugé à nouveau à 8000g (8500rpm) pendant 15min. Cette centrifugation permet de séparer les mitochondries du surnageant. A ce stade, les culots de mitochondries renferment encore des systèmes membranaires contaminants (réticulum endoplasmique, peroxyosomes, etc...).

Chaque culot de mitochondries est repris dans 2ml de milieu de lavage dont la composition est la suivante : Mannitol 300mM , EDTA 1mM et SAB  $11^{-1}$ . Le milieu de lavage est ajusté à pH 7,2 avec du KOH 1N. La suspension mitochondriale est ensuite lentement homogénéisée puis centrifugée à 1500g (3500rpm) pendant 5min (Sorvall, rotor SS34). Le surnageant est alors centrifugé de nouveau à 8000g (8500rpm) pendant 10min, pour sédimenter un culot de mitochondries brutes (MB).

La purification des mitochondries de Pomme de Terre est ainsi basée sur l'utilisation d'un gradient discontinu de Percoll (15%, 25%, 35% et 70%) (Petit *et al.*, 1986). Les solutions de Percoll sont préparées dans un milieu renfermant du mannitol 300mM et MOPS 50mM (pH 7,2). Des volumes de 2,5ml, 3ml, 4ml et 3ml de chaque solution (en partant de la plus concentrée) sont soigneusement déposés dans six tubes de centrifugation. La suspension mitochondriale (environ 2ml) est ensuite déposée au sommet de chacun des gradients, puis soumise à une centrifugation de 12000g (10000rpm) pendant 35min (Spinco, rotor SW 27,2).

Trois fractions membranaires et un culot sont séparés dans ce type de gradient (Figure 6). La bande située dans la partie supérieure du gradient (interface milieu/Percoll 15%) correspond aux microsomes. La bande située en dessous (interface 15% / 25% correspond aux mitochondries cassées.



**Figure 5.** Schéma illustrant les principales étapes d'isolement des mitochondries de Pomme de Terre. C : Culot ; S : Surnageant.

<u>Percoll</u> (%)	<u>Fractions</u>
15	Microsomes
25	Mitochondries cassées
35	Mitochondries intactes
	Peroxysomes intacts
70	Peroxysomes cassés

**Figure 6** : Purification des mitochondries de Pomme de Terre sur gradient discontinu de Percoll. Après centrifugation à 12000g d'un gradient discontinu renfermant 15%, 25%, 35% et 70% de Percoll. 4 fractions peuvent être séparées. Les mitochondries intactes sont situées au niveau de la zone inférieure de Percoll 25%.

Les mitochondries intactes sédimentent sous forme d'une large bande de couleur marron (interface 25% /35%). Enfin, une fraction de peroxysomes intacts est arrêtée à l'interface 35% / 70%. (Le culot de peroxysomes est présent au fond du tube. La fraction contenant les mitochondries intactes est recueillie à l'aide d'une pompe péristaltique; Elle est ensuite diluée avec de milieu de lavage puis centrifugée à 7000g durant 10min (6500rpm, rotor GSA, Sorvall).

Les culots obtenus sont remis en suspension dans du milieu utilisé pour la mesure de la consommation d'oxygène et dont la composition est la suivante : mannitol 300mM,  $MgCl_2$  5mM, KCl 30mM, SAB  $1g\ l^{-1}$  et du tampon phosphate 10mM (pH 7,2). La suspension mitochondriale (1 à 1,5ml) est maintenue dans la glace pour être réutilisée dans les heures qui suivent.

### **3. Mesure de la consommation d'oxygène :**

La consommation d'oxygène liée à l'oxydation des substrats respiratoires (succinate, malate, NADH) par les mitochondries isolées est mesurée à l'aide d'une électrode à oxygène de Clarck (Hansatech Ltd, King's Lynn, U. K.) couplée à un micro-ordinateur Dell, auquel peut être liée une électrode à  $TPP^+$  pour les enregistrements simultanés de deux paramètres (consommation d'oxygène et potentiel de membrane).



**Figure 7** : Electrode à Oxygène.

Le milieu réactionnel renferme du mannitol 300mM , tampon phosphate 10mM (pH 7,2), MgCl<sub>2</sub> 5mM, KCL 30Mm SAB 1g l<sup>-1</sup> et 0,5 à 1mg de protéines mitochondriales ou membranaires. La cellule en verre, (Figure 7) d'un volume réglable de 1 à 2 ml est thermostatée à 25°C ± 0,02°C. La concentration initiale en oxygène du milieu d'électrode, en équilibre avec l'atmosphère est de 240µM (Estabrook, 1967).

#### 4. Mesure des activités enzymatiques :

**4.1- Catalase** : L'activité Catalase (EC.1.11. 1. 6.) :

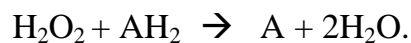


a été mesurée à l'aide d'une électrode à oxygène selon Van Ginkel et Brown (1978) dans un milieu renfermant : Mannitol 300mM, MOPS 50ml (pH 7,2) et 200 à 300µg de protéines membranaires. Le milieu est préalablement balayé par de l'azote pour réduire la concentration en O<sub>2</sub>. La réaction est alors déclenchée par addition d'eau oxygénée (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 1mM et le dégagement d'oxygène est mesuré en fonction du temps.

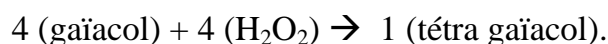
**4.2. Peroxydase** : Les peroxydases (EC. 1. 11. 1. 7.) sont des enzymes qui catalysent l'oxydation par des peroxydes de nombreuses substances jouant un rôle de donneur d'hydrogène selon la réaction générale :



Dans le cas du peroxyde d'hydrogène la réaction peut s'écrire :



Cette activité a été mesurée spectrophotométriquement par la technique de Chance et Maehly (1955), basée sur l'utilisation du gaïacol comme donneur d'hydrogène.

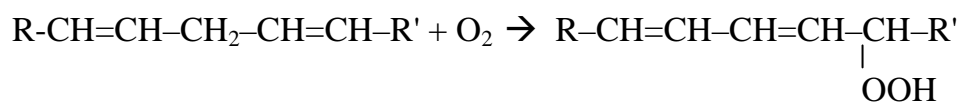


Le milieu réactionnel est composé de mannitol 300mM, MOPS 50mM (pH7,2), gaïacol 20mM et 200 à 300µg de protéines membranaires. La réaction est déclenchée par addition de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10mM et la vitesse de l'apparition du produit

coloré de la réaction est mesurée à 470nm. Pour le calcul de la vitesse de l'activité enzymatique, le coefficient d'extinction à 470nm du tétra- gaiacol est  $\Delta E = 26,6\text{mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

### 4.3. Lipoxygénase :

La lipoxygénase (EC. 1. 13. 11. 12) catalyse en présence d'oxygène moléculaire, la formation d'hydroperoxydes, d'acides gras poly insaturés, généralement à partir de l'acide linoléique (C<sub>18:2</sub>) ou linoléique (C<sub>18:3</sub>) (Dupont *et al.*, 1982) conformément à la réaction :



Cette activité a été mesurée selon la méthode de Rustin *et al.*, (1982), qui fait appel à un dosage polarographique consistant à mesurer la consommation d'oxygène due à l'oxydation du substrat de l'enzyme, l'acide linoléique, en présence de la lipoxygénase. Les fractions membranaires sont d'abord incubées en présence d'acide linoléique 2,2mM dans un milieu (mannitol 300mM, MOPS 50mM, 200 à 300µg de protéines membranaires) constamment maintenu en condition aérobie grâce à une agitation magnétique ménagée. Au cours du temps, l'acide linoléique est dégradé par la lipoxygénase contenue dans les fractions membranaires et des parties aliquotes sont prélevées régulièrement et introduites, dans la cellule de l'électrode à oxygène contenant un milieu dont la composition est la suivant : Mannitol 300mM, MOPS 50mM (pH 7,2), 400µg ml<sup>-1</sup> de lipoxygénase (Sigma, Type I, 1554, µg<sup>-1</sup> protéines).

En présence d'un large excès de la lipoxygénase dans la cellule et compte tenu des faibles quantités d'acides linoléiques présentes dans les parties aliquotes, l'acide gras est très rapidement et totalement oxydé en hydroperoxydes. On peut ainsi suivre l'oxydation de l'acide linoléique en mesurant la consommation d'oxygène à l'électrode de Clarck.

La Stoechiométrie de la réaction est égale à 1. C'est-à-dire que 1mole d'hydroperoxyde est formée par mole de substrat oxydé et 1 mole d'oxygène est consommée par mole de substrat (cf réaction ci-dessus). La consommation d'oxygène est alors proportionnelle à la quantité d'acide linoléique présente dans les parties aliquotes.

## **5. Adénosine Triphosphate (ATPase) :**

La technique utilisée au cours de ce travail est basée sur la mesure de la quantité de phosphate inorganique libéré au cours du temps. Le milieu réactionnel renferme : Saccharose 300mM, MgCl<sub>2</sub> 5mM, KCl 10mM, MOPS 5mM, (pH=8,0), ATP 2mM et 20 à 30μg de protéines membranaires dans un volume de 1ml. Le dosage du phosphate inorganique est réalisé selon la méthode de Ames, (1966). Le complexe coloré phosphomolybdate-Acide ascorbique est dosé à l'aide d'un spectrophotomètre (Jenway modèle 6300).

## **6. Mesure du Potentiel de membrane:**

La mesure du potentiel de membrane est basée sur l'utilisation du tétraphénylphosphonium (TPP<sup>+</sup>). Le TPP<sup>+</sup> est un cation lipophile pour lequel il est possible de fabriquer une électrode spécifique (Kamo *et al.*, 1979), permettant ainsi la mesure des variations de concentrations de cette molécule dans le milieu extérieur aux mitochondries.

Cette électrode a été réalisée selon Diolez, (Diolez et Moreau, 1985). L'électrode à TPP<sup>+</sup>, ainsi que l'électrode de référence (Tacussel, MI 4020) sont placées dans la même cellule que l'électrode à oxygène et reliées à un ordinateur, ce qui permet de suivre simultanément le potentiel de membrane ( $\Delta\Psi$ ) et la consommation d'oxygène.

Le potentiel de membrane est calculé selon l'épuration de Kamo *et al.*, 1979 :

$$\Delta\Psi = 59 \log (v/V) - 59 \log (10 \Delta E/59 - 1).$$

dans laquelle  $v$  est le volume matriciel mitochondrial (pris égal à  $1\mu\text{l} / \text{ml}^{-1}$  protéines)  
 $V$  est le volume du milieu de mesure et  $\Delta E$  est la variation de potentiel de l'électrode,  
liée à l'entrée de  $\text{TPP}^+$  dans les mitochondries. La concentration en protéines  
mitochondriales généralement utilisées est approximativement de  $0,5\text{mg ml}^{-1}$ .

## **7. Dosages spectrophotométriques.**

### **7.1. Mesure du gonflement mitochondrial :**

Les mesures du gonflement des mitochondries ont été réalisées à  $25^\circ\text{C}$  à l'aide d'un spectrophotomètre (Jenway modèle 6300), en suivant à  $520\text{nm}$  les variations d'absorption des suspensions mitochondriales. Le milieu de suspension contient du  $\text{KCl}$   $100\text{mM}$ . La réaction est déclenchée par l'addition des mitochondries (1 à  $1,5$  mg de protéines pour un volume final de  $3\text{ml}$ ).

## **8. Dosages biochimiques :**

### **8.1. Dosage des protéines :**

Le dosage des protéines a été réalisé en utilisant la méthode de Bradford (1976). Cette méthode utilise la SAB comme standard. Après dilution des suspensions membranaires dans l'eau, le réactif de Bradford est ajouté. Le complexe formé, de couleur bleue, est ensuite dosé spectrophotométriquement à  $595\text{ nm}$ .

### **8.2. Dosage des lipides :**

Les acides gras des lipides polaires sont dosés sous la forme d'esters de méthyl. Ces derniers sont séparés par chromatographie de phase sur (Girdel, S30) selon la méthode (Ducet *et al.*, 1970.).

## **9. Traitement des mitochondries par le Cadmium / Calcium :**

Le traitement des mitochondries de Pomme de Terre a été réalisé en soumettant les suspensions mitochondriales à différentes concentrations de chlorure de Cadmium (0, 4, 8, 12, 16 et 20 $\mu$ M) pendant des temps de 5min à la température ambiante de 25°C.

L'évolution des effets du Cadmium sur le fonctionnement de la voie respiratoire altérative (résistante au cyanure) a été réalisée en présence de 1mM KCN et dans les mêmes conditions citées ci-dessus.

Concernant le traitement par le calcium, les concentrations utilisées sont : 0,1 ; 0,5 ; 1 ; 2 ; et 3mM, elles sont préparées à partir d'une solution mère par dilution.

## **10. Mesure des variations de pH dues à l'hydrogène ou à la synthèse d'ATP.**

La mesure des variations de pH est réalisée à l'aide d'un pHmètre de précision (Metrohm, 632) dont l'électrode est insérée dans la cellule de l'électrode à oxygène. Les variations de pH associées à l'hydrolyse de l'ATP sont mesurées dans de 2ml d'un milieu dont la composition est la suivante : Mannitol 300mM, MgCl<sub>2</sub> 5mM, KCl 30mM, SAB 1g/l et MOPS 5mM, pH 7,2. La concentration en protéines mitochondriales est approximativement de 0,2mg/ml et la réaction est déclenchée par l'addition d'ATP 200 $\mu$ M. La vitesse initiale de la réaction d'acidification est alors mesurée. Les variations de pH associées à la synthèse d'ATP sont détenues simultanément avec les enregistrements polarographiques de l'oxygène dans le milieu de mesure habituel dont la concentration finale en phosphate est cependant réduite (2mM). La réponse de l'électrode de pH est calibrée par l'addition de quantités connues d'HCl 0,06N préalablement titré.

**Effet du Cadmium sur les mitochondries végétales****1. Introduction :**

Dans ce chapitre, les effets du cadmium ont été déterminés, sur les activités respiratoires de mitochondries de Pomme de terre, en raison des d'isolement et de purification relativement faciles de ces organites.

Les effets du cadmium sur les activités de phosphorylation oxydative de mitochondries ont été étudiés en mesurant les paramètres caractéristiques de l'oxydation du succinate (vitesse d'oxydation, Contrôle Respiratoire, Rapport ADP/O) dans les mitochondries de Pomme de Terre isolées et soumises à un traitement à 20°C par différentes concentrations de cadmium variant de 0 $\mu$ M à 20 $\mu$ M.

De plus, les potentiels de membrane générés au cours des différents états énergétiques des mitochondries, en présence et en absence d'ATP (2mM) et de phosphate (10mM), ont été déterminés. Enfin, les effets de cadmium sur les variations des activités ATPsiques liées à l'hydrolyse de l'ATP ont été recherchées.

**2. Propriétés oxydatives :**

Les mesures des vitesses d'oxydation du succinate ont été réalisés soit en état phosphorylant (état 3), après addition de quantités limitantes d'ADP, soit en état non phosphorylant (état 4), c'est-à-dire lorsque tout l'ADP introduit a été phosphorylé en ATP.

Le contrôle respiratoire, qui est le rapport de la vitesse d'oxydation en état 3 sur la vitesse d'oxydation en état 4 a pu être ensuite déterminé. Enfin, le rapport ADP/O, rapport de la quantité d'ADP introduite sur la quantité d'oxygène consommée pendant la durée de l'état 3, a été calculé (Chance et Williams, 1956).

Le tableau 3, permet de comparer les valeurs moyennes des vitesses d'oxydation obtenues avec les mitochondries traitées par le cadmium et mitochondries témoins. Le tableau fournit également les valeurs du contrôle respiratoire (CR) et des rapports ADP/O.

**Tableau 3 :** Effet du Cadmium sur les activités oxydatives des mitochondries de Pomme de Terre incubées en présence d'ATP. Les techniques de mesure des vitesses d'oxydation sont décrites dans le chapitre Matériel et Méthodes. Protéines mitochondriales :  $0,1\text{mg ml}^{-1}$ . La concentration du succinate est de  $2\text{mM}$ . Nd : Non déterminé.

Cadmium ( $\mu\text{M}$ )	Vitesse d'oxydation ( $\text{nmol}/\text{min}^{-1}.\text{mg}^{-1}.\text{Prot.}$ )			
	Etat 3	Etat 4	CR	ADP/O
0	180	49	3,7	1,30
4	159	46	3,4	0,90
8	84	44	1,9	0,80
12	69	40	1,7	0,70
16	Nd	Nd	Nd	Nd
20	Nd	Nd	Nd	Nd

Comparativement aux mitochondries témoins, les vitesses d'oxydation en état 3 diminuent en fonction des concentrations de cadmium. A la concentration de 8µM cadmium, la vitesse d'oxydation en état 3 est 2 fois inférieure à celle enregistrée chez les mitochondries témoins.

Cependant, et pour les mêmes conditions les vitesses d'oxydation en état 4 diminuent faiblement. Les contrôles respiratoires obtenus après traitement au cadmium diminuent (pratiquement de 1/2 pour la concentration 8µM cadmium). L'évolution de ces paramètres reste pratiquement la même jusqu'à la concentration de 16µM cadmium où tous ses paramètres s'annulent. Les variations des rapports ADP/O sont sensiblement les mêmes, puisqu'une diminution d'environ 45% est observée après traitement au cadmium à la concentration de 12µM (Tableau).

### 3. Potentiel de membrane :

Les valeurs de potentiel de membranes obtenues en état phosphorylant et non phosphorylant dans les mitochondries traitées par le cadmium sont présentées dans le tableau 4.

**Tableau 4 :** Effets du Cadmium sur le potentiel de membrane des mitochondries de Pomme de Terre déterminé en présence et en absence de phosphate et d'ATP. La concentration de phosphate est de 10mM, celle de l'ATP est de 2mM. Nd : Non déterminé.

Cadmium (µM)	Potentiel de membrane (mV)			
	Phosphate		Sans phosphate	
	-ATP	+ATP	-ATP	+ATP
0	250	241	230	220
4	237	224	222	205
8	214	216	200	181
12	98	74	79	65
16	Nd	Nd	Nd	Nd
20	Nd	Nd	Nd	Nd

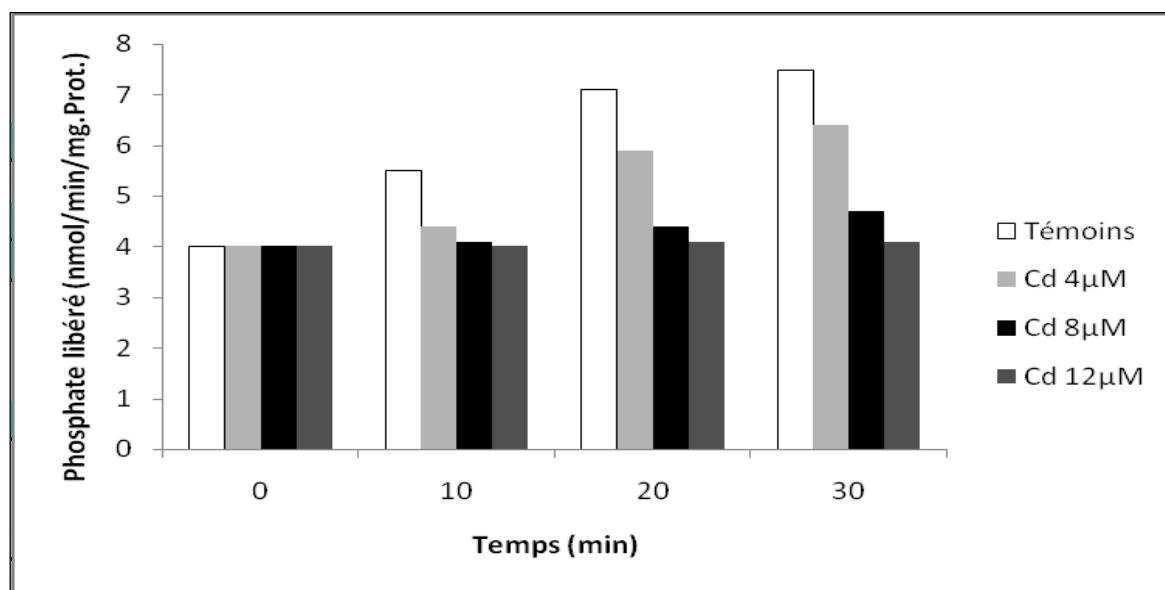
On constate que les valeurs du potentiel de membrane ( $\Delta\Psi$ ) sont fortement réduites puisqu'à la concentration de 12 $\mu$ M cadmium, les valeurs sont réduites de plus de 50%. Il en est de même pour les potentiels de membranes en présence d'ATP.

Les valeurs de potentiels de membrane obtenus après addition de succinate (2mM), en absence de phosphate (+/- ATP) ont aussi été déterminées dans les mitochondries témoins et dans celles traitées par le cadmium (Tableau 4). Ces expériences, réalisées en présence et en absence de phosphate 10mM dans le milieu d'incubation permettant de modifier dans une certaine mesure les valeurs respectives du gradient de protons ( $\Delta p H$ ) et du potentiel de membrane ( $\Delta\Psi$ ) de la force proton-motrice générée par la chaîne respiratoire (Davy de Virville et Moreau, 1984, Diolez et Moreau, 1985).

On constate que la présence de phosphate augmente le potentiel de membrane (environ 20mV) dans les mitochondries traitées et que celui-ci est légèrement diminué (environ 10mV) en présence d'ATP. Dans le cas des mitochondries traitées par le cadmium en absence de phosphate, aucune différence significative n'est observée.

#### **4. Activité ATPasique.**

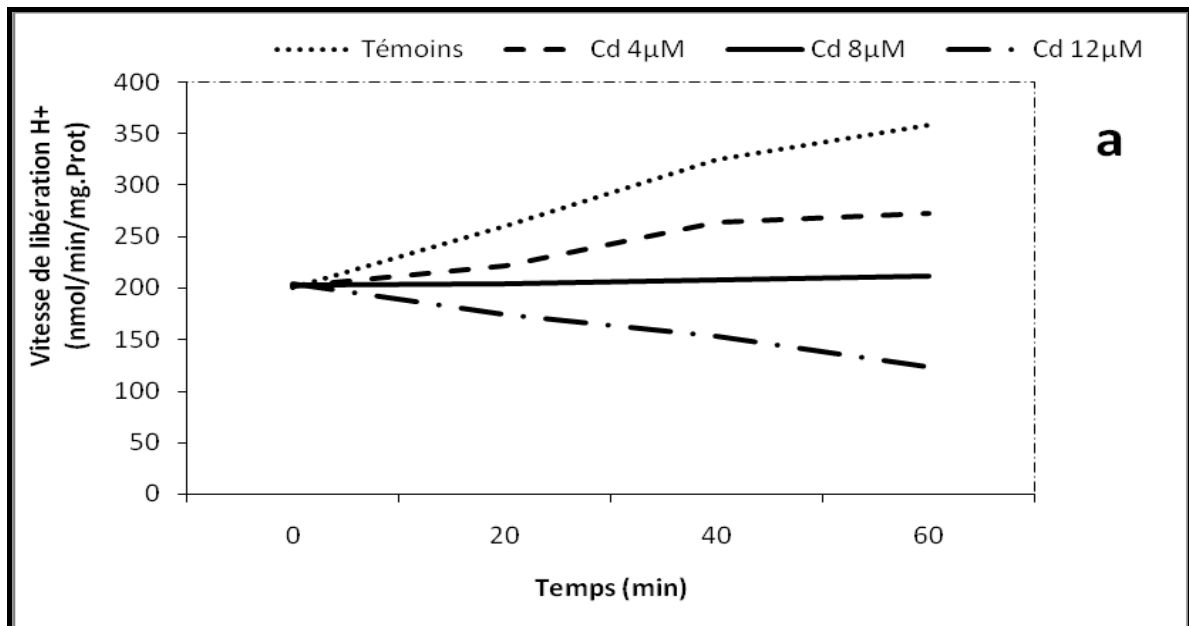
Les effets du cadmium sur l'activité ATPase ont été évalués par deux approches techniques, la première liée à l'hydrolyse de l'ATP a été menée sur des mitochondries intactes ou traitées aux ultrasons. Les expériences ont été réalisées en présence d'une concentration saturante d'ATP (2mM) (Rembur *et al.*, 1983). Les résultats obtenus sur les mitochondries sont présentés dans la figure 8.



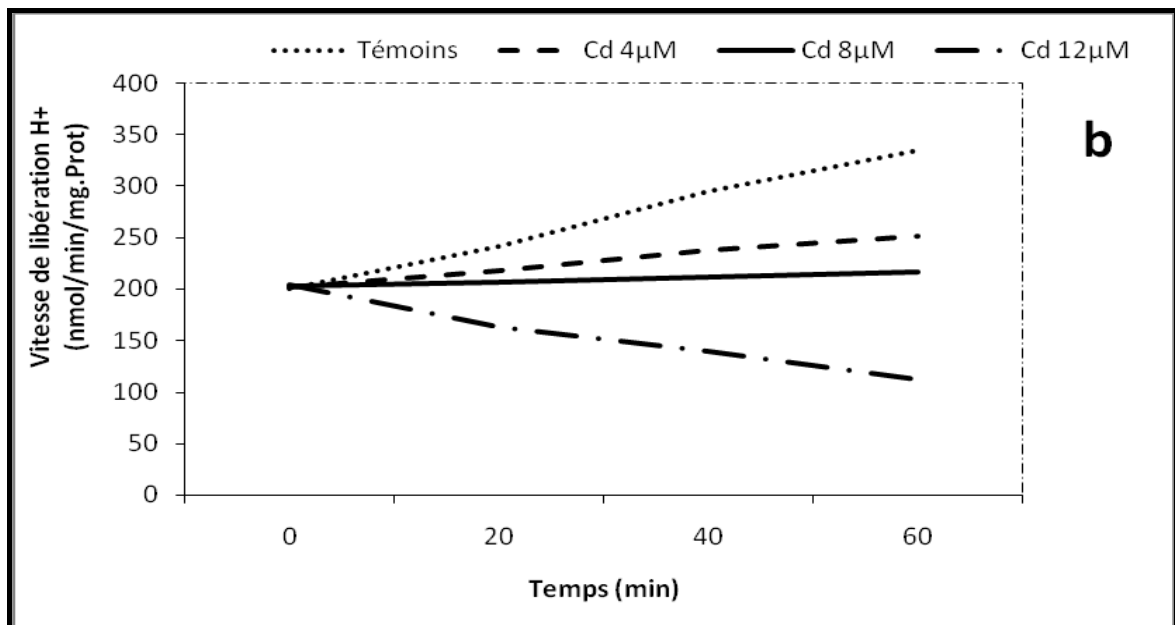
**Figure 8.** Effets du cadmium sur l'activité ATPasique des mitochondries de Pomme de terre. La concentration d'ATP est de 2 mM. Technique de Rembur *et al.*, 1983.

Cette figure montre que l'activité ATPase des mitochondries témoins est élevée. Le traitement par le cadmium stimule légèrement cette activité, en effet on enregistre à 4µM cadmium une activité de 6 nmol/min/mg.Prot. L'augmentation des concentrations en cadmium reste pratiquement sans effet important sur l'activité ATPasique. Cette activité est pratiquement nulle au-delà de 12µM cadmium.

La seconde technique est plutôt basée sur les mesures de variations de pH du milieu de suspension des mitochondries afin de détecter une éventuelle activité d'hydrolyse de l'ATP (figure 9) ; 9a en absence d'oligomycine et 9b en présence d'oligomycine.



**Figure 9a.** Evolution des vitesses de libération des protons  $H^+$  liées à d'éventuelles activités d'hydrolyse de l'ATP par les mitochondries de Pomme de Terre traitées par le cadmium à  $25^{\circ}C$ . Les mesures de pH sont réalisées sur des mitochondries fraîches ( $0,19 \text{ mg protéines ml}^{-1}$ , en absence d'oligomycine « a »).



**Figure 9b.** Evolution des vitesses de libération des protons  $H^+$  liées à d'éventuelles activités d'hydrolyse de l'ATP par les mitochondries de Pomme de Terre traitées par le cadmium à  $25^{\circ}C$ . Les mesures de pH sont réalisées sur des mitochondries fraîches ( $0,19 \text{ mg protéines ml}^{-1}$ , en présence d'oligomycine « b »).

Le principe de la mesure de cette activité ATPasique dépend de la libération de  $H^+$  au cours de la réaction :



dans laquelle  $n$  varie avec le pH du milieu de mesure en fonction de l'équilibre des différentes formes ioniques de l'ATP, de l'ADP du phosphate. Les conditions de mesure de l'activité n'ont pas été optimisées. Dans les conditions de la figure 9a et b, un milieu faiblement tamponné (MOPS 5mM) et dépourvu de phosphate est utilisé, de l'ATP est ajouté aux mitochondries, ce qui provoque une acidification rapide du milieu. Après calibration de la réponse de l'électrode par addition de quantités connues d'HCL titré, l'activité d'hydrolyse est exprimée  $n$  moles de protons libérés par minute et par mg de protéines. La même expérience est réalisée en présence d'oligomycine.

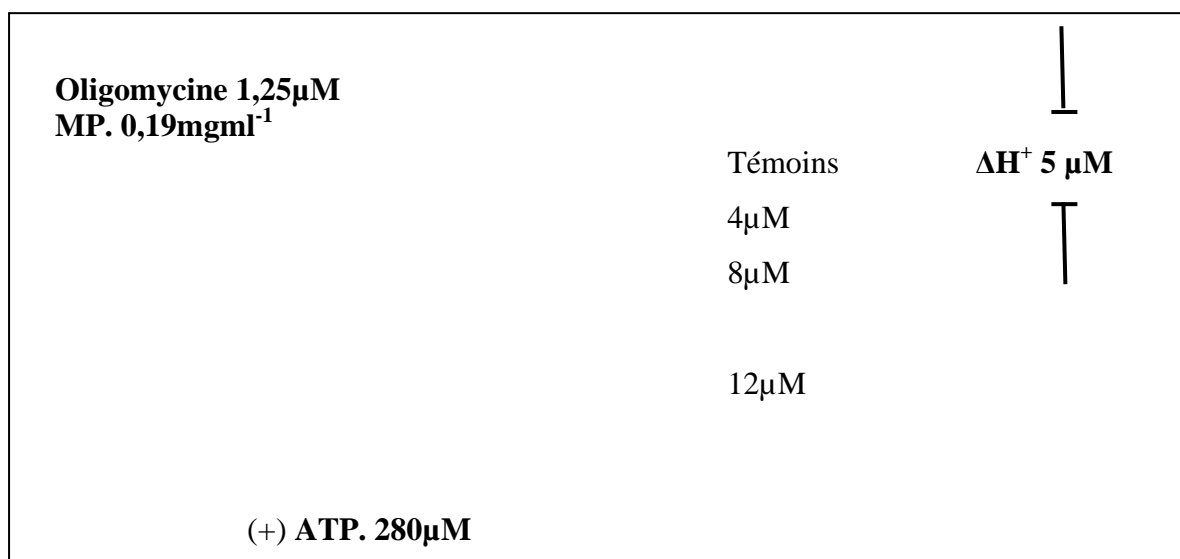
Les résultats obtenus en figure 9a montrent l'existence d'une activité ATPasique révélée en terme de libération de protons  $H^+$ . On constate que la vitesse d'hydrolyse de l'ATP par les mitochondries est réduite en présence de cadmium (environ 50%) pour la concentration  $8\mu M$  et à partir de  $12\mu M$  cette vitesse est réduite de façon importante.

Le traitement par l'oligomycine (figure 9b) ne semble pas modifier les résultats obtenus en figure 9a. En effet, pratiquement les mêmes valeurs des vitesses de libération des protons sont enregistrées. Ces observations ne nous permettent pas de confirmer que l'activité de libération de protons enregistrée dans notre cas est du type ATPase mitochondriale.

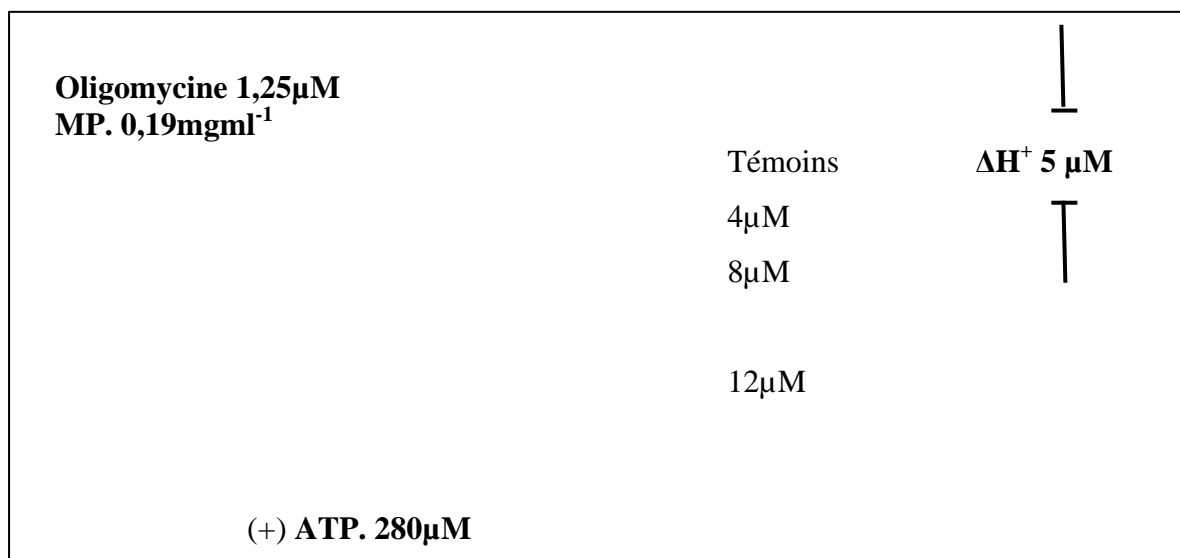
## **5. Variations du pH :**

Une expérience typique de la mesure des variations de pH ( $\Delta pH$ ) du milieu de mesure est présentée dans la figure 10. Elle est réalisée en absence

d'oligomycine 10a et présence d'oligomycine 10b et seulement pour 3 concentrations de cadmium à savoir 4, 12 et 20 $\mu$ M. La concentration d'oligomycine est de 1,25 $\mu$ M.



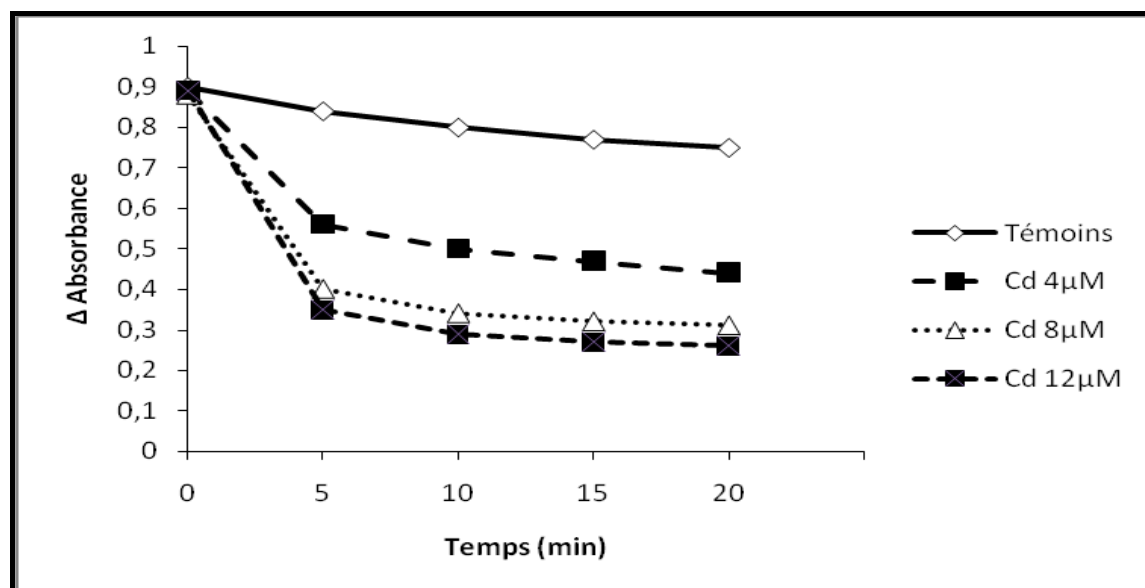
**Figure 10a.** Enregistrement des variations de pH du milieu de mesure des mitochondries de Pomme de Terre traitées par le cadmium à 25°C. Les mesures de pH sont réalisées sur des mitochondries fraîches (0,19 mg protéines ml<sup>-1</sup>, en absence d'oligomycine « a »).



**Figure 10b.** Enregistrement des variations de pH du milieu de mesure des mitochondries de Pomme de Terre traitées par le cadmium à 25°C. Les mesures de pH sont réalisées sur des mitochondries fraîches (0,19 mg protéines ml<sup>-1</sup>, en présence d'oligomycine « b »).

## 6. Volume des mitochondries :

Les changements d'absorbance des suspensions mitochondriales à 520nm, associée aux variations de volume de ces organites, sont illustrés dans la figure 11.

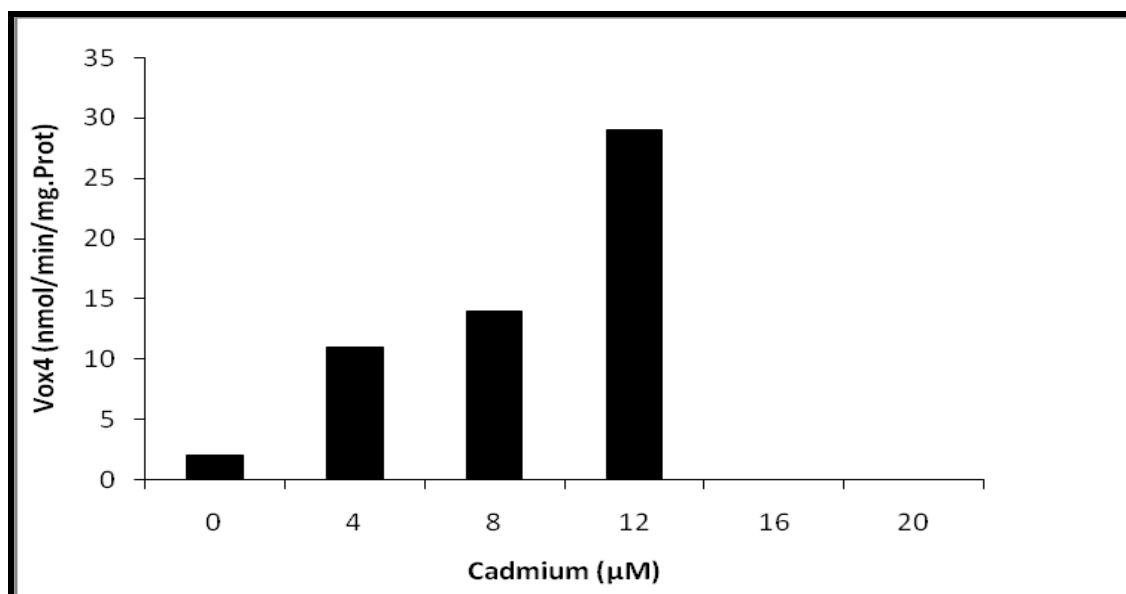


**Figure 11.** Effets du cadmium sur les variations de volume des mitochondries isolées de Pomme de Terre.

Le gonflement des mitochondries, sous l'effet d'un changement de tonicité du milieu (KCl 100mM), s'accompagne d'une variation sensible de l'absorbance (Fig. 11). Une baisse importante de l'absorbance est observée les 10 premières minutes, puis elle se ralentit ensuite pour atteindre un plateau, au bout de 12min environ. Cette baisse peu importante chez les mitochondries témoins (à 5min; environ 2%) devient assez importante à 4μM cadmium (environ 60%) et pratiquement 90% à 8 et 12μM cadmium. Ainsi le traitement par le cadmium amplifie le gonflement des mitochondries.

## 7. La voie respiratoire alternative :

Les effets du cadmium sur le fonctionnement de la voie respiratoire alternative ou insensible au KCN ont été déterminés sur des mitochondries isolées et purifiées. Les résultats obtenus sont représentés sur la figure 12.



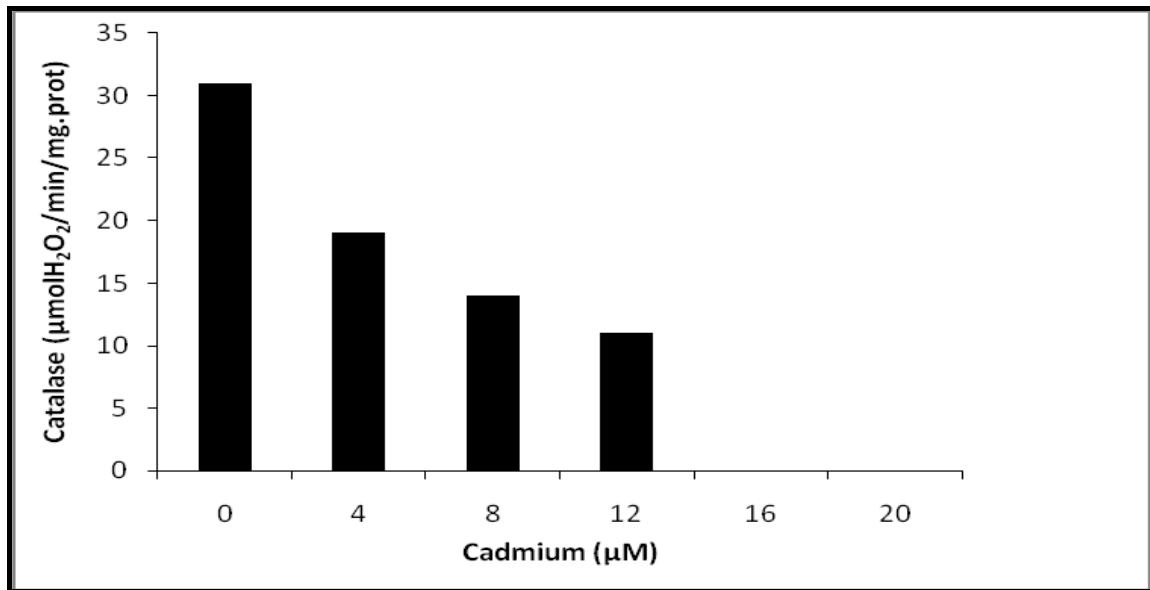
**Figure 12.** Effets du cadmium sur les activités oxydatives des mitochondries isolées de Pomme de Terre (Vitesses d'oxydations en état non phosphorylant « Vox<sub>4</sub> » de la voie alternative de transfert d'électrons insensible au cyanure). Protéine mitochondriale : 0,1 ml/ml. Concentration de KCN : 1 mM.

Cette figure montre que le traitement par le cadmium stimule la voie respiratoire alternative particulièrement à la concentration de 12 $\mu\text{M}$  où on enregistre un maximum d'activité oxydative (vox maximale).

## 8. Dosages enzymatiques :

### 8.1. Dosage de l'activité catalase :

Le dosage de l'activité catalase des mitochondries de Pomme de Terre a été réalisée sur des mitochondries traitées par différentes concentrations de cadmium- Les résultats obtenus sont représentés sur la figure 13.

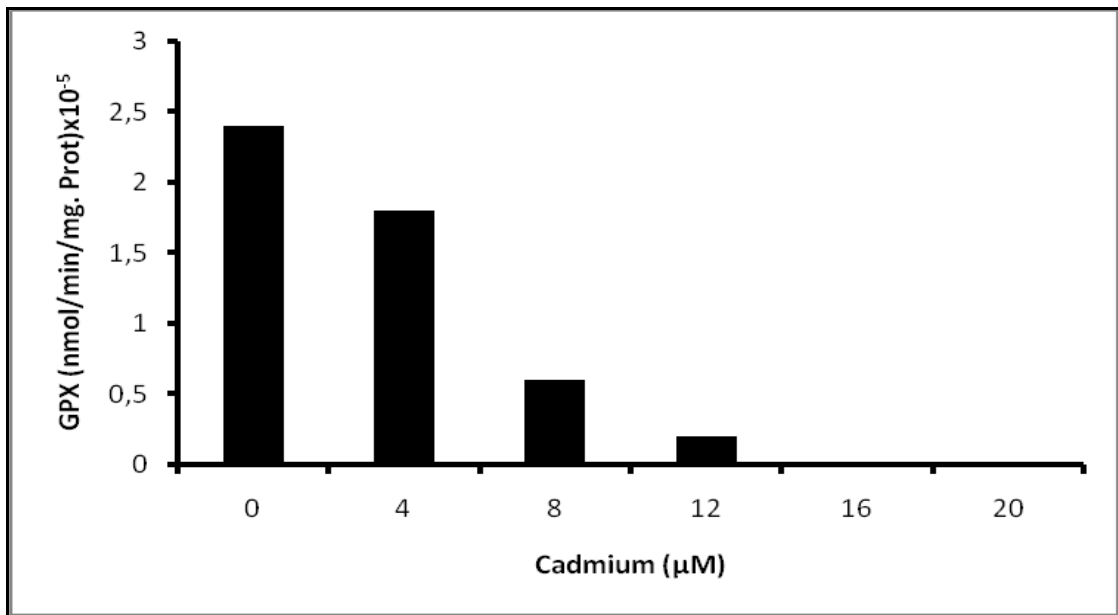


**Figure 13** Effets du cadmium sur l'activité enzymatique Catalase des mitochondries isolées de Pomme de Terre. Concentration des protéines : 0,1 mg/ml.

On constate que le traitement par le cadmium réduit fortement l'activité catalase jusqu'à l'inhiber totalement aux concentrations supérieures à 12μM.

### 8.2. Dosage de l'activité Peroxydase :

Le dosage de l'activité peroxydase (GPX) en fonction des concentrations de cadmium a été effectué sur des mitochondries isolées et purifiées de Pomme de Terre, les résultats obtenus sont représentés sur la figure 14.

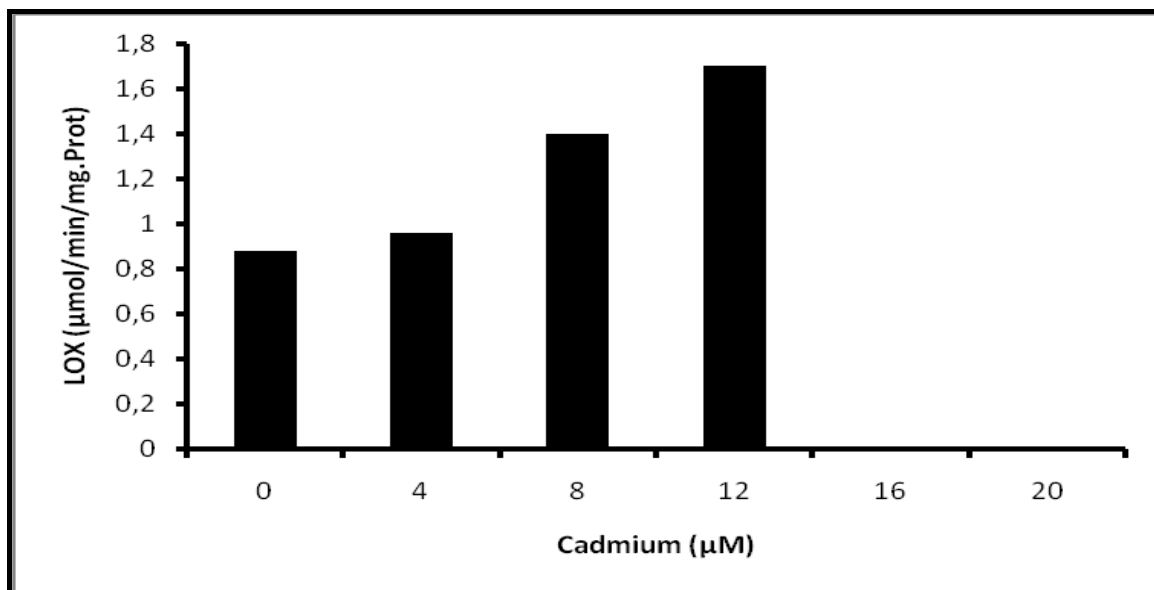


**Figure 14.** Effets du cadmium sur l'activité enzymatique Peroxydase (GPX) des mitochondries isolées de Pomme de Terre. Concentration des protéines : 0,1 mg/ml.

Sur cette figure, on constate une forte réduction de l'activité de cette enzyme en fonction des concentrations de cadmium et comme l'activité catalase, la GPX aussi complètement inhibée aux concentrations supérieures à 12μM cadmium.

### 8.3. Dosage de l'activité lipoxygénase :

Le dosage de l'activité lipoxygénase (LOX) a été réalisé sur des mitochondries isolées et purifiées de Pomme de Terre. Les résultats obtenus sont représentés sur la figure 15.



**Figure 15.** Effets du cadmium sur l'activité enzymatique lipoxygénase (LOX) des mitochondries isolées de Pomme de Terre. Concentration des protéines : 0,1 mg/ml.

Le traitement par les différentes concentrations de cadmium stimule l'activité lipoxygénase particulièrement à la concentration de 12 µM cadmium où on enregistre une activité 2,5 fois supérieure à celle des mitochondries témoins. Cette stimulation de l'activité lipoxygénase est traduite par une forte production d'hydroperoxydes d'hydrogènes dans le milieu d'incubation.

### **9. Dosage des variations du contenu lipidique :**

Les variations du contenu lipidique en acides gras des mitochondries de Pomme de Terre a été déterminé en fonction du traitement des organites avec les différentes concentrations de cadmium. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau 5.

**Tableau 5.** : Effets du Cadmium sur les variations du contenu en acides gras des lipides polaires.

Cadmium Linoléique ( $\mu\text{M}$ )	Contenu en acides gras (%)		
	Ac. Palmitique ( $\text{C}_{16:0}$ )	Ac. Linoléique ( $\text{C}_{18:2}$ )	Ac. ( $\text{C}_{18:3}$ )
0	15	10	36
4	19	07	33
8	24	03	17
12	27	01	14
16	Nd	Nd	Nd
20	Nd	Nd	Nd

Le tableau montre que le taux le plus élevé en acides gras chez les mitochondries isolées de Pomme de Terre est celui de l'acide linoléique ( $\text{C}_{18:3}$ ; 60%) par rapport à l'acide palmitique ( $\text{C}_{16:0}$ ) et 75% par rapport à l'acide linoléique ( $\text{C}_{18:2}$ ).

Le traitement par les différentes concentrations de cadmium stimule le taux d'acide palmitique ( $\text{C}_{16:0}$ ) d'environ 50%. Parallèlement, le cadmium réduit fortement le taux des acides linoléiques (90%) et linoléique (75%) respectivement.

## **Effet du Calcium sur les mitochondries végétales**

### **1. Introduction :**

Les effets du calcium sur les propriétés phosphorylantes des mitochondries de Pomme de Terre ont été examinés en mesurant les paramètres de l'oxydation du

succinate dans les mitochondries soumises à un traitement à 20°C par 5 concentrations de calcium (0,1mM, 0,5mM , 1mM, 2mM et 3mM).

Les expérimentations (cf. Chap.I) effectuées en présence de Ca<sup>+</sup> sont identiques à celles effectuées en présence du Cadmium.

## 2. Propriétés oxydatives :

Le tableau 6 représente les résultats obtenus des vitesses d'oxydation enregistrées avec les mitochondries traitées par les différentes concentrations de calcium. Le tableau fournit aussi les valeurs moyennes du contrôle respiratoire (CR) et des rapports ADP/0.

**Tableau 6:** Effets du calcium sur les activités oxydatives des mitochondries de Pomme de Terre incubées en présence d'ATP. Les techniques de mesures des vitesses d'oxydations en état 3 et en état 4 sont décrites dans le chapitre I (Matériel et méthodes). Les protéines mitochondriales sont de 0,1mg/ml. La concentration de succinate est de 2mM.

Calcium (mM)	Vitesse d'oxydation (nmol/min/mg prot.)			
	Etat 3	Etat 4	CR	ADP/0
0	188	48	3,9	1,5
0,1	208	51	4,0	1,7
0,5	241	56	4,3	1,9
1	220	57	3,8	1,1
2	167	56	2,9	0,9
3	117	55	2,1	0,7

On constate que les vitesses d'oxydations en état 3 augmentent de façon importante par rapport à celles des mitochondries témoins et ce jusqu'à la concentration de 1mM  $\text{Ca}^+$ . Il en est de même pour les vitesses d'oxydations en état 4 qui semblent plutôt se stabiliser à partir de 1mM. Ceci donne des valeurs moyennes de contrôle respiratoire (CR) qui augmentent aussi en fonction des concentrations de  $\text{Ca}^+$ . Cependant, au delà de 0,5mM, les contrôles respiratoires diminuent mais les mitochondries restent fonctionnelles.

L'évolution des rapports ADP/0 est sensiblement la même, puisqu'une augmentation (environ 30%) est observée après traitement avec du calcium à 0,5mM suivie d'une diminution aux concentrations supérieures de calcium.

### **3. Potentiel de membrane :**

Le tableau 7, regroupe les valeurs moyennes du potentiel de membrane obtenues en état phosphorylant et non phosphorylant dans les mitochondries traitées par le calcium.

**Tableau 7:** Effets du calcium sur le potentiel de membrane des mitochondries de Pomme de Terre en présence et en absence de phosphate et d'ATP. La concentration de phosphate est de 10mM, celle de l'ATP est de 2mM et celle du succinate est de 2mM. Nd : Non déterminé.

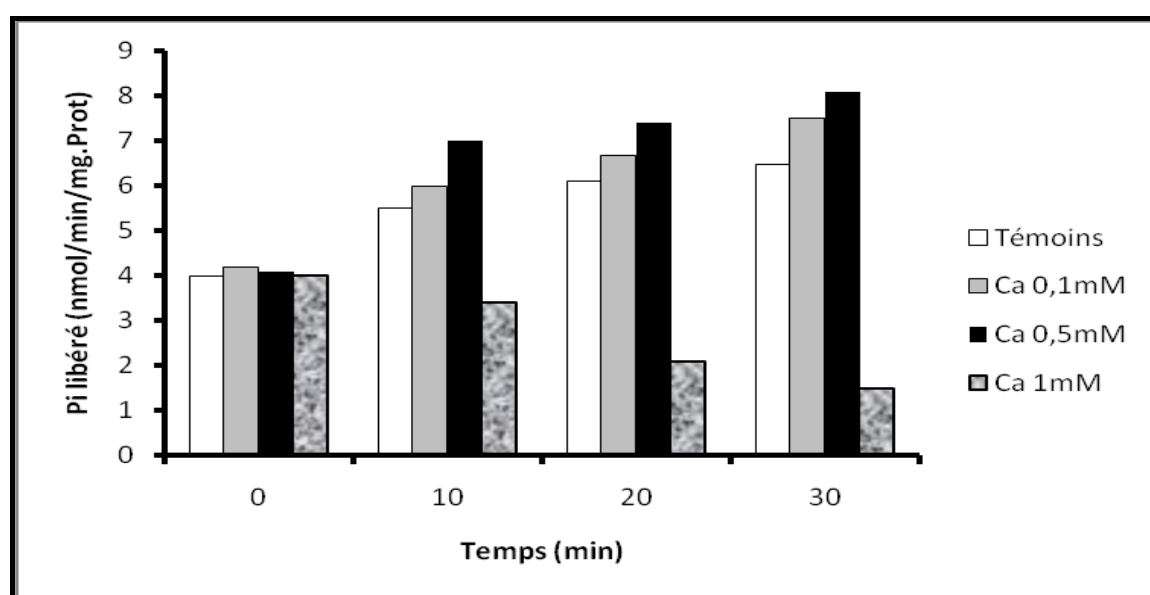
Calcium (mM)	Potentiel de membrane (mV)			
	<u>Phosphate</u>		<u>Sans phosphate</u>	
	- ATP	+ ATP	- ATP	+ATP
0	262	260	257	246
0,1	251	237	272	240
0,5	221	209	308	237
1	169	141	318	233
2	91	62	311	228
3	54	43	309	224

Les résultats du tableau 7 montrent que le traitement par le calcium en présence de phosphate (- ATP) baisse sensiblement le  $\Delta\Psi$  particulièrement à partir de 1mM  $\text{Ca}^+$ . La même évolution est observée en présence d'ATP. Parallèlement, en absence de phosphate (-ATP) le calcium augmente le  $\Delta\Psi$  à partir de 0,5mM.

En revanche, en présence d'ATP les valeurs moyennes de  $\Delta\Psi$  obtenues baissent légèrement (environ 20mV) à la plus forte concentration de calcium. Contrairement aux résultats obtenus avec le cadmium, le traitement par le calcium en présence de phosphate inhibe le  $\Delta\Psi$  des mitochondries de Pomme de Terre.

#### 4. Activité ATPasique :

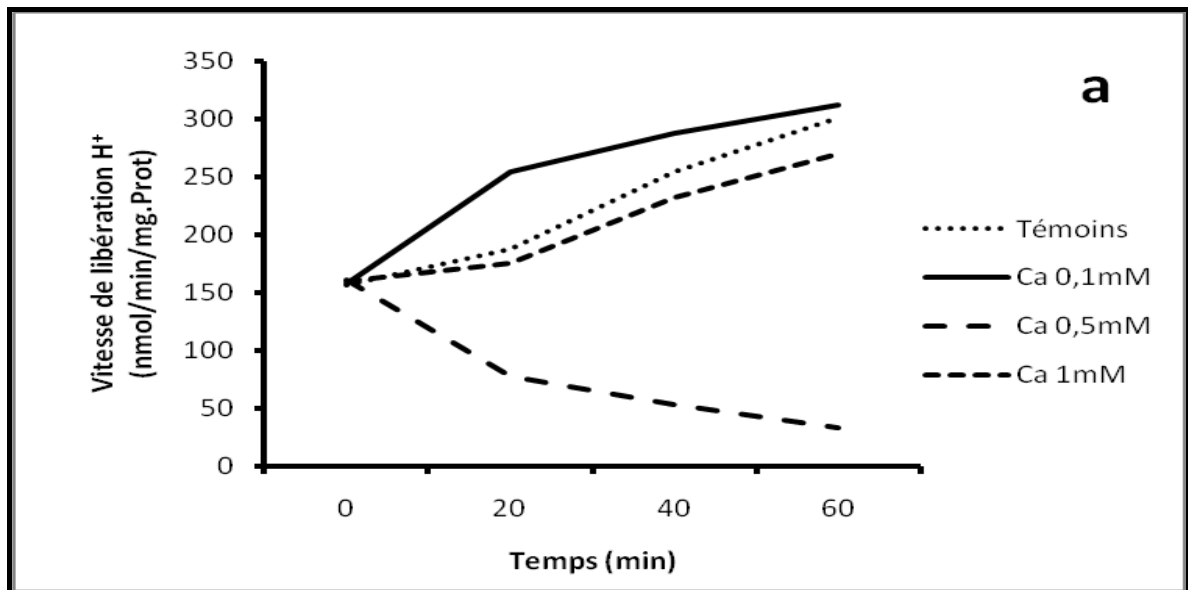
L'activité ATPasique liée à l'hydrolyse de l'ATP a été mesurée chez les mitochondries de Pomme de Terre traitées par le calcium. Le protocole expérimental utilisé dans le cas du calcium est identique à celui utilisé dans le cas du traitement avec le cadmium. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 16.



**Figure 16.** Effets du calcium sur l'activité ATPasique des mitochondries isolées de Pomme de Terre. Concentration des protéines : 0,1 mg/ml.

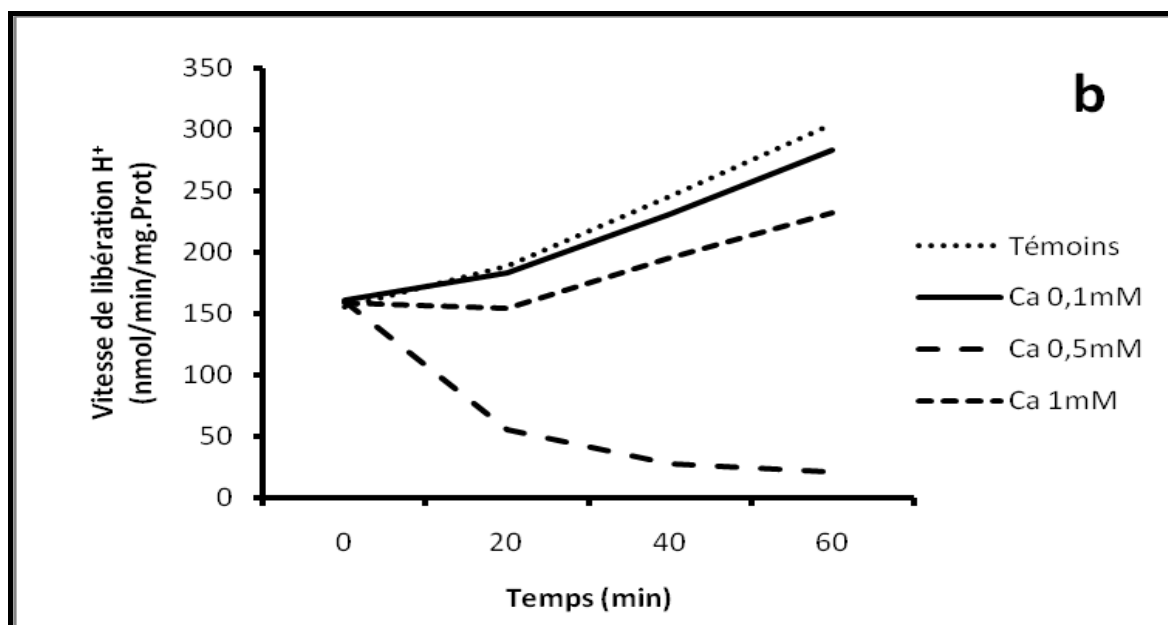
Cette figure montre que l'activité ATPase des mitochondries témoins est élevée. Le traitement par le calcium stimule l'activité d'hydrolyse de l'ATP particulièrement aux faibles concentrations. L'augmentation des concentrations en calcium inhibe l'hydrolyse de l'ATP et à partir de 2mM calcium cette activité est nulle.

L'évaluation de l'activité d'hydrolyse de l'ATP par la seconde technique (estimation des variations de pH dues à l'hydrolyse de l'ATP) est présentée dans la figure 17a en absence d'oligomycine et 17b en présence d'oligomycine.



**Figure 17a.** Evolution des vitesses de libération des protons dans les mitochondries de Pomme de Terre au cours du traitement par le calcium à 25°C, en absence d'oligomycine (1,25µM) ; (a) . La mesure de la vitesse de libération des H<sup>+</sup> lors de l'addition de l'ATP est décrite dans le chapitre I.

La figure 17a montre que les mitochondries témoins présentent une vitesse de libération de protons H<sup>+</sup> d'environ 4,1nmoles Pi/min/mg.Prot. Cette valeur est stimulée par le traitement au calcium particulièrement pour les concentrations 0,1mM et 0,5mM, ceci est en relation avec l'acidification du milieu, pouvant provenir d'un fonctionnement du complexe ATPsique dans le sens de l'hydrolyse de l'ATP avec libération de protons H<sup>+</sup>. Au-delà de ces deux concentrations, la vitesse de libération de protons est plutôt réduite et à partir de Ca<sup>+</sup> = 2mM, celle-ci est nulle.

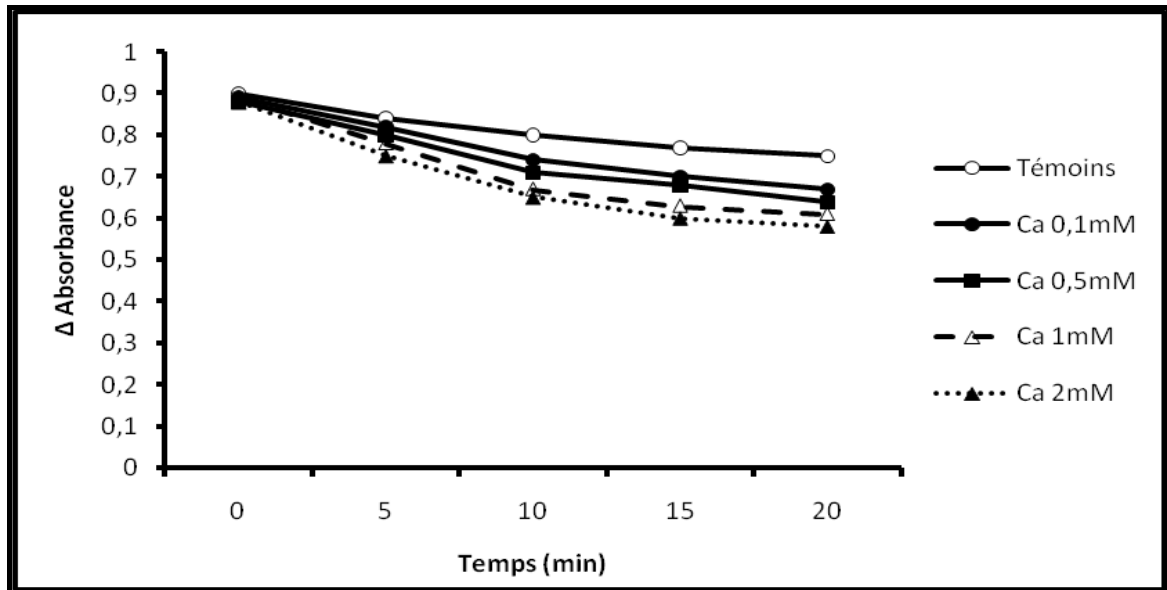


**Figure 17b.** Evolution des vitesses de libération des protons dans les mitochondries de Pomme de Terre au cours du traitement par le calcium à 25°C en présence d'oligomycine (1,25µM) ; (b). La mesure de la vitesse de libération des H<sup>+</sup> lors de l'addition de l'ATP est décrite dans le chapitre I.

Le traitement par l'oligomycine réduit fortement l'activité de libération des protons H<sup>+</sup> et ce à toutes les concentrations de calcium. Ces observations nous permettent bien de confirmer qu'une partie importante des activités enregistrées sont du type ATPase mitochondriale sensible à l'oligomycine.

## 5. Volume des mitochondries :

Les effets du calcium sur les variations de volume mitochondrial suite aux changements d'absorbance sont représentés sur la figure 18.

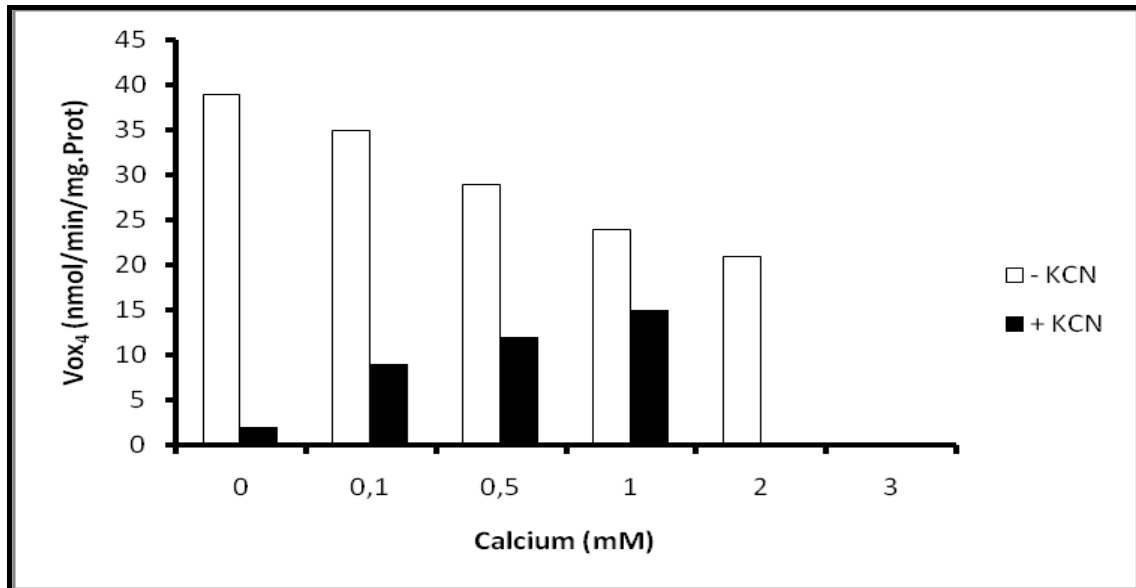


**Figure 18.** Effets du calcium sur les variations de volume des mitochondries isolées de Pomme de Terre.

D'après cette figure, on constate que les faibles concentrations de calcium (0,1mM et 0,5mM) provoquent un léger gonflement des mitochondries. Les autres concentrations de calcium restent cependant sans effets sur le volume mitochondrial.

## 6. La voie respiratoire alternative :

Les effets du calcium sur la voie alternative insensible au cyanure ont été déterminés sur les mitochondries isolées et purifiées de Pomme de Terre. L'ensemble des résultats obtenus est représenté sur la figure 19.



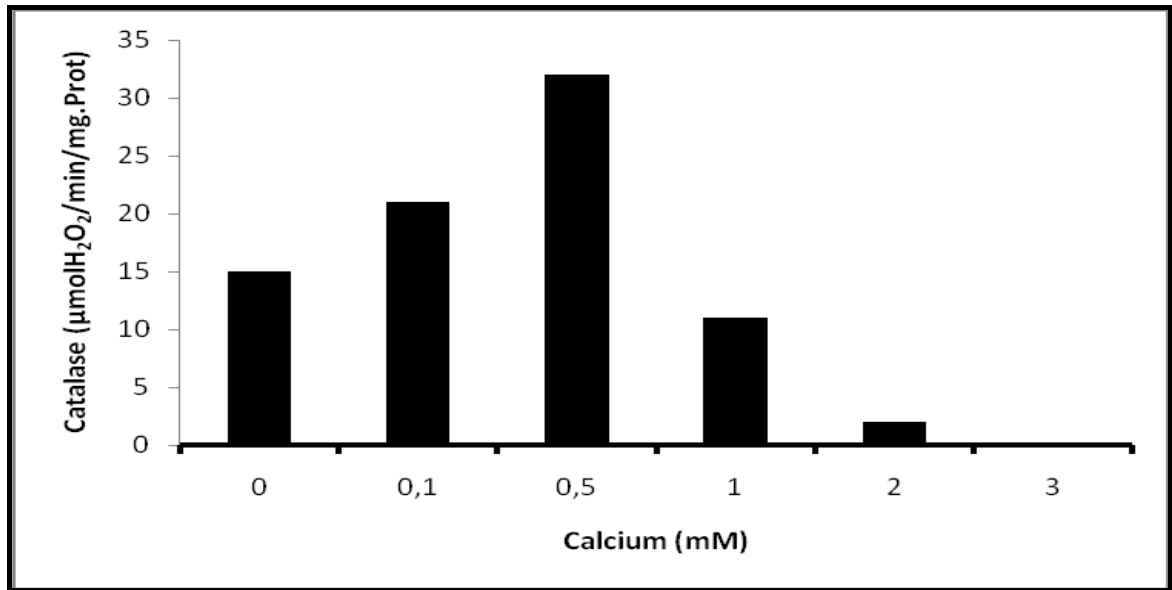
**Figure 19.** Effets du calcium sur les activités oxydatives des mitochondries isolées de Pomme de Terre (Vitesses d'oxydations en état non phosphorylant «  $V_{ox_4}$  » de la voie alternative de transfert d'électrons insensible au cyanure). Protéine mitochondriale : 0,1 ml/ml. Concentration de KCN : 1 mM.

Sur cette figure, on constate que le calcium provoque une très légère stimulation de la voie alternative, mitochondriale insensible au KCN. Un maximum est observé à la concentration de 1mM; au-delà de cette concentration la voie alternative est totalement nulle.

## 7. Dosages enzymatiques :

### 7.1. Dosage de l'activité catalase :

Les résultats obtenus des dosages de l'activité catalase sont regroupés dans la figure 20.

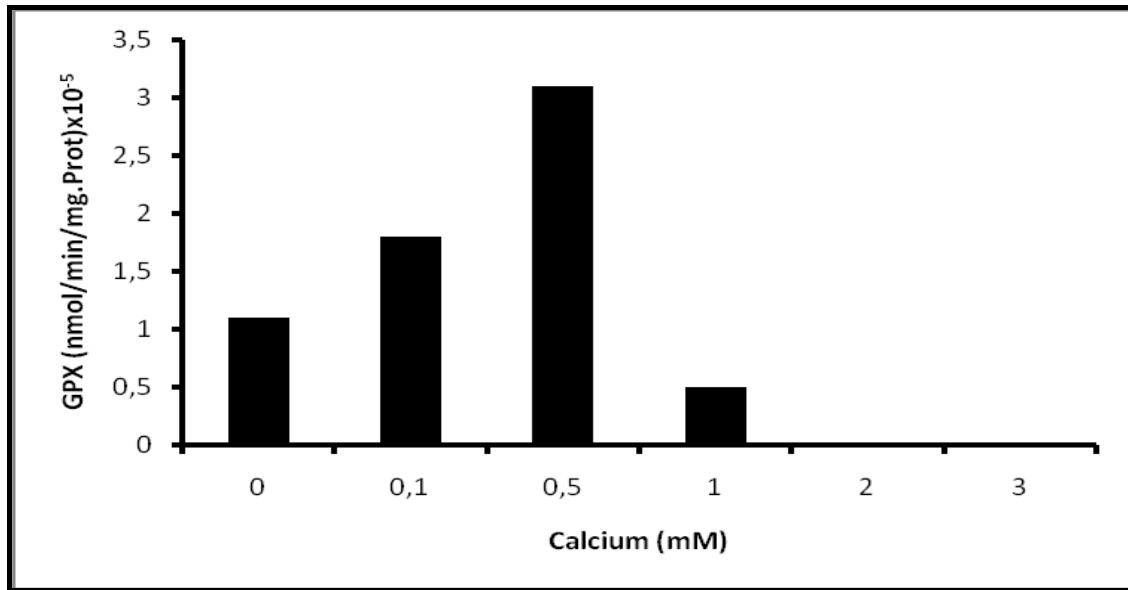


**Figure 20.** Effets du calcium sur l'activité enzymatique Catalase des mitochondries isolées de Pomme de Terre. Concentration des protéines : 0,1 mg/ml.

On constate une très forte stimulation de l'activité catalase liée aux faibles concentrations de calcium (0,1 ; 0,5). Un maximum d'activité catalase est obtenue à 0,5mM  $\text{Ca}^+$ . Au-delà de cette concentration, l'activité catalase est fortement réduite pour pratiquement s'annuler à 2 et 3mM  $\text{Ca}^+$ .

### 7.2. Dosage de l'activité peroxydase (GPX) :

La figure 21 représente les modifications observées quant à l'activité GPX chez les mitochondries de Pomme de Terre traitées par les différentes concentrations de calcium.

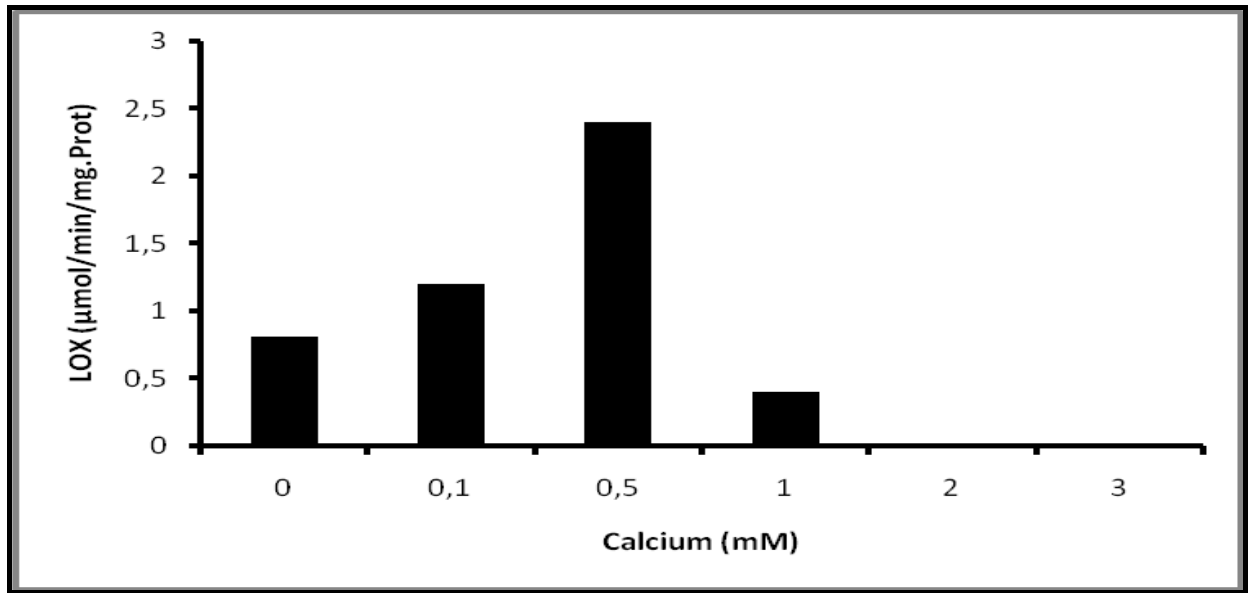


**Figure 21.** Effets du calcium sur l'activité enzymatique peroxydase (GPX) des mitochondries isolées de Pomme de Terre. Concentration des protéines : 0,1 mg/ml.

Cette figure montre que le traitement par calcium stimule l'activité GPX particulièrement aux concentrations faibles de calcium (0,1 et 0,5mM). Cette stimulation atteint même 60% environ à 0,5mM Calcium. Au-delà de ces concentrations, l'activité GPX est fortement réduite voire nulle à partir de la concentration 2mM Calcium.

### 7.3. Dosage de la lipoxygénase :

Le dosage de l'activité enzymatique lipoxygénase a été réalisé sur des mitochondries isolées et purifiées de Pomme de Terre, les résultats obtenus sont représentés sur la figure 22.



**Figure 22.** Effets du calcium sur l'activité enzymatique lipoxygénase (LOX) des mitochondries isolées de Pomme de Terre. Concentration des protéines : 0,1 mg/ml.

Cette figure montre que le calcium a tendance à stimuler l'activité lipoxygénase aux faibles concentrations. En effet, on enregistre un maximum d'activité à la concentration de 0,5mM (environ 300%) comparé aux valeurs obtenues chez les mitochondries témoins. Pour les concentrations supérieures, l'activité lipoxygénase est fortement réduite pour s'annuler à partir de la concentration 2mM calcium.

### **8. Effets du calcium sur les variations du contenu lipidique :**

Les variations du contenu lipidique des mitochondries de Pomme de Terre traitées par les différentes concentrations de calcium sont représentées dans le tableau 8.

**Tableau 8.** Effets du calcium sur les variations du contenu en acides gras des lipides polaires chez les mitochondries isolées de Pomme de terre.

Calcium (mM)	Contenu en acides gras (%)		
	Ac. Palmitique (C <sub>16:0</sub> )	Ac. Linoléique (C <sub>18:2</sub> )	Ac. Linoléique (C <sub>18:3</sub> )
0	15	13	32
0,1	16	14	30
0,5	17	13	31
1	16	15	31
2	Nd	Nd	Nd
3	Nd	Nd	Nd

Le tableau 8, montre que le traitement par les différentes concentrations de calcium ne semble pas affecter le contenu lipidique des mitochondries de Pomme de Terre. En effet, les taux de l'acide palmitique, linoléique et linoléique sont pratiquement stables en fonction des concentrations de calcium. Cependant, les fortes concentrations de calcium (> 1mM) semblent plutôt annuler complètement le contenu lipidique.

## **Etude des interactions : Cadmium/Calcium sur les mitochondries de Pomme de Terre.**

### **1. Introduction :**

L'antagonisme calcium/ cadmium se traduit par la protection qu'offre le calcium à l'organisme contre le cadmium (Santiago Karez, 1989). C'est dans ce sens que nous avons entrepris cette série d'expérimentation. En effet, nous nous sommes intéressés au comportement des mitochondries de Pomme de Terre en présence d'un métal lourd : le cadmium et de l'ion calcium. Dans cette partie de notre travail, seules 2 concentrations de  $\text{Ca}^+$  ont été retenues 0,5mM et 1mM.

### **2. Effet du traitement combiné Cd/Ca sur l'activité d'oxydation :**

Les effets du traitement combiné Cd/Ca sur les mitochondries de Pomme de Terre sont regroupés dans le tableau 9.

**Tableau 9.** Effet du traitement combiné Ca/Cd sur les propriétés oxydophosphoryantes des mitochondries de Pomme de Terre. Concentration de succinate (2mM).

Cd ( $\mu$ M)	Vitesse d'oxydation (nmol/min/mg prot.)							
	Etat 3		Etat 4		CR		ADP/O	
	Ca <sup>+</sup> 0,5Mm	1mM	0,5mM	1mM	0,5mM	1mM	0,5mM	1mM
0	190	188	51	50	3,7	3,8	1,4	1,3
4	201	161	50	48	4,0	3,4	1,5	1,4
8	210	154	50	47	4,2	3,3	1,6	1,1
12	179	74	49	46	3,6	1,6	1,0	0,8
16	101	60	47	39	2,1	1,5	0,7	0,6
20	61	49	46	35	1,3	1,4	0,6	0,5

Ce tableau montre que traitement par 0,5mM Ca<sup>+</sup> stimule les vitesses d'oxydations en état 3 jusqu'à la concentration 8 $\mu$ M Cd<sup>+</sup>. Au-delà de cette concentration les valeurs moyennes des vitesses d'oxydations en état 3 baissent sensiblement mais ne s'annulent pas. La concentration de 1mM Ca<sup>+</sup> tend plutôt à baisser fortement les vitesses d'oxydations en état 3 sans les annuler aux fortes concentrations.

Concernant les variations des vitesses d'oxydations en état 4, on constate qu'à la concentration de 0,5mM Ca<sup>+</sup>, le traitement par le Cd<sup>+</sup> ne semble pas modifier les valeurs moyennes des vitesses d'oxydations en état 4. Parallèlement, à 1mM Ca<sup>+</sup>, le Cd<sup>+</sup> tend à faire baisser les vitesses d'oxydations en état 4 de façon

importante. Il en résulte ainsi des contrôles respiratoires (CR) élevés à 0,5mM Ca<sup>+</sup> qui vont baisser au-delà de 8µM Cd<sup>+</sup> avec des (CR) qui baissent aussi sensiblement en présence de Ca<sup>+</sup> 1mM. L'évolution des valeurs moyennes des rapports ADP/0 est identique à celle des CR aussi bien à 0,5mM Ca<sup>+</sup> qu'à 1mM Ca<sup>+</sup>.

### 3. Potentiel de membrane :

Les variations de potentiel de membrane en état 3 et en état 4 des mitochondries de Pomme de Terre traitées par la combinaison Cd<sup>+</sup> et Ca<sup>+</sup> sont représentées sur le tableau 10.

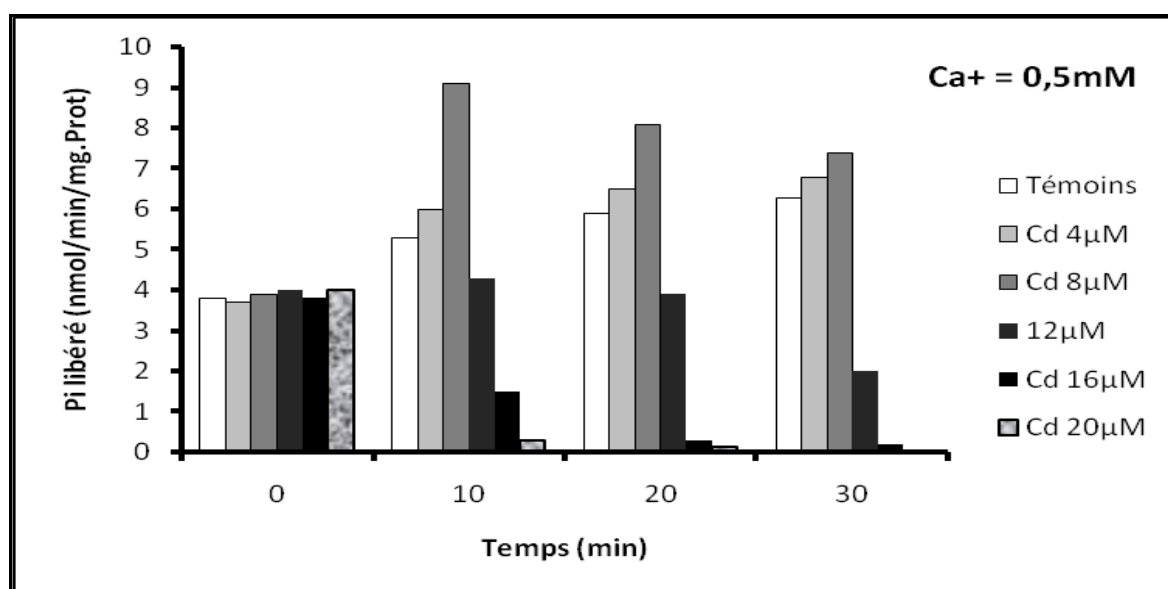
**Tableau 10.** Effets du traitement combiné Ca<sup>+</sup>/Cd<sup>+</sup> sur le potentiel de membrane des mitochondries de Pomme de terre déterminé en absence de phosphate et d'ATP.

Cadmium (µM)	Potentiel de membrane (mV)	
	Ca <sup>+</sup> : 0,5mM	Ca <sup>+</sup> : 1mM
0	245	249
4	257	222
8	225	181
12	199	94
16	112	81
20	87	72

On constate que la présence de Ca<sup>+</sup> à 0,5mM a tendance à maintenir en ΔΨ stable voire même stimulé à 4 et 8µM cadmium. Parallèlement, les valeurs moyennes enregistrées en présence de 1mM Ca<sup>+</sup> sont plutôt réduites de façon importante (3fois inférieure à 16µM Cd<sup>+</sup> par rapport aux organites témoins).

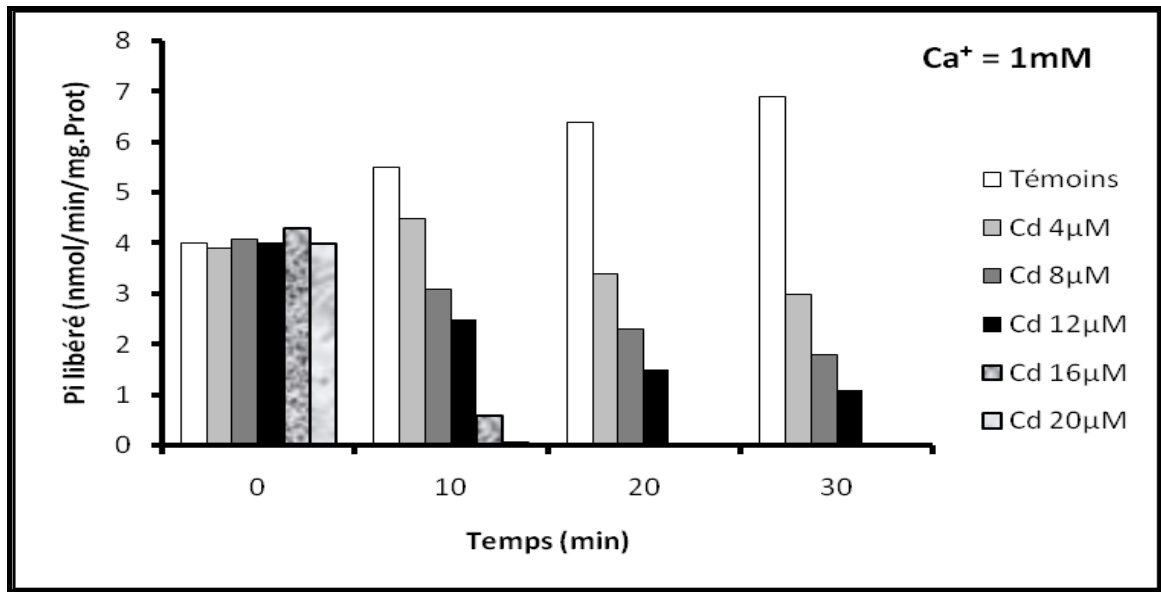
#### 4. Activité ATPasique :

Les effets du traitement combiné  $\text{Cd}^+/\text{Ca}^+$  sur l'activité ATPasique des mitochondries isolées de Pomme de Terre ont été évalués en présence de deux concentrations de calcium 0,5mM et 1 mM. Les résultats obtenus sont représentés sur la figure 23a pour la concentration de calcium (0,5mM) et Figure 23b pour la concentration de calcium (1 mM).



**Figure 23a.** Effets du traitement combiné  $\text{Ca}^+/\text{Cd}^+$  sur l'activité ATPasique des mitochondries de Pomme de terre. La concentration de calcium est de 0,5mM.

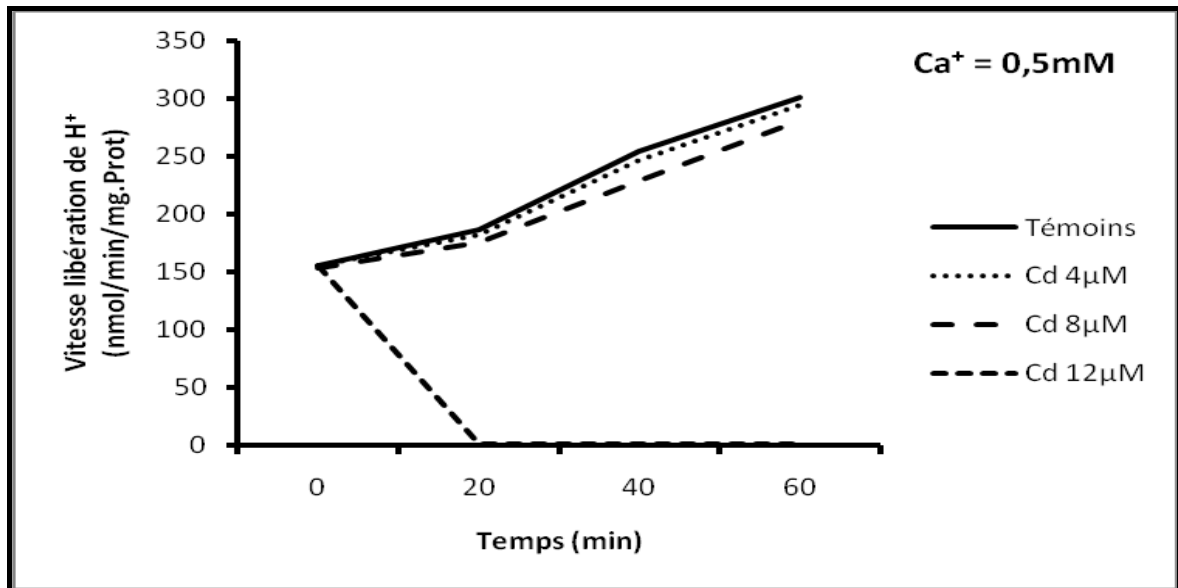
Cette figure montre que le traitement combiné  $\text{Cd}^+/\text{Ca}^+$  à la concentration de 0,5m M  $\text{Ca}^+$  stimule fortement l'activité d'hydrolyse d'ATP particulièrement à la concentration de 8μM  $\text{Cd}^+$  (environ 2,5 fois plus élevée). Au-delà de cette concentration, l'activité d'hydrolyse de l'ATP est réduite de façon importante. En présence d'oligomycine la même évolution est obtenue avec cependant une réduction d'environ 40% des valeurs de Pi enregistrées. Ce qui montre encore une fois que les activités de libération de protons enregistrées sont composées en partie d'une activité de type ATPase mitochondriale oligomycine-sensible.



**Figure 23b.** Effets du traitement combiné Ca<sup>+</sup>/Cd<sup>+</sup> sur l'activité ATPasique des mitochondries de Pomme de terre. La concentration de calcium est de 1mM.

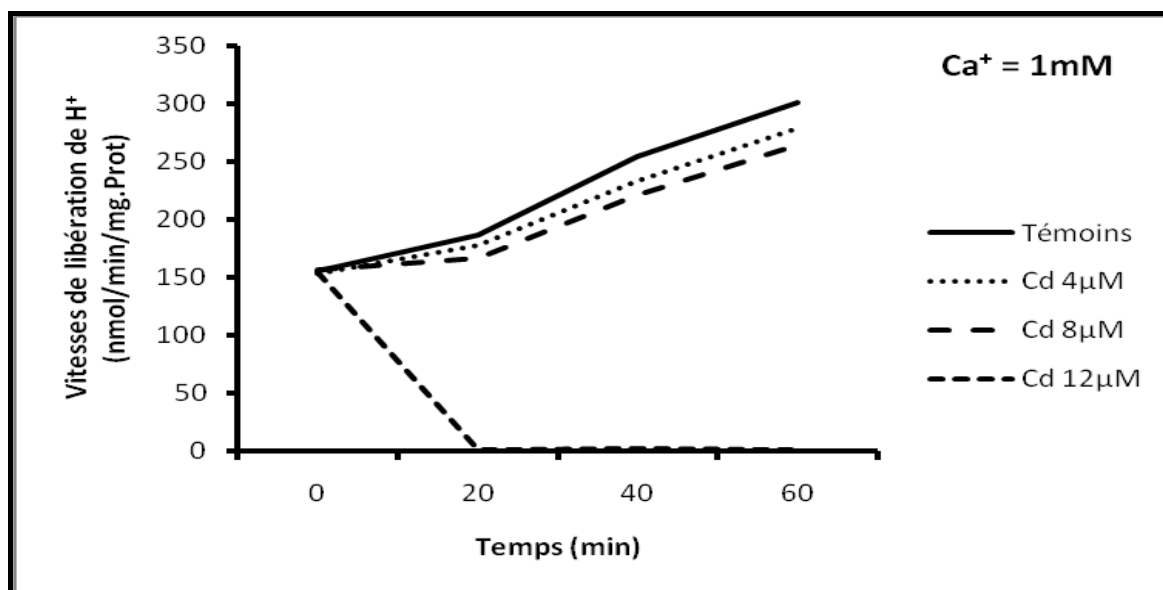
L'évolution de l'activité ATPasique observée en présence de calcium 1mM est la même que celle obtenue à 0,5mM, avec cependant un maximum enregistré à 4μM Cd<sup>+</sup>, (environ 1,5 fois plus élevé que les valeurs de l'activité ATPasique enregistrée chez les mitochondries témoins). Cette activité est très sensible à l'oligomycine et les valeurs obtenues sont très faibles. Il faut noter cependant que la présence d'oligomycine n'inhibe pas complètement cette activité.

L'évaluation de l'activité d'hydrolyse de l'ATP par la seconde technique (estimation des variations de pH) est présentée dans la figure 24a pour la concentration Ca<sup>+</sup> = 0,5mM et 24b pour la concentration Ca<sup>+</sup> = 1mM.



**Figure 24a.** Evolution des vitesses de libération des protons dans les mitochondries de Pomme de Terre au cours du traitement combiné Ca<sup>+</sup>/Cd<sup>+</sup> à 25°C. La mesure de la vitesse de libération des H<sup>+</sup> lors de l'addition de l'ATP est décrite dans le chapitre I.

On constate que les vitesses de libération de H<sup>+</sup> sont très proches de celle enregistrée chez les mitochondries témoins et ce pour les concentrations 4 et 8 µM cadmium. Au-delà de cette concentration les valeurs de ces vitesses sont nulles. L'addition d'oligomycine donne la même évolution avec cependant une réduction des valeurs obtenues d'environ 50%.

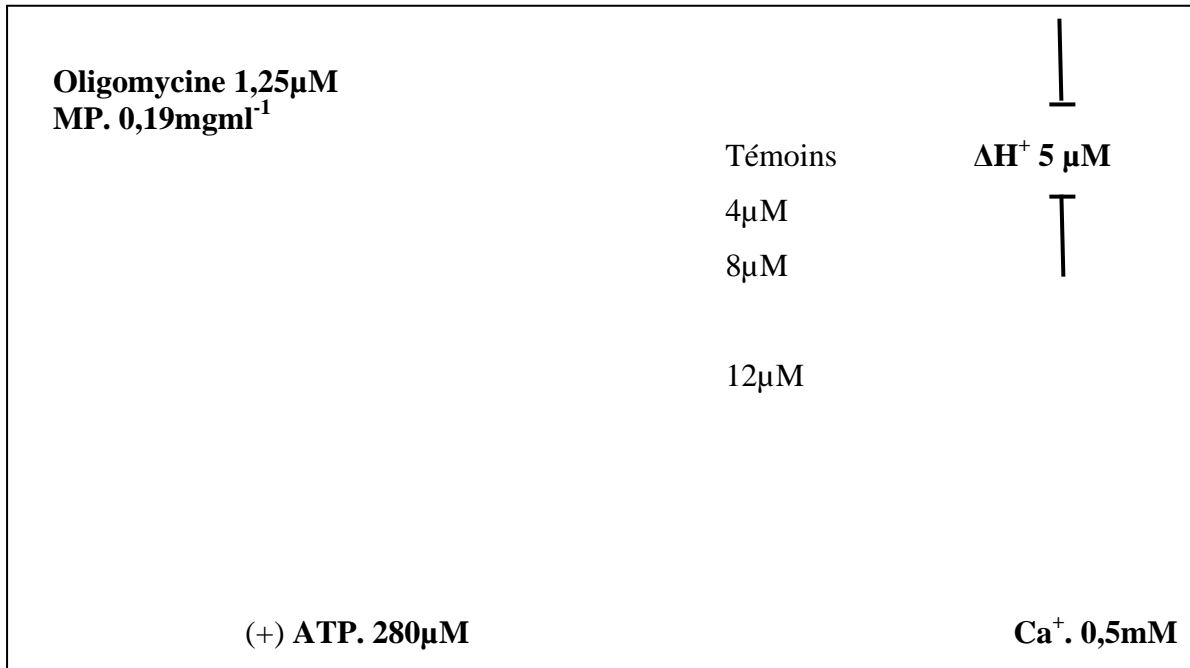


**Figure 24b.** Evolution des vitesses de libération des protons dans les mitochondries de Pomme de Terre au cours du traitement combiné  $\text{Ca}^+/\text{Cd}^+$  à  $25^\circ\text{C}$ . La mesure de la vitesse de libération des  $\text{H}^+$  lors de l'addition de l'ATP est décrite dans le chapitre I.

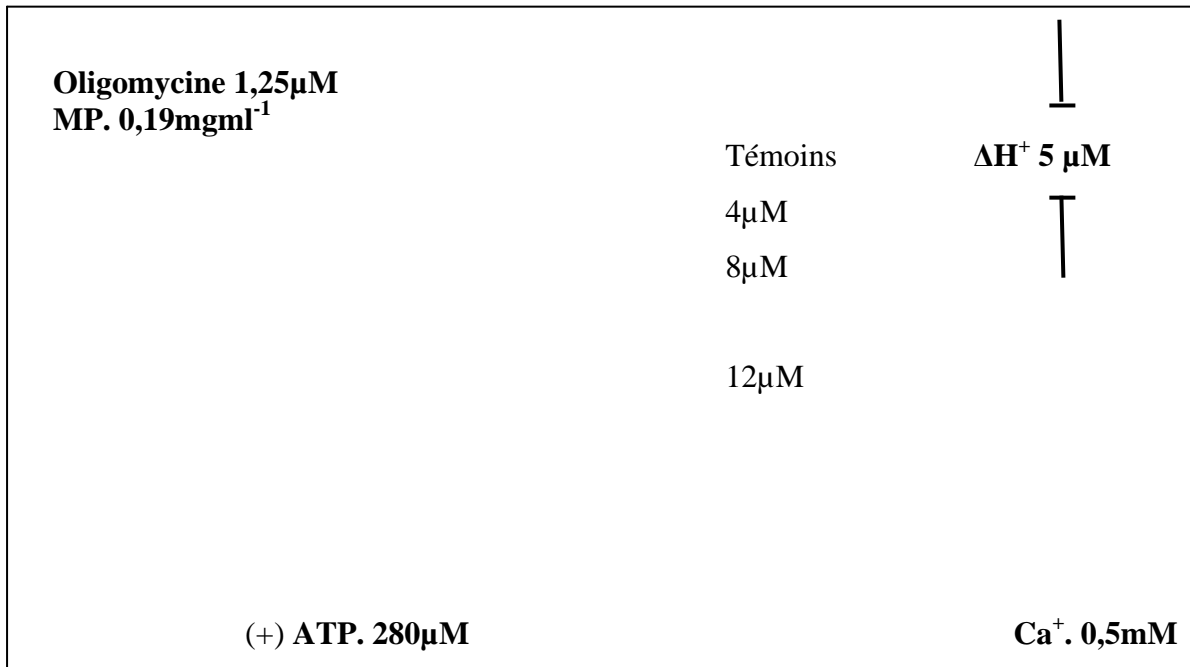
Sur cette figure, on constate que le traitement combiné avec  $\text{Ca}^+ = 1\text{mM}$  donne des vitesses de libération de protons légèrement inférieures à celle des mitochondries témoins. A  $12\ \mu\text{M}$   $\text{Cd}^+$  la vitesse de libération de  $\text{H}^+$  est nulle. Concernant l'acidification du milieu (due peut être à l'hydrolyse de l'ATP), la concentration  $0,5\text{mM}$   $\text{Ca}^+$  provoque une légère diminution de l'acidification du milieu. Ce qui est aussi le cas pour la concentration de  $\text{Ca}^+ = 1\text{mM}$ . Enfin, le traitement  $\text{Cd}^+/\text{Ca}^+$  avec  $0,5\text{mM}$   $\text{Ca}^+$  ne semble pas modifier la consommation de protons  $\text{H}^+$ . Ce résultat semble indépendant de la concentration de calcium dans le milieu. La présence d'oligomycine réduit aussi faiblement les valeurs obtenues sans pour autant changer le profil général de l'évolution de cette activité.

## 5. Variations du pH :

Une expérience typique de la mesure des variations de pH ( $\Delta\text{pH}$ ) du milieu de mesure est présentée dans la figure 25. Elle est réalisée en absence d'oligomycine 25a et présence d'oligomycine 25b avec une concentration de calcium égale à  $0,5\text{mM}$  et seulement pour 3 concentrations de cadmium à savoir 4, 12 et  $20\ \mu\text{M}$ . La concentration d'oligomycine est de  $1,25\ \mu\text{M}$ .

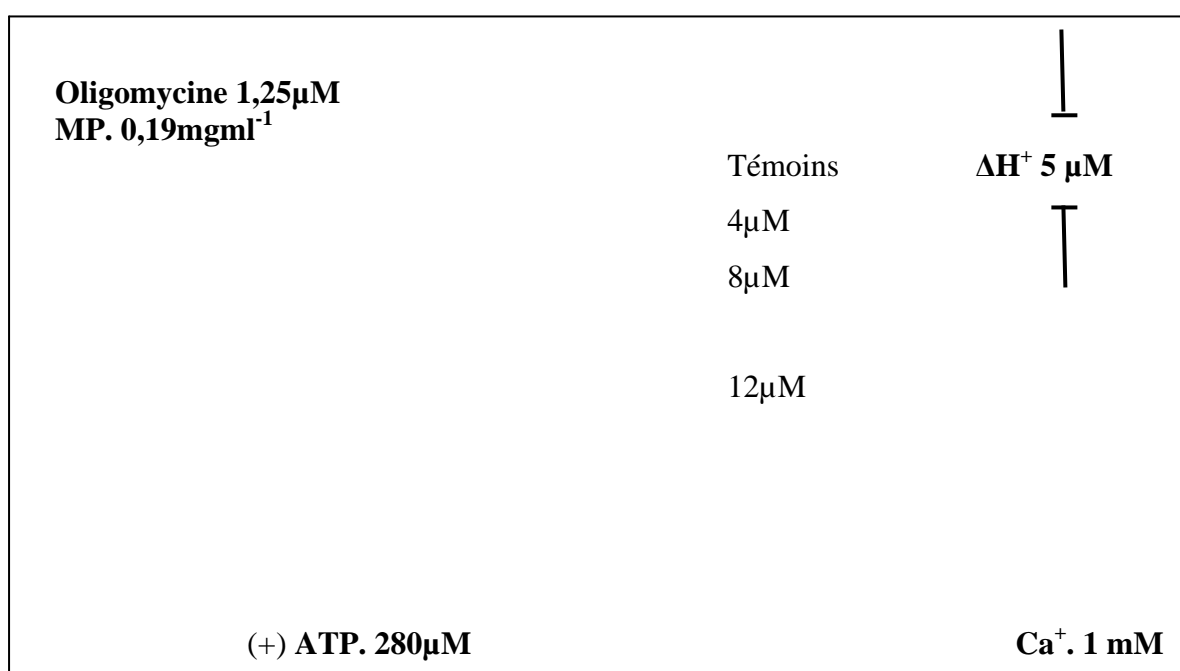


**Figure 25a.** Enregistrement des variations de pH du milieu de mesure des mitochondries de Pomme de Terre traitées par la combinaison Cd<sup>+</sup>/Ca<sup>+</sup> à 25°C. Les mesures de pH sont réalisées sur des mitochondries fraîches (0,19 mg protéines ml<sup>-1</sup>, en absence d'oligomycine « a »).



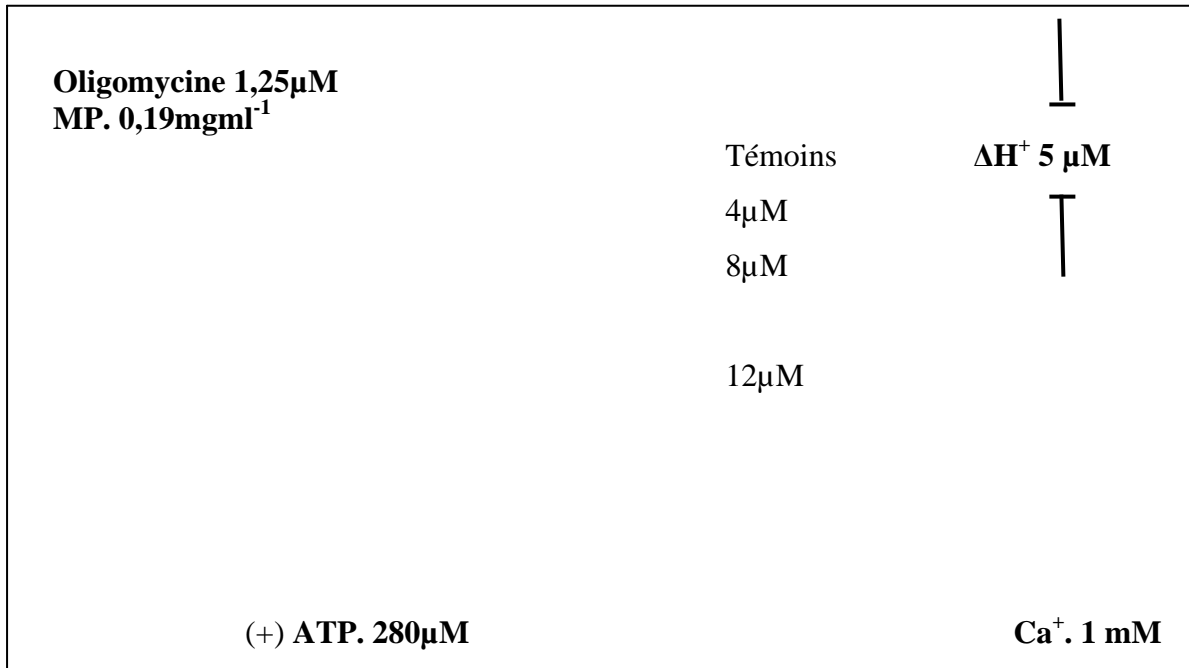
**Figure 25b.** Enregistrement des variations de pH du milieu de mesure des mitochondries de Pomme de Terre traitées par la combinaison Cd<sup>+</sup>/Ca<sup>+</sup> à 25°C. Les mesures de pH sont réalisées sur des mitochondries fraîches (0,19 mg protéines ml<sup>-1</sup>, en présence d'oligomycine « b »).

La figure 26 représente les variations de pH du milieu de mesure des mitochondries de Pomme de Terre soumises au traitement combiné Ca/Cd à 25°C, en présence à la concentration de calcium de 1mM et aux trois concentrations de cadmium 4, 12 et 20µM en absence d'oligomycine a. Protéines mitochondriales = 0,19mg/ml). La figure 26b représente les mêmes variations de pH mesurées dans les mêmes conditions mais avec une concentration de calcium égale à 1mM.



**Figure 26a.** Enregistrement des variations de pH du milieu de mesure des mitochondries de Pomme de Terre traitées par la combinaison Cd<sup>+</sup>/Ca<sup>+</sup> à 25°C. Les mesures de pH sont réalisées sur des mitochondries fraîches (0,19 mg protéines ml<sup>-1</sup>, en absence d'oligomycine « b » à une concentration de calcium = 1mM.

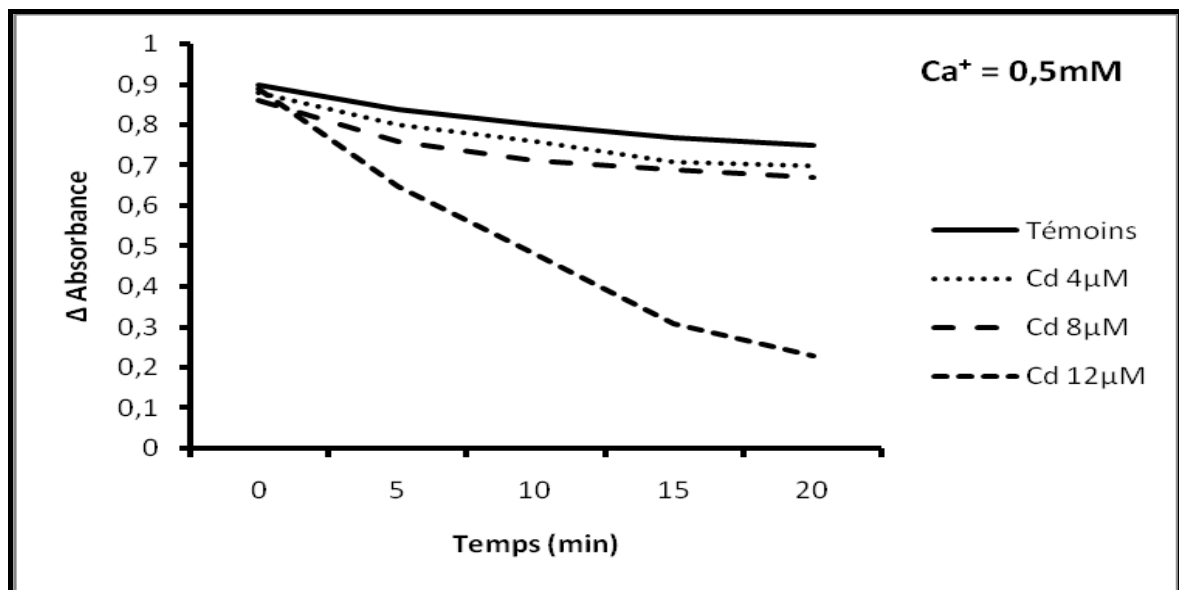
Les figures montrent que les variations de pH enregistrées dans les deux cas sont proches ce qui semble indiquer que l'activité protoniques enregistrée n'est pas de type ATPasique.



**Figure 26b.** Enregistrement des variations de pH du milieu de mesure des mitochondries de Pomme de Terre traitées par la combinaison Cd<sup>+</sup>/Ca<sup>+</sup> à 25°C. Les mesures de pH sont réalisées sur des mitochondries fraîches (0,19 mg protéines ml<sup>-1</sup>, en présence d'oligomycine « b » à une concentration de calcium = 1mM.

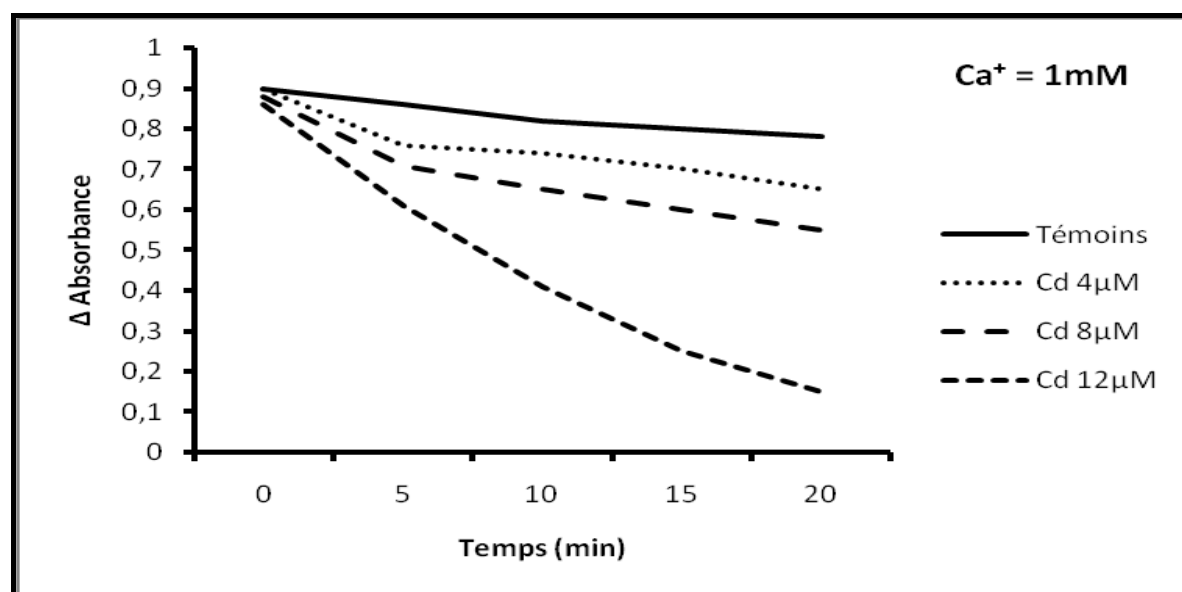
## 6. Variations du volume mitochondrial :

Les résultats des changements d'absorbance associées aux variations du volume mitochondrial sont représentés sur la figure 26c pour la concentration de calcium 0,5mM et figure 26d pour la concentration 1mM calcium.



**Figure 26c.** Effets du traitement combiné  $\text{Ca}^+/\text{Cd}^+$  sur les variations de volume des mitochondries isolées de Pomme de Terre. Concentration de calcium = 0,5mM.

Cette figure montre qu'à la concentration de 0,5mM calcium, les effets du cadmium semblent plutôt faibles à 4 $\mu\text{M}$  et 8 $\mu\text{M}$ . Au-delà de ces concentrations un gonflement important est obtenu à 12 $\mu\text{M}$  cadmium. Pour les concentrations supérieures à 12 $\mu\text{M}$  cadmium les mitochondries isolées sont mortes.

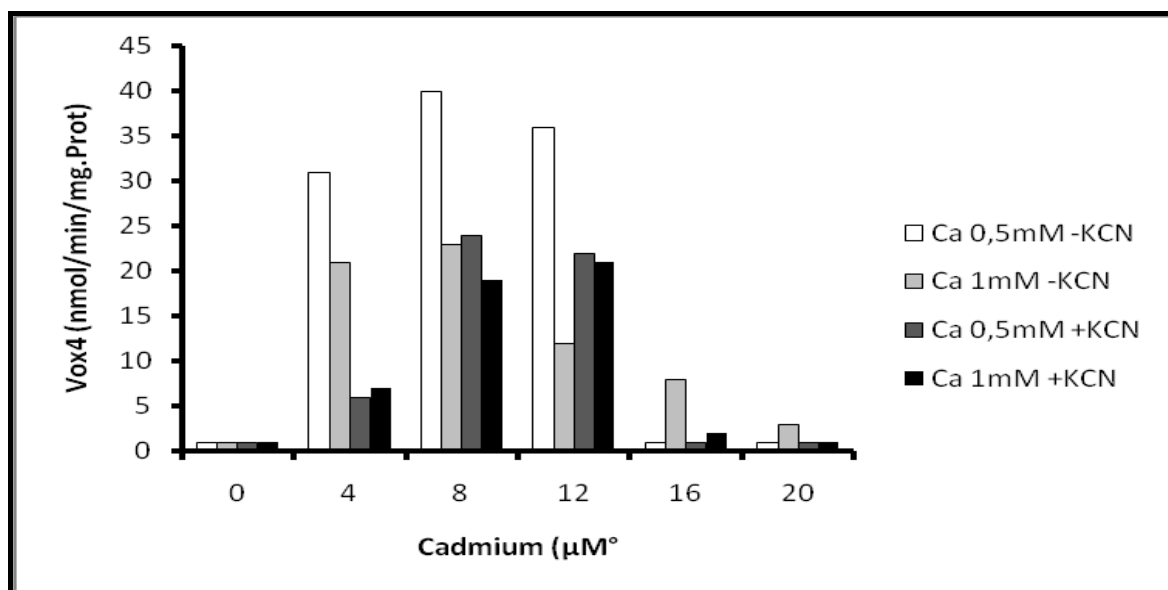


**Figure 26d.** Effets du traitement combiné  $\text{Ca}^+/\text{Cd}^+$  sur les variations de volume des mitochondries isolées de Pomme de Terre. La concentration de calcium est de 1mM.

On constate que le traitement combiné en présence de 1mM calcium stimule faiblement le gonflement mitochondrial et ce à 4 et 8 $\mu\text{M}$  cadmium. Une très forte amplification de ce dernier est cependant observée à 12 $\mu\text{M}$  cadmium. Celle-ci est d'environ 9 fois plus importante que celle enregistrée chez les mitochondries témoins.

## 7. La voie respiratoire alternative :

Les effets du traitement combiné  $\text{Ca}^+/\text{Cd}^+$  sur la voie respiratoire alternative des mitochondries de Pomme de terre sont représentés sur la figure 27.



**Figure 27.** Effets du traitement combiné  $\text{Cd}^+/\text{Ca}^+$  sur les activités oxydatives des mitochondries isolées de Pomme de Terre (Vitesses d'oxydations en état non phosphorylant «  $\text{Vox}_4$  » de la voie alternative de transfert d'électrons insensible au cyanure). Protéine mitochondriale : 0,1 ml/ml. Concentration de KCN : 1 mM.

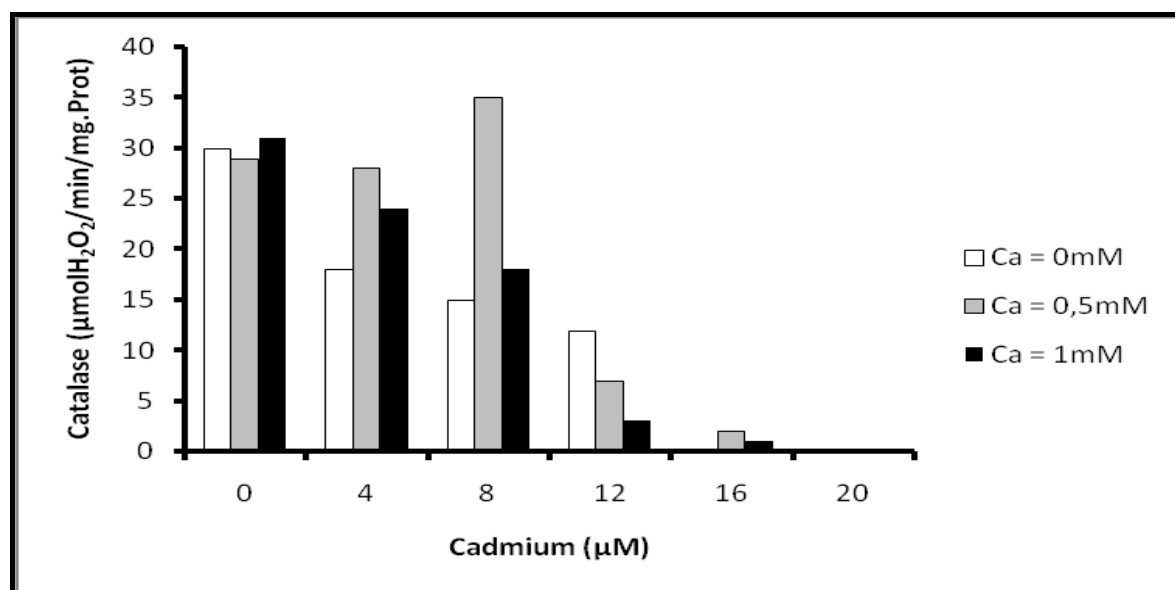
Cette figure montre que le traitement combiné  $\text{Ca}^+/\text{Cd}^+$  stimule la voie alternative respiratoire (30 fois plus élevée à  $4\mu\text{M}$  cadmium et à  $0,5\text{mM}$  calcium) et (40 fois plus élevée à  $8\mu\text{M}$  cadmium et  $0,5\text{mM}$  calcium). A  $8\mu\text{M}$  cadmium, on enregistre une activité alternative maximale avec 41 nmoles /min/mg Prot., (environ 41 fois supérieure à la valeur enregistrée chez les mitochondries témoins). Elle est réduite d'environ 40% à la concentration de  $1\text{mM}$  calcium. Au-delà de  $8\mu\text{M}$  cadmium, le traitement combiné semble plutôt provoquer l'inhibition de la voie alternative résistante au KCN. Il faut noter cependant que le KCN semble sans aucun effet sur l'activité alternative respiratoire.

## 8. Dosages enzymatiques :

### 8.1. Dosage de l'activité catalase :

Le dosage de l'activité catalase des mitochondries de Pomme de terre a été réalisé sur des mitochondries traitées par le cadmium en présence de deux

concentrations de calcium : 0,5m M et 1mM. Les résultats obtenus sont représentés sur la figure 28.

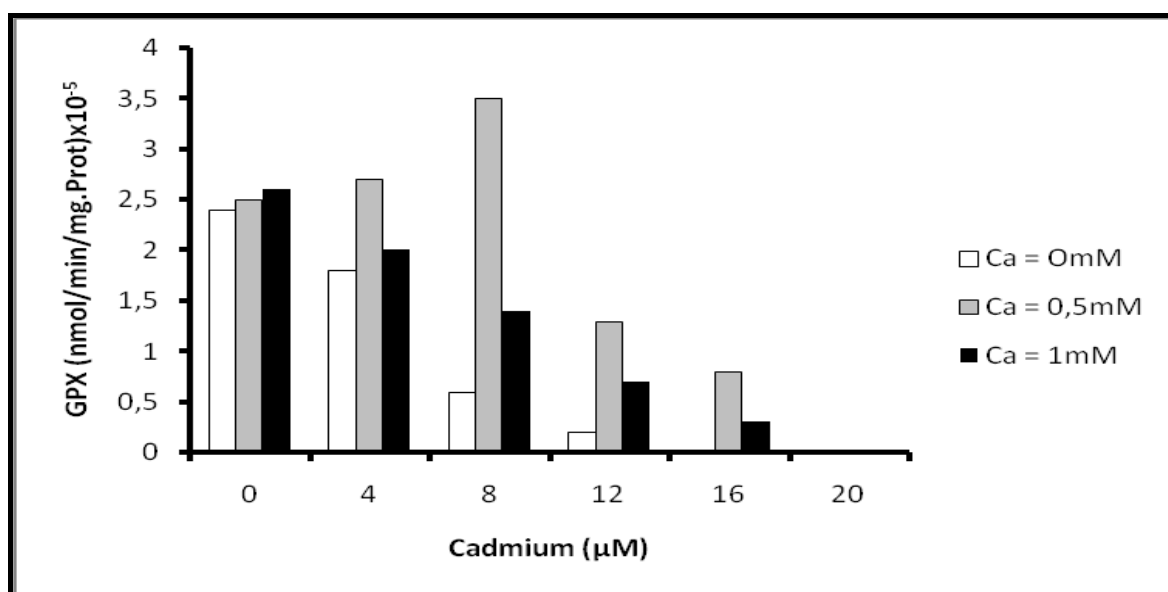


**Figure 28.** Effets du traitement combiné  $\text{Ca}^+/\text{Cd}^+$  sur l'activité enzymatique Catalase des mitochondries isolées de Pomme de Terre. Concentration des protéines : 0,1 mg/ml.

Sur cette figure, on constate que l'activité catalase est faiblement stimulée en présence de  $\text{Ca}^+$  0,5mM et aux concentrations 0,5 et 1mM Cd (à 8µM Cd l'augmentation obtenue est de 30% environ). Au-delà de cette concentration, l'activité catalase est fortement réduite. Le même type d'évolution est obtenu avec le calcium à 1mM. Cependant, il est important de noter que toutes les valeurs obtenues avec 1mM  $\text{Ca}^+$  sont pratiquement 2 fois moins élevées que celles enregistrées avec 0,5m M  $\text{Ca}^+$ .

## 8.2. Dosage de l'activité GPX :

La figure 29 représente les résultats du dosage de l'activité GPX chez les mitochondries de Pomme de Terre traitées par le cadmium et le calcium (0,5 et 1mM ).

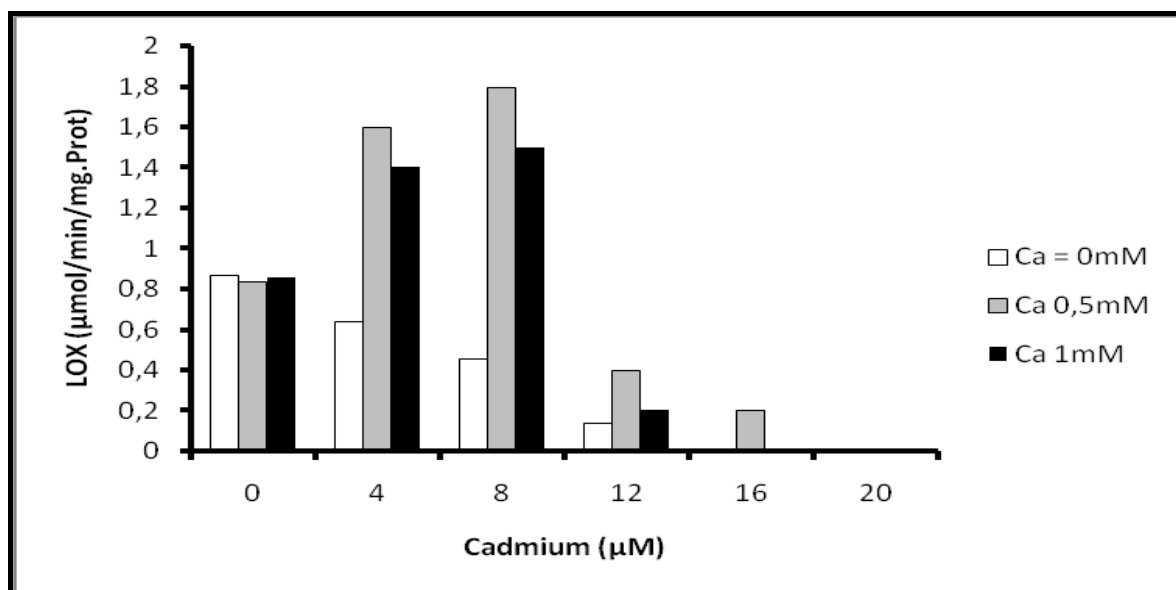


**Figure 29.** Effets du traitement combiné  $\text{Ca}^+/\text{Cd}^+$  sur l'activité enzymatique peroxydase (GPX) des mitochondries isolées de Pomme de Terre. Concentration des protéines : 0,1 mg/ml.

On constate que l'activité GPX est fortement stimulée par le traitement combiné avec du calcium 0,5mM et à 4 et 8μM cadmium (environ 10 et 20%). Le traitement, aux mêmes concentrations et avec du calcium 1mM, semble plutôt réduire cette activité. Au-delà de 16μM cadmium l'activité enzymatique GPX est totalement inhibée.

### 8.3. Dosage de l'activité lipoxygénase :

La figure 31 représente les résultats obtenus quant aux variations de l'activité lipoxygénase des mitochondries de Pomme de Terre en présence de concentrations croissantes de cadmium et de calcium à 0,5 et 1mM.



**Figure 30.** Effets du traitement combiné  $\text{Cd}^+/\text{Ca}^+$  sur l'activité enzymatique lipoxygénase (LOX) des mitochondries isolées de Pomme de Terre. Concentration des protéines : 0,1 mg/ml.

Sur cette figure, on enregistre d'abord une stimulation (50%) en présence de  $\text{Ca}^+$  0,5m M) à 4 et 8 $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^+$ . Une faible augmentation de cette activité est ainsi observée à 1mM  $\text{Ca}^+$  associé à 4 $\mu\text{M}$  et 8 $\mu\text{M}$   $\text{Cd}^+$ . Aux fortes concentrations, le traitement combiné  $\text{Cd}^+/\text{Ca}^+$  provoque une inhibition totale de l'activité lipoxygénase.

## 9. Variations du contenu lipidique :

Les variations du contenu lipidique en acides gras des mitochondries de Pomme de Terre ont été déterminé en fonction du traitement combiné  $\text{Cd}^+/\text{Ca}^+$ . Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau 11.

**Tableau 11:** Effets du traitement combiné  $\text{Ca}^+/\text{Cd}^+$  sur les variations du contenu lipidique en acides gras des lipides polaires des mitochondries isolées de Pomme de terre.

Cadmium( $\mu\text{M}$ ) Calcium(mM)	Contenu en acides gras (%)					
	Ac. Palmitique ( $\text{C}_{16:0}$ )		Ac. Linoléique ( $\text{C}_{18:2}$ )		Ac. Linoléique ( $\text{C}_{18:3}$ )	
	0,5	1	0,5	1	0,5	1
0	15	17	10	12	30	25
4	16	17	10	11	28	24
8	17	18	08	10	27	22
12	12	13	06	07	15	22
16	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
20	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd

Sur ce tableau, on constate que les taux d'acide palmitique sont légèrement augmentés jusqu'à la concentration de  $8\mu\text{M Cd}^+$  et à  $0,5\text{m M Ca}^+$ . Au-delà de  $8\mu\text{M Cd}^+$ , une forte réduction des taux d'ac. palmitique est enregistrée. Concernant les taux d'ac. linoléique ( $\text{C}_{18:2}$ ), ils sont stables à  $0,5\text{m M Ca}^+$  et tendent à baisser au delà de  $8\mu\text{M Ca}^+$ . A  $1\text{mM Ca}^+$ , une baisse légère est observée, elle devient plus importante au double de  $8\mu\text{M Cd}^+$ . Les taux d'ac. linoléique ( $\text{C}_{18:3}$ ) enregistrés sont les plus importants. Le traitement avec  $0,5\text{mM}$  et même  $1\text{mM Ca}^+$  réduisent fortement ses taux.

En conclusion, les traitements combinées  $\text{Cd}^+/\text{Ca}^+$  ont tendance d'une part à stimuler légèrement les taux en acide palmitique et d'autre part à réduire ceux des acides linoléique et linoléique.

Dans ce chapitre, nous nous proposons de discuter les résultats obtenus dans notre travail de recherche. Ces résultats concernent les effets du cadmium, du calcium et les interactions cadmium/calcium sur les propriétés oxydophosphorylantes des mitochondries isolées et purifiées à partir de Pomme de terre. Une étude comparative sera par la suite entreprise afin de comparer nos résultats avec ceux présentés dans la bibliographie.

### **1. Effets du cadmium sur les mitochondries isolées de Pomme de Terre :**

Ce travail a été entrepris dans le but d'étudier les effets du cadmium sur les mitochondries de Pomme de Terre afin de vérifier si ce métal lourd affectait la respiration et les mouvements des charges associés à la transduction de l'énergie dans les mitochondries isolées.

En effet, l'une des théories concernant le mécanisme d'action du cadmium qui a été souvent proposée invoque le concept selon lequel le cadmium provoque directement des altérations de la membrane à l'origine des perturbations fonctionnelles des mitochondries (Kondoh *et al.*, 2001). Certaines études ont permis de montrer que les caractéristiques membranaires des mitochondries pouvaient être altérées sous l'action du cadmium (Jaswant *et al.*, 1996; Simpkins *et al.*, 1998; Shih *et al.*, 2005; Zang *and al.*, 2008; Chagra *et al.*, 2009). Par exemple, il a été montré qu'un traitement par le cadmium à la concentration de 25µM provoquait une forte perturbation de la respiration mitochondriale (Kessler *et al.*, 1994).

Un traitement par le cadmium (20 $\mu$ M) était aussi capable d'altérer la synthèse de protéines (Kieffer *et al.*, 2008) et causer une oxydation des protéines (Reinheckel *et al.*, 1998) suite à un stress oxydatif à l'origine de la production d'espèces réactives à l'oxygène (ROS), (Blackburn, 2007), tandis qu'un gonflement des mitochondries pouvait être observé lors de traitement par le cadmium à la concentration de 30 $\mu$ M (Zang *et al.*, 2008; Chagra *et al.*, 2009). Parallèlement, il a été noté que le cadmium altère la structure membranaire des cellules de tabac (Reese et Roberts, 1985). Chez le blé, ce métal lourd était capable d'induire un sénescence prématurée (Ouzounidou *et al.*, 1997) et pouvait induire des dysfonctionnements importants dans la mobilisation des réserves (Mihoub *et al.*, 2004).

Il a été noté parallèlement que le cadmium pouvait s'accumuler à des taux élevés dans les tissus et les racines et que cette accumulation était liée à la structure membranaire de l'organisme en question (Xingfu, 1990). Ainsi de fortes concentrations de cadmium étaient capables d'inhiber totalement la croissance de certaines plantes sans pour autant provoquer leur mort et ce grâce à la mise en évidence de système de tolérance particulièrement chez la tomate (Delpérée et Lutts, 2008). D'autres travaux montrent que la température influe fortement sur les effets du cadmium (Blackburn, 2007) ; en effet celle-ci conjuguée au cadmium provoque une inhibition totale de certaines protéines intervenant dans la protection des mitochondries contre les ROS générées par le stress oxydatif du au couple cadmium/température. Selon Ouariti *et al.*, 1997, le cadmium est capable de transformation importante dans la nature même des lipides membranaires.

Parallèlement à ces recherches, il a été rapporté que le cadmium pouvait stimuler certaines enzymes dites de détoxification tels (la catalase, la GPX, ou encore l'APX), ces enzymes interviennent dans l'élimination du cadmium (Sbartai *et al.*, 2008; Chagra *et al.*, 2009).

Malgré ces observations, aucun changement important n'était noté au niveau du découplage des phosphorylations (rapport ADP/O) ou du contrôle respiratoire (CR) lors d'un traitement des mitochondries par le cadmium. Certains chercheurs ont montré que le cadmium était capable d'inhiber la photosynthèse (Greger et Ogren, 1991). D'autres par contre mettent en évidence le fait que le cadmium pourrait interférer avec la chaîne de transfert des électrons chez les mitochondries inhibant ainsi la croissance de ces organites et altérant leur fonctionnement (Brierley, 1977; Weinberg *et al.*, 1995). Des effets directs du cadmium sur la synthèse de l'ATP et par conséquent sur la balance énergétique des mitochondries ont été rapportés par Miller *et al.*, 1983 et Bonaly *et al.*, 1986.

Ces quelques considérations, ainsi que l'ensemble des données bien connues concernant le rôle du cadmium dans l'altération de nombreuses fonctions des tissus végétaux, explique que les mitochondries constituent encore actuellement un compartiment cellulaire très attractif pour les recherches concernant aussi bien les effets du cadmium que les mécanismes d'action de ce métal lourd (Chagra *et al.*, 2009).

Dans ce travail nous avons réexaminé le problème de l'action du cadmium au niveau des mitochondries isolées à la lumière des données actuelles concernant le mécanisme chimiosmotique de la conservation de l'énergie (Mitchell, 1979).

En effet, selon cette théorie, largement admise aujourd'hui, la transduction de l'énergie des oxydations respiratoires s'effectue par l'intermédiaire d'une différence transmembranaire de potentiel électrochimique de protons générée par la chaîne respiratoire ( $\Delta P\mu H^+$ ).

Ce  $\Delta\mu\text{H}^+$  est ensuite utilisé pour diriger la synthèse de l'ATP au niveau de l'ATP synthétase. Le potentiel électrochimique de protons présente deux composantes, un ( $\Delta\text{pH}$ ) et ( $\Delta\Psi$ ). Dans le cas des mitochondries végétales, le  $\Delta\Psi$  constitue la composante quasi unique du  $\Delta\mu\text{H}^+$  (Diolez, 1985). Or le potentiel de membrane est directement lié à la perméabilité de la membrane mitochondriale interne aux protons et aussi dans une certaine mesure aux cations (Mitchell, 1979; Nicholls, 1982; Diolez, 1985; Djebbar et Djebbar, 2000). En effet, le potentiel de membrane est lié à la valeur de la conductance aux protons par la relation :

$$\Delta\mu\text{H}^+ = V_{\text{ox}} / C_{\text{mH}^+} \quad (\text{Diolez, 1985; Djebbar et Djebbar, 2000})$$

De plus, l'existence d'un antiport  $\text{H}^+/\text{K}^+$  dans les mitochondries végétales (Diolez et Moreau, 1985), rend le potentiel de membrane très largement dépendant de la conductance des membranes mitochondriales au potassium.

Pour cette raison, il est apparu intéressant d'examiner plus en détail l'action du cadmium sur les mitochondries végétales. Cette étude a été réalisée sur des mitochondries purifiées sur percoll. Les mesures de potentiel de membrane ont été réalisées à l'aide d'une électrode spécifique au  $\text{TPP}^+$  (Kamo, 1979). Le traitement des mitochondries a été réalisé en utilisant des concentrations de cadmium variant de  $4\mu\text{M}$  à  $20\mu\text{M}$ . Ces concentrations ont été choisies en raison des données concernant l'effet du cadmium sur le gonflement des mitochondries (Shih *et al.*; 2005; Zang *et al.*, 2008).

Nous avons ensuite déterminé les valeurs des paramètres des phosphorylations oxydatives (vitesse d'oxydation, CR, ADP/O) et les valeurs du potentiel de membrane en état phosphorylant et non phosphorylant. Nous avons aussi déterminé les variations des activités ATPasiques ainsi que celles de la voie alternative résistante au cyanure des mitochondries soumises au traitement par le cadmium.

L'analyse des variations de pH ( $\Delta\text{pH}$ ) a été entreprise dans le but de mesurer les changements éventuels d'activités ATPasiques ou autres variations d'acidité du milieu de mesure pouvant traduire des changements éventuels de perméabilité membranaire des mitochondries. Parallèlement à cela, des mesures de variabilité du volume mitochondrial sous l'effet du cadmium ont été effectuées. Enfin, des analyses du contenu lipidique et un suivi des activités enzymatiques intervenants dans la détoxification ont été entreprises afin de vérifier l'effet du cadmium sur les mitochondries isolées de Pomme de Terre.

Les résultats exposés dans ce mémoire montrent que la vitesse de l'oxydation du succinate par les mitochondries isolées est diminuée par le cadmium (50% environ). D'autre part, on constate que la vitesse en état non phosphorylant (état 4) n'est que très peu modifiée au cours du traitement. On obtient donc une diminution du contrôle respiratoire. De plus, les valeurs des rapports ADP/O tendent également à diminuer au cours de ce traitement.

Cependant, une observation importante peut être notée. L'effet du cadmium sur les capacités oxydatives et phosphorylantes des mitochondries n'est réellement observé qu'à partir des concentrations 8, 12 et 20 $\mu\text{M}$ , puisque qu'à la plus faible concentration de cadmium on observe très peu d'effet du cadmium, une légère stimulation de ces valeurs est même observée. Les mesures de la vitesse de phosphorylation dans les mitochondries traitées par le cadmium confirment les résultats concernant les vitesses d'oxydation qui indiquent une inhibition progressive de l'activité des préparations mitochondriales. Cette diminution d'activité est due au traitement par le cadmium.

Les mesures de variations de potentiel de membrane montrent que le cadmium a tendance à réduire fortement ces valeurs (+ de 50%). Cette baisse du  $\Delta\Psi$  serait directement responsable de la chute du  $\Delta\text{P}\mu\text{H}^+$  généré par l'oxydation du succinate.

Les mesures d'activité d'hydrolyse de l'ATP par les préparations mitochondriales suggèrent qu'une activité ATPasique est enregistrée et que le traitement par le cadmium modifie celle-ci dans le sens d'une diminution (50%). Cette activité est de type ATPase mitochondriale sensible à l'oligomycine. Parallèlement, on constate qu'une activité ATPasique importante insensible au cyanure se développe au cours du traitement des mitochondries et que le cadmium stimule fortement cette évolution.

Les résultats relatifs aux effets du cadmium sur les variations de volume des mitochondries montrent qu'une modification importante du volume mitochondrial est observée, celle-ci atteint 90%. Ce gonflement vient confirmer la baisse de  $\Delta\Psi$  obtenue et par la même, la stimulation de la perméabilité membranaire des mitochondries traitées.

Le suivi des variations de protons  $H^+$  ( $\Delta pH$ ) montre qu'une acidification importante du milieu de mesure est observée en présence de cadmium. Celle-ci augmente avec la concentration de cadmium. Ce résultat vient confirmer l'importance de la perméabilité induite par le cadmium. L'addition d'oligomycine provoque environ 50% d'inhibition de cette activité. Ce qui semble indiquait que l'acidité du milieu enregistrée en présence de cadmium serait due à moitié à une activité ATPasique typiquement mitochondriale et que l'autre moitié de l'activité enregistrée serait plutôt non mitochondriale.

Enfin, les mesures des activités enzymatiques catalase et guaiacol-Peroxydase montrent que les faibles concentrations de cadmium stimulent ces activités et les fortes concentrations de cadmium les réduisent fortement. Ceci pourrait traduire en fait la mise en évidence d'un système de détoxification du cadmium qui devient en présence de concentrations importantes de cadmium inefficace et se retrouve ainsi inhibé.

Le dosage de l'activité lipoxygénase chez les mitochondries traitées par le cadmium montre que cette activité est très fortement stimulée. Cette forte stimulation de la LOX associée aux taux importants enregistrés en acide linoléique et linoléique, principaux substrats de l'enzyme, sera traduite par une très forte production d'hydroperoxydes d'hydrogène (ROS), qui sont de potentiels destructeurs des membranes mitochondriales.

## **2. Effets du calcium sur les mitochondries isolées de Pomme de Terre:**

Cette partie du travail a été entreprise dans le but de vérifier les effets du calcium sur les mitochondries de Pomme de Terre afin de déterminer si cet ion dont la structure est connue comme très proche de celle du cadmium, affectait la respiration et les mouvements des charges associés à la transduction de l'énergie dans les mitochondries isolées.

En effet, beaucoup de travaux soulignent la similitude qui existe entre les mécanismes d'action du cadmium et celui du calcium. On a souvent proposé que le cadmium altère les fonctions du calcium et vice versa (Jaswant *et al.*, 1996). Certaines études ont permis de montrer que les paramètres des phosphorylations oxydatives des mitochondries pouvaient être altérées (inhibition) sous l'action du calcium (Shih *et al.*, 2005). Par exemple, il a été montré qu'un traitement par le calcium à des concentrations supraphysiologiques provoquait une inhibition de la consommation de l'oxygène par les mitochondries (Simpkins *et al.*, 1998).

Parallèlement, les flux calciques pouvaient être fortement stimulés par les méthalthionéines. Cette action serait plutôt synergique et interviendrait chez les plantes soumises à un stress oxydatif. Le calcium libre traverse les membranes grâce à un système d'antiport  $H^+ / Ca^{2+}$  consommateur d'énergie (ATP).

Les antiporteurs  $H^+ / Ca^{2+}$  qui sont localisés dans la membrane plasmique et le tonoplaste (Robert et Roland, 1998; Sanders *et al.*, 2002) favorisent le transport du calcium et sa séquestration dans le compartiment endomembranaire par le maintien d'une force motrice de protons  $\Delta P\mu H^+$ .

Tenant compte de toutes ces observations, nous avons jugé utile d'examiner l'action du calcium sur les mitochondries végétales. Le traitement des mitochondries a été réalisé en utilisant des concentrations de calcium ; 0,1 ; 0,5, 1, 2 et 3mM. Ces concentrations ont été choisies en raison des données concernant l'effet du calcium sur le gonflement des mitochondries (Kondoh *et al.*, 2000).

Les résultats exposés dans ce mémoire montrent que la vitesse de l'oxydation du succinate par les mitochondries isolées est légèrement affectée par le calcium (réduction à partir de 1mM). D'autre part, on constate que la vitesse en état non phosphorylant (état 4) n'est que très peu modifiée au cours du traitement. On obtient donc une faible diminution du contrôle respiratoire. De plus, les valeurs des rapports ADP/O tendent également à diminuer légèrement au cours de ce traitement.

Cependant, il faut noter que les effets observés avec le calcium ne sont visibles qu'à partir de la concentration 1mM. Les mesures de la vitesse de phosphorylation dans les mitochondries traitées par le calcium confirment les résultats concernant les vitesses d'oxydation qui indiquent une faible inhibition progressive de l'activité des préparations mitochondriales. Cette diminution d'activité est due à l'utilisation de concentrations supraphysiologiques de calcium.

Les mesures de variations de potentiel de membrane montrent que le calcium a tendance à réduire ces valeurs (+ de 20%). Cette baisse ~~est~~ serait directement responsable de la perturbation  $d\Delta P\mu H^+$  généré par l'oxydation du succinate. Cependant celle-ci reste peu importante.

Les mesures d'activité d'hydrolyse de l'ATP par les préparations mitochondriales suggèrent qu'une activité ATPasique est enregistrée et que le traitement par le calcium modifie celle-ci dans le sens d'une diminution (20%). Cette activité est de type ATPase mitochondriale sensible à l'oligomycine. Parallèlement, on constate qu'une activité ATPasique importante insensible au cyanure se développe au cours du traitement des mitochondries et que le calcium stimule fortement cette évolution (15 fois).

Les résultats relatifs aux effets du calcium sur les variations de volume des mitochondries montrent qu'une modification moyenne du volume mitochondrial est observée, celle-ci atteint 20%. Ce gonflement justifie un peu la baisse du  $\Delta\Psi$  obtenue et par la même, une éventuelle stimulation de la perméabilité membranaire des mitochondries traitées.

Le suivi des variations de protons  $H^+$  ( $\Delta pH$ ) montre qu'une acidification assez importante du milieu de mesure est observée en présence de calcium. Celle-ci est inhibée à près de 50% par l'oligomycine. Ceci prouve très bien que cette activité est du type ATPase mitochondriale.

Enfin, les mesures des activités enzymatiques catalase et guaiacol-Peroxydase montrent que les faibles concentrations de calcium stimulent ces activités et les fortes concentrations de calcium (au-delà de 1mM) les réduisent fortement.

Ainsi, la présence de calcium en fortes concentrations serait capable d'induire un stress oxydatif à l'origine du déclenchement de systèmes de détoxification de type enzymatique. Le dosage de l'activité lipoxygénase chez les mitochondries traitées par le calcium montre que cette activité n'est que très peu affectée par le calcium. Ce résultat associé aux taux relativement faibles enregistrés en acide linoléique et linoléique, laisse suggérer que le calcium à faibles concentrations reste sans effets sur la production d'hydroperoxydes d'hydrogène (ROS) pouvant être générés par l'activité enzymatique LOX.

### **3. Effets du traitement combiné $\text{Ca}^+/\text{Cd}^+$ sur les mitochondries isolées de Pomme de Terre:**

Dans cette dernière partie, nous avons tenté d'étudier les interactions cadmium/calcium à la lumière des dernières données bibliographiques en matière de compétition pouvant exister entre les deux composés chez les mitochondries isolées.

En effet, beaucoup de travaux mettent en évidence l'interaction calcium et cadmium, en effet, il a été montré qu'un traitement par le calcium influencer le déplacement du cadmium dans les racines et les feuilles de *Salvinia molesta* et que cet effet était dû à la phytotoxicité de cadmium (Jaswant *et al.*, 1996). D'autres travaux plus récents (Galvez *et al.*, 2006), montrent que certaines cellules présentent une grande affinité pour les deux éléments, ce qui explique encore la similitude existante entre le calcium et le cadmium.

Toutes ces observations, nous ont conduit à étudier les éventuelles interactions pouvant exister lors du traitement des mitochondries isolées par le cadmium et le calcium. Dans nos expérimentations, les concentrations de calcium utilisées sont 0,5 et 1mM.

Les résultats obtenus concernant cette partie montrent que les vitesses d'oxydation du succinate en état phosphorylant (état3) augmentent légèrement au début du traitement par le cadmium et en présence de 0,5mM calcium puis tendent ensuite à diminuer fortement à la concentration de 1mM calcium. Concernant les vitesses en état non phosphorylant (état4) les valeurs obtenues montrent plutôt une constance lors du traitement combiné et ce indépendamment de la concentration de calcium ajoutée. Les valeurs des CR augmentent aussi légèrement avant de diminuer à la concentration de 1mM calcium. La même évolution est constatée en ce qui concerne les rapports ADP/O, c'est-à-dire une légère augmentation à 0,5mM calcium puis une chute à 1mM calcium.

Les mesures des variations de potentiel de membrane montrent que le traitement combiné cadmium/calcium a tendance à réduire fortement ces valeurs (+ de 50%) particulièrement à partir de la concentration 12 $\mu$ M cadmium. Cette baisse du  $\Delta\Psi$  reste directement liée à la diminution du  $\Delta P_{\mu H^+}$  généré par l'oxydation du succinate.

Les mesures de l'activité ATPasique des mitochondries sous traitement combiné Ca/Cd montrent que le calcium a tendance à lever l'inhibition observée lors du traitement des mitochondries uniquement par le cadmium. L'addition d'oligomycine confirme le type d'activité mise en évidence. Cependant, deux observations importantes sont notées, d'abord l'inhibition levée en présence de calcium n'est pas totale et l'addition d'oligomycine ne provoque pas une inhibition complète des activités ATPasiques des mitochondries traitées.

Les résultats des effets du traitement combiné calcium/cadmium sur les activités ATPasiques alternatives sensibles au cyanure montrent qu'une très forte stimulation de ces voies ATPasiques est observée, ceci pourrait appuyer les résultats de Shih *et al.*, 2005 qui montrent que cette voie est toujours fortement stimulée en présence de cadmium.

Parallèlement à cela, les mitochondries traitées par la combinaison Ca/Cd présentent un gonflement important et ce en présence des deux concentrations de calcium. C'est d'ailleurs le cas dans la majorité des travaux de recherche concernant cet aspect là (Kluck *et al.*, 1997; Kondoh *et al.*, 2001; Chagra *et al.*, 2009).

Le suivi des variations de protons  $H^+$  ( $\Delta pH$ ) dans le milieu de mesure, montre qu'une acidification importante du milieu de mesure est observée suite au traitement combiné calcium/cadmium. Cependant, cette acidification du milieu reste inférieure à celle observée chez les mitochondries traitées uniquement par le cadmium. Ceci pourrait être expliqué en partie par la protection relative notée vis-à-vis du cadmium chez les mitochondries de Pomme de terre.

Enfin, les mesures des activités enzymatiques catalase et guaiacol-peroxydase montrent que les enzymes concernées ne sont faiblement affectées en présence des deux composés. Une diminution est même notée. Ceci pourrait en fait stimuler la mise en marche de système de détoxification qui deviendrait rapidement inefficaces au vue des fortes concentrations de Ca et Cd présente dans le milieu de mesure.

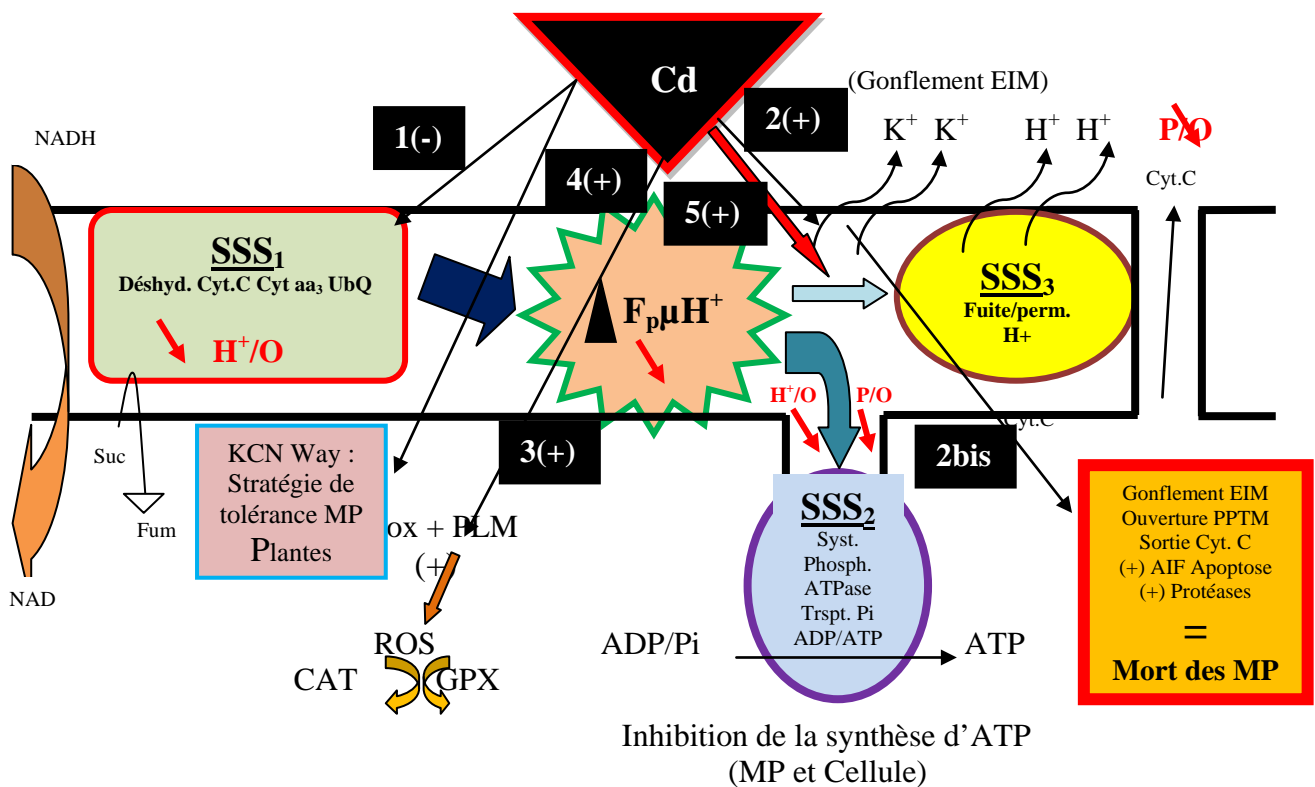
Le dosage de l'activité lipoxigénase chez les mitochondries traitées par la combinaison cadmium/calcium montre que cette activité reste fortement stimulée mais reste du moins inférieure à celle notée chez les mitochondries traitées uniquement par le cadmium seul. Cette augmentation de l'activité LOX associée aux taux assez importants enregistrés en acide linoléique et linoléique, principaux substrats de l'enzyme, serait à l'origine d'une production accrue d'hydroperoxydes d'hydrogène (ROS), éléments destructeurs des membranes mitochondriales.

L'ensemble de ces résultats indiquent que dans les conditions de traitement utilisées dans ce travail, le cadmium exerce un effet important sur la perméabilité de la membrane interne mitochondriale aux protons et cations monovalents. Il semble donc clair que les effets du cadmium sur le gonflement mitochondrial traduisent une modification profonde de perméabilité des membranes en réponse en partie à une activité ATPasique qui serait indirectement inhibée par le cadmium.

Toutes ces observations nous laissent suggérer l'hypothèse suivante selon laquelle le cadmium traverserait dans un premier temps la membrane externe

mitochondriale (MBE) pour provoquer un gonflement de l'espace intermembranaire mitochondriale (Kondoh *et al.*, 2001; Chagra *et al.*, 2009), ce gonflement se ferait au dépend d'une sortie fortement stimulée des ions  $K^+$  (Rasheed *et al.*, 2005). Une fois au contact de la membrane interne mitochondriale (MBI), le cadmium perturbe tous les paramètres clés de la chaîne respiratoire mitochondriale, à savoir les complexes I, II, III, IV et V, à travers les réductions observées des valeurs des vitesses d'oxydation du succinate ( $V_{ox3}$  et  $V_{ox4}$ , CR, ADP/O) et celles du  $\Delta\Psi$  et de l'activité du complexe V (ATP-synthétase), ceci vient confirmer les observations de Simpkins *et al.*, 1998 et Zang *et al.*, 2008.

Parallèlement, la présence de cadmium (xénobiotique stimule l'activité de la LOX enzyme clé dans la production d'hydroxydes d'hydrogènes. En effet cette enzyme associée aux taux élevés des acides gras (Linoléique et linoléique) principaux substrats de la LOX produit des hydro peroxydes (ROS) en quantités importantes qui vont par la suite attaquer les phospholipides membranaires et aboutir à leur peroxydation. La production accrue de ROS stimule à son tour les activités enzymatiques de défense des mitochondries à savoir la CAT et la GPX mais cette activité n'est que de courte durée et reste peu efficace en raison des concentrations supraphysiologiques du cadmium. Des observations semblables sont rapportées par Sokolova *et al.*, (2005) sur des bivalves; et Zang *et al.*, (2008) sur des cellules hépatiques. Dans le cas de notre hypothèse, le cadmium interviendrait au niveau de 3 Sub-Système-Sites, ( $SSS_1$ : composé du système d'oxydation du substrat respiratoire;  $SSS_2$ : composé du système de transport des cations et des protons  $H^+$  et enfin le  $SSS_3$ : composé du system de phosphorylation).



**Figure 31.** Schéma illustrant l'hypothèse de l'action du cadmium sur l'activité oxydante et phosphorylante des mitochondries isolées d'Apple (Chagra et Djear, 2010). PLM : PhosphoLipides Membranaires.

Ainsi, le SSS<sub>1</sub> produirait une force protons-motrice  $\Delta p_{\mu}H^{+}$  responsable du fonctionnement de SSS<sub>3</sub> (dans les conditions normales de fonctionnement de la phosphorylation oxydante des mitochondries). Cependant, chez les mitochondries soumises au traitement par le cadmium, cette force dévierait de sa fonction initiale pour alimenter beaucoup plus le SSS<sub>2</sub>, ce qui augmenterait de façon importante la perméabilité passive des cations et protons au niveau de la MBI (résultat obtenu dans notre travail et traduit en termes de variations  $\Delta pH$  du milieu de mesure). Cette déviation de la fonction  $\Delta p_{\mu}H^{+}$  de contribuerait indirectement à l'inhibition de l'activité ATPasique des mitochondries.

Parallèlement à cela, une forte stimulation de la voie alternative insensible au cyanure est observée dans notre cas, cette voie constituerait une stratégie couramment utilisée par les plantes (mitochondries) exposées à des xénobiotiques, elle éviterait ainsi (dans la limite des conditions expérimentales) un éventuel découplage des mitochondries soumises au cadmium (notre cas): cette voie est souvent considérée comme une voie de tolérance aux xénobiotiques (Delpérée et Lutts, 2008).

Enfin, le gonflement mitochondrial, associé à la stimulation de la fuite des cations et  $H^+$  ainsi que la Dépolarisation de la Membrane Mitochondriale (MMD) particulièrement au niveau des complexes I et III (Belyaeva *et al.*, 2004) va contribuer inévitablement à l'ouverture du Pore de Perméabilité Transitoire Mitochondriale (PPTM) et la libération du Cyt c (localisé dans l'espace intermembranaire, (Green et Reed, 1998; Green, 1998). Cette libération du Cyt c va stimuler d'une part, la synthèse des Protéines Inductrices de l'Apoptose (AIF) et autres caspases (3, 8 et 9; Risso de Faverney *et al.*, 2004) et d'autre part, l'activation des protéases responsables de la mort des mitochondries (Yang *et al.*, 2009).

## **Perspectives**

Au terme de ce travail de recherche, il paraît indispensable de réexaminer certaines expériences de gonflement en fonction des données récentes sur les mouvements d'ions tels le potassium, le sodium et l'influence de l'osmolarité du milieu de mesure chez les mitochondries.

Cependant, le devenir de ce type de recherche portant sur les mécanismes de l'action du cadmium au niveau des membranes nécessitera très certainement une étude approfondie sur le rôle que pourrait jouer la voie respiratoire alternative insensible au cyanure (fortement stimulée par le cadmium dans notre travail) lors du déclenchement de l'apoptose chez les mitochondries.

## BIBLIOGRAPHIE

### A.

- 1- Abraham P. W., 2002: Soils : their implications to human health. The science of the total Environment. 291: 1-32.
- 2- Adler E., 2001: Boues d'épuration et métaux lourds: éléments d'information, Hexagone Environnement, 36, 27-29.
- 3- Adriano D. C., 2001: Trace elements in terrestrial environments : biogeochemistry, bioavailability and risks of metals. 2<sup>nd</sup> Springer-Verlag, N. Y., Berlin, Heidelberg.
- 4- Alberts B. ; Bray D. ; Johnson A. ; Lewis J. ; Raff M. ; Roberts K. et Walter P., 1999: L'essentiel de la biologie cellulaire : Introduction à la biologie moléculaire de la cellule. Ed. Medicine-Sciences Flammarion. 383-386.
- 5- Alloway B. J.; 1997: The mobilization of trace elements in soils. Third International Conference on the Biochemistry of trace elements, Paris (France). Ed. INRA.
- 6- Almeida J. A.; Novelli E. L. B. ; Dal Pai Silva M. and Alves Junior R., 2001: Environmental cadmium exposure and metabolic responses of the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. Environmental Pollution, 114: 169-175.
- 7- Amara S.; Bozec A.; Benahmed M. and Mauduit C., 2005: Mort programmée des cellules germinales testiculaires: causes et mécanismes mis en jeu (Apoptotic process in testicular germ cells : causes and mechanisms). Andrologie, ISSN 1166-2654; 15 (3), 263-278.
- 8- American mineralogist, 1980: (65), 1065.
- 9- Ames B. N., 1966: Assay of inorganic phosphate, total phosphate and phosphatases. Methods Enzymol. 8: 115-118.
- 10- Andreyev A. Y., Kushnareva Y. E. and Starkov A. A., 2005: Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. Biochemistry, 70 (2): 200-214.
- 11- Andy D. W. and William J. FE., 1995: Environmental hydrology. Ed. Lewis Publishers, N. Y., 333-334.
- 12- Arvidson B., 1986: Autoradiographic localization of cadmium in the rat brain. Neurotoxicology, 7 (3): 89-96.

## B.

13- Balk J., Chew S. K., Leaver C. J. and McCabe P. F., 2003: The intermembrane space of plant mitochondria contains a DNase activity that may be involved in apoptosis., *Plant J.*, 34, 573-583.

14- Bar R., 2004: Après nous le déluge. *Revue Helvetas Prtenaire*, 1-8.

15- Banzet N.; Richaud C.; Deveaux Y.; Kazmaier M.; Gagnon J. and Triantaphylides C., 1998: Accumulation of small heat shock proteins, including mitochondrial HSP22, induced by oxidative stress and adaptive response in tomato cells. *Plant J.*, 13: 519-527.

16- Belyaeva E. A., Glazunov V. V. and Korotkov S. M., 2004: Cadmium versus calcium produced mitochondrial membrane permeabilization: a proposed direct participation of respiratory complexes I and III. *Chem., Biol. Interact.*, 150, (3), 253-270.

17- Bernard A. and Lauwerys, 1992: Cadmium, EMC. *Toxicologie-Pathologie professionnelle*. 16 (2): 8-30.

18- Bert V., 2000: Tolérance aux métaux lourds et accumulation chez *Arabidopsis halleri* (*Brassicaceae*). Thèse de l'Université des Sciences et Technologies de Lille, UFR de Biologie, 189 pages.

19- Biney A. T. et Amuzou A. T., 1994: Revue de la pollution dans l'environnement aquatique africain. F.A.O. Document Technique du C.P.C.A., (25) : 37-67.

20- Blackburn L., 2007: Heat and cadmium: A damaging cocktail. *J. Exp. Biol.*, (10), 46-55.

21- Bonaly J., Miginiac-Maslow M., Brochiero E., Hoarau A. and Mestre J. C., 1986: cadmium effects on energetic of *Euglena* during the development of cadmium resistance. *J. Plant. Physiol.*, 123, 349-358.

22- Bonnieux F. et Desaignes B., 1998: Economie et politique de l'environnement. Ed. Dalloz, Paris 320 pages.

23- Bourrelier P. H. and Berthelin J., 1998: Contamination des sols par les éléments en trace: les risques et leur gestion. Tec. Doc. Lavoisier (Ed.), Paris.

24- Bounias M., 1999: Traité de Toxicologie, 145 pages.

25- Boyd R. S., 1998: Hyperaccumulation as a plant defensive strategy. In Brooks, R. R. (Ed.). Plants that hyperaccumulate heavy metals. CABI Publishing, Wallingford, 181-200.

26- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248-254.

27- Briat J. F. and Lebrun M., 1999: Plant responses to metal toxicity. Plant Biology and Pathology. 332: 43-54.

28- Bounias M., 1999: Traité de toxicology générale. Ed. Springer : 58-205-233-555-583.

29- Brierley G. P., 1977: Effects of heavy metals on isolated mitochondria in biochemical effects of environmental pollutants (Lee, S. D. Ed.), Ann. Arbor., Sci. Pub., 397-411.

30- Brooks R. R., 1998: Geobotany and hyperaccumulators. In: Brooks, R. R. (Ed.). Plants that hyperaccumulate heavy metals. CABI Publishing, Wallingford, 55-94.

31- Buchanan B. B., Gruissem W., and Russell L. J., (2000). Biochemistry & Molecular Biology of Plants. (American Society of Plant Physiologists; Rockville, Maryland).

32- Bustamante P.; Garrigue C.; Breau L. ; Caurant F., Dabin W. ; Greaves J. and Dodemont R., 2003: Trace elements in two odontocete species (*Kogia breviceps* and *Globicephala macrorhynchus*) stranded in New Caledonia (South Pacific). Environmental Pollution, 124 (2): 263-271.

## C.

33- Callen J. C., 1999: Biologie Cellulaire : des molécules aux organismes. Ed. Dunod, 151-313.

34- Campbell P. G. C., 1995: Interactions between trace metals and organisms. Critique of the free-ion activity model. Metal speciation and bioavailability in aquatic systems. A. Tessier et D. R. Turner ; J. Wiley and Sons, Chichester, U.K. : 45-97.

35- Cande C.; Cohen I.; Daugas E.; Ravagnan L.; Larochette N.; Zamzami N. and Kroemer G., 2002: Apoptosis-inducing factor (AIF) : a novel caspase-independent death effector released from mitochondria. Biochimie, 84: 215-222.

- 36- Casalino E.; Calzaretto G.; Sblano C. et Landriscina C., 2000: Cadmium-dependent enzyme activity alteration is not imputable to lipid peroxidation. Arch. Biochem. Biophys., 383 (2): 288-295.
- 37- Chagra A., Djebar M. R., Rouabhi R. and Berrebbah H., 2009: Cadmium Induced Changes in Metabolic Function of Mitochondrial Isolated from Potato Tissue (*Solanum tuberosum* L.). American Journal of Biochemistry and Biotechnology 5 (1): 35-39.
- 38- Chaignon V., 2001: Biodisponibilité du cuivre dans la rhizosphère de différentes plantes cultivées. Cas de sols viticoles contaminés par des fongicides. Thèse de l'École Doctorale des Sciences de l'Environnement : Système Terre, Université d'Aix-Marseille, 234 pages.
- 39- Chakravarty B. and Srivastavo S., 1997: Effects of cadmium and zinc interaction on metal uptake and regeneration of tolerant plants in linseed. Agriculture Ecosystems and Environment, 61 (1): 45-50.
- 40- Chaoui A.; Ghorbal M. H. et Ferjani E., 1997: Effects of cadmium-zinc interactions on hydroponically growth bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Plant Science, 126: 21-28.
- 41- Chappuis, P., 1991: Les oligoéléments en médecine et en biologie. Ed. Tec. Et Doc. Lavoisier, EMinter et Sferete : 1-45.
- 42- Chardonens A. N.; Koevoets P. L. M. ; Van Zanten A.; Schat H. and Verkleij J. A. C., 1999: Properties of enhanced tonoplast zinc transport in naturally selected zinc-tolerant *Silene vulgaris*. Plant Physiol., 120: 779-785.
- 43- Chance B. and Maehly A. C., 1955: assay of catalases and peroxidases. Methods Enzymol. 2, 764-801.
- 44- Chance B. and Williams G. R., 1956: The respiratory chain and oxidative phosphorylation. Adv. Enzymol. 17: 65-134.
- 45- 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. Chemosp. 50: 789-793.
- 46- Cheng S., 2003: Effects of heavy metals on plants and resistance mechanisms. Environmental Science and Pollution Research. 10 (4): 256-264.
- 47- Chiffoleau J. F.; Auger D.; Chartier E.; Michel P.; Truquet I.; Ficht A. Gonzalez J. I. and Romana I. A., 2001: Spatiotemporel changes in cadmium contamination in the seine estuary (France). Estuaries 24 (6B): 1029-1040.

48- Chugh L. K. and Sawhney S. K., 1995: Effect of cadmium on activities of some enzymes of glycolysis and pentose phosphate pathway in pea. *Biol. Plant.* 42: 40-407.

49- Claes W. H. S., 2008: Cadmium mediated changes in mitochondrial metabolic function of a renal epithelial cell line (A6), evaluated with the MTT-assay. *Mémoire de Master en Biology Molecular.* Roskilde University, 115 pages.

50- Cobbett C. S., 2000: Phytochelatin and their roles in heavy metals detoxification. *Plant Physiol.* 123: 825-832.

51- Costa G. et Morel J., 1994: Water-relations, gas exchange and amino acid content in Cd-treated lettuce. *Plant Physiol. Biochem.* 32 (4): 561-570.

52- Costa V., Amorim M., Quintanilha A., Moradas-Ferreira P., 2002: Hydrogen peroxide-induced carbonylation of key metabolic enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*: the involvement of the oxidative stress response regulators Yap1 and Skn7. *Free Radic. Biol. Med.* 33, 1507-1515.

53- Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France (CSHPF), 1996: Plomb, cadmium et mercure dans l'alimentation : évaluation et gestion de risque. Ed. Tec. Et Doc. Lavoisier.

## **D.**

54 - Dahmani-Muller H.; Van Oort F.; Gelie B. and Balabane M., 1999: Strategies of heavy metal uptake by three plant species growing near a metal smelter. *Environmental Pollution.* 109: 1-8.

55 - Dauwe T.; Lieven B.; Ellen J. ; Rianne P.; Ronny B. and Marcel E., 2002: Great and blue tit feathers as biomonitors of heavy metal pollution. *Ecological Indicators.* 1 (4): 227-234.

56 - Davy de Virville J. et Moreau F., 1984 : Eclectrogenic proton extrusion coupled to succinate oxidation in plant mitochondria. *Physiol. Vég.* 22: 597-606.

57- De Knecht J. A.; Koevoets P. L. M.; Verkleij J. A. C. and Ernst W. H. O., 1992: Evidence against a role for phytochelatin in naturally selected increased cadmium tolerance in *Silene vulgaris* (Moench) Garcke. *New Phytologist.* 122: 681-688.

58- Delpérée C., and Lutts S., 2008: Growth inhibition occurs independently of cell mortality in tomato (*Solanum lycopersicum*) exposed to high cadmium concentrations. *J. Integ. Plant Biol.*, 50, (3), 300-310.

- 59- De Meeûs C. ; Eduljee G. H. et Hutton M., 2002: Assessment and management of risks arising from exposure to cadmium in fertilisers. I. Science of the total Environment. 291 (1-3): 167-187.
- 60- Devi S. R. and Prasad M. N. V., 1999: Membrane lipid alterations in heavy metal exposed plants. In Prasad M. N. V. and Hagemayer J. Ed. Heavy metal stress in plants; from molecules to ecosystems. Springer-Verlag Berlin. 99-116.
- 61- De Vos C. H. R. ; Vonk M. J. ; Vooijs R. and Schat H., 1992: Glutathione depletion due to copper-induced phytochelatin synthesis causes oxidative stress in *Silene cucubalus*. Plant Physiol. 98: 853-858.
- 62- Dietz K. J.; Baier M. and Kramer U.,1999: Free radicals and reactive oxygen species as mediators of heavy metal toxicity in plants. Ed. Springer-Verlag, Berlin. 73-97.
- 63- Diolez P., 1985: Relations entre potentiel de membrane et vitesse d'oxydation dans les mitochondries végétales. Thèse Doct. Univ., Université Pierre et Marie Curie, Paris, 185 pages.
- 64- Diolez P. et Moreau F., 1985: Corrélations between ATP-synthesis, membrane potentiel and oxidation rate in plant mitochondria. Biochem. Biophys., Acta, 806, 56-63.
- 65- Djebbar M. R., 1988 : Isolement d'une fraction membranaire convertissant l'acide 1-aminocyclopropane-1-carboxylique en éthylène chez la pomme et effets de l'éthylène sur les mitochondries végétales. Thèse de Doctorat de l'université Paris VI, UPMC. 188 pages.
- 66- Djebbar M. R. et Moreau F., 1990: *In vitro* conversion of aminocyclopropane-1-carboxylic acid to ethylene by apple mitochondria. Plant Physiol. and Biochem.; 28. (4), 523-530.
- 67- Djebbar M. R. et Djebbar H., 2000: Bioénergétique. Les mitochondries végétales. Synthèse. 8 : 23-25.
- 68- Dong Z. ; Saikumar P.; Weinberg J. M. and Venkatachalam M. A., 1997: Internucleosomal DNA cleavage triggered by plasma membrane damage during necrotic cell death. Involvement of serine but not cysteine proteases. Am. J. Path. 151: 1205-1213.
- 69- Ducet G.; Martinon M. C.; Coulomb P.; Diano M. and Meunter D., 1970: Tubercles of potatos mitochondria. Physiol. Vég. 8: 35-54.
- 70- Dupont J. ; Rustin P. et Lance C., 1982 : Lipoxygenase in higher plants : a non mitochondrial enzyme. Ed. Amsterdam, 293-296.

## **E.**

71- Eide D.; Broderius M.; Fett J. and Guerinot M. L., 1996: A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 93: 5624-5628.

72- Ekvall L. et Greger M., 2003: Effects of environmental biomass-producing factors on Cd uptake in two Swedish ecotypes of *Pinus sylvestris*. *Environmental Pollution*. 121 (3): 401-411.

73- Estabrook R. W., 1967: Mitochondrial respiratory control and the polarographic measurement of ADP/O ratio. *Methods Enzymol*. 10: 41-47.

## **F.**

74- Farago E. M., 1994: Plants and the chemical elements. *Biochemistry. Uptake Tolerance and toxicity*. Ed. VCH. 320-321.

75- Fifield F. W. et Haines P. J., 1995: *Environmental analytical chemistry*. 1ère Ed. Chapman et Hall. 321-351.

76- Foy C. D.; Chaney R. L. and White M. C., 1978: The physiology of metal toxicity in plants. *Annual. Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 29: 511-566.

77- Foyer C. H. and Noctor G., 2000: Oxygen processing in photosynthesis. Regulation and signaling. *New Phytologist*. 146: 359-388.

78- Frank P.M., Robertson P.B., 1979: The influence of salinity on toxicity of cadmium and chromium to the blue crab, *Callinectes sapidus*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol*. 21, 74-78.

79- Fujita D., 1992: Effects of cadmium on lipid components: relation of cadmium to thyroid hormone and growth hormone. *Nippon Eiseigaku Zasshi*. 47 (3): 704-714.

## **G.**

80- Galvez F., Wong D. and Wood M. C., 2006: Cadmium and calcium uptake in isolated mitochondria-rich cell populations from the gills of the freshwater rainbow trout., *Am. J. Physiol., Regul. Integr., Comp., Physiol.*, 9, 21-25.

- 81- Geisler M.; Axelsezn K. B.; Harper J. F. and Palmgren M. G., 2000: Molecular aspects of higher plants p-Type  $\text{Ca}^{2+}$  ATPases. *Biochimica Biophysica Acta* 1465: 52-78.
- 82- Giegé P., Heazlewood J.L., Roessner-Tunali U., Millar A.H., Fernie A.R., Leaver C.J. and Sweetlove, L.J., 2003: Enzymes of glycolysis are functionally associated with the mitochondrion in *Arabidopsis* cells. *Plant Cell* 15, 2140-2151.
- 83- Giguère A.; Couillard Y.; Campbell P. G. C. ; Perceval O. ; Hare I. ; Pinel-Alloul B. and Pellerin J., 2003 : Steady-state distribution of metal among metallothionein and other cytosolic ligands and links to cytotoxicity in bivalves living along a polymetallic gradient. *Aquatic Toxicology*. 64 (2): 185-200.
- 84- Gouia H.; Ghorbal M. H. and Meyer C., 2000: Effects of cadmium on activity of nitrate reductase and on other enzymes of the nitrate assimilation pathway in bean. *Palnt physiol. Biochem.* 38 (7): 629-638.
- 85- Gray M.W. and Doolittle W.F., (1982): Has the endosymbiot hypothesis been proven ? *Microbiol. Rev.* 46, 1-42.
- 86- Green D. R., 1998: Apoptotic pathways: the roads to ruin. *Cell*, 94, 695-698.
- 87- Green D. R. and Reed J. C., 1998: Mitochondria and apoptosis. *Science*, 281, 1309-1312.
- 88- Greger M. and Ogren E., 1991: Direct and indirect effects of cadmium on photosynthesis in sugar beet (*Beta vulgaris*). *Physiol. Plant.*, 83, 129-135.
- 89- Greger M., 1999 : Metal availability and bioconcentration in plants. In Prasad M. N. V. and Hagemayer J. Eds. *Heavy metal stress in plants: From molecules to ecosystems*. Springer-Verlag, Berlin. 1-27.
- 90- Green D. R., 1998: Apoptotic pathways: The roads to ruin. *Cell*. 94: 695-698.
- 91- Green D. R. and Reed J. C., 1998: Mitochondria and apoptosis. *Science* 281: 1309-1312.
- 92- Groppa M. D.; Benavides M. P. and Tomaro M. L., 2003: Polyamine metabolism in sunflower and wheat leaf disc under cadmium or copper stress. *Plant Science*. 164 (2): 293-299..
- 93- Gupta P. et Kar A., 1998 : Role of ascorbic acid in cadmium-induced thyroid dysfunction and lipid peroxidation. *J. Appl. Toxicol.* 18 (3): 317-320.

94- Gupta P. et Kar A., 1999 : Cadmium-induced thyroid dysfunction in chicken: hepatic type I iodothyronin 5'-monodeiodinase activity and role of lipid peroxidation. *Comp. Biochem. And Physiol. Part. C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*. 123 (1): 39-44.

95- Gutknecht J., 1983. Cadmium and thallos ion permeabilis through lipid bilayer membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 735, 185-188.

96- Günter F., 2000: The chemistry of pollution. 3<sup>e</sup> Ed. John Wiley et Sons Ltd. 106-107.

## **H.**

97- Hall L.W., Anderson R.D., 1995. The influence of salinity on the toxicity of various classes of chemicals to aquatic biota. *Crit. Rev. Toxicol.* 25, 281-346.

98- Harrington C. F., Roberts D. J. and Nikless G., 1996: The effect of cadmium, zinc and copper on growth, tolerance index, metal uptake and production of malic acid, in two strains of the grass *Festuca rubra*. *Canadian J. Botany*. 74: 1742-1752.

99- Harrison R. M., 1996 : Pollution : Causes, effects and control. 3<sup>e</sup> Ed. The Royal Society of Chemistry. 318-433.

100- Hart B. T., 1981: Trace metal complexing capacity of natural waters. *Environ. Technol. Lett.* 2: 95-110.

101- Hegedüs A.; Erdei S. and Horvath G., 2001: Comparative studies of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detoxifying enzymes in green and greening barbey seedlings under cadmium stress. *Plant Science*. 160 (6): 1085-1093.

102- Helmke P. K. ; Salam A. K. et Li Y., 1997 : Measurement and behavior of indigenous levels of the free-hydrated cations of Cu, Zn and Cd in the soil-water system. Third International Conference on the Biochemistry of trace elements. Paris (France). Ed. INRA.

103- Herrieche O., 2004: Impact du cadmium et de l'interaction cadmium/calcium sur la germination et la croissance du blé dur (*Triticum durum Desf.*, Var. Vitron). Effet sur la respiration des racines. Thèse de Magister en Biologie. Université de Annaba, 120 pages.

## **I.**

104- Inouhe M.; Ito R. ; Ito S.; Saada N.; Tohyama H. and Joho M., 2000 : Azuki bean cells are hypersensitive to cadmium and do not synthesize phytochelatins. *Plant Physiol.* 123: 1029-1036.

106- ISMAC: International Series of Monographs in Analytical Chemistry, 1970: Enzymatic Methods of Analysis. 1<sup>ère</sup> Ed. Pergam Press Inc. (34): 87-214.

107- Iwama G.K., Afonso L.O.B., Todgham A., Ackerman P. and Nakano K., 2004: Are hsps suitable for indicating stressed states in fish? *J. Exp. Biol.* 207, 15-19.

## **J.**

108- Jamall I. S. and Roques H., 1990: Cadmium-induced alterations in ocular trace elements. Influence of dietary selenium and copper. *Biology and Trace Elements Research.* 23: 55-63.

109- Jaswant S., Viswanathan P. N., Gupta P. and Devi S., 1996: Changes in uptake of calcium caused by phytotoxicity of cadmium in *Salvinia molesta*. *Ecotoxicology*, (5), 1, 9-21.

## **K.**

110- Kabala-Pendias A. and Pendias H., 2001: Trace elements in soils and plants. 3<sup>rd</sup> CRC. Press, Boca Raton, London, New York, Washington D. C.

112- Kagiya A.; Savage H. E. ; Michael L. H. ; Hanson G. ; Entman M. L. and Rossen R. D., 1989: Molecular basis of complement activation in ischemic myocardium: identification of specific molecules of mitochondrial origin that bind human C1q and fix complement. *Circ. Res.* 64: 607-615.

113- Kamo N., Muratsugu M., Rongoh R. et Kobatake Y., 1979: Membrane potential of mitochondria measured with electrode sensitive to tetraphenyl phosphonium and relationship between proton electrochemical potential and phosphorylation potential in steady state. *J. Membrane Biol.*, 49, 105-121.

114- Kessler A. and Brand M. D., 1994: Localisation of the sites of action of cadmium on oxidative phosphorylation in potato tuber mitochondria using top-down elasticity analysis. *Eur. J. Biochem*, 225, 897-906.

115- Kessler A. and Brand M. D., 1994a: Effects of cadmium on the control and internal regulation of oxidative phosphorylation in liver mitochondria in state 4 is shared between the proton leak and the respiratory chain. *Biochem. J.*, 255, 535-539.

116- Kessler A. and Brand M. D., 1994b: Quantitative determination of the regulation of oxidative phosphorylation by cadmium in potato tuber mitochondria. *Eur. J. Biochem.*, 225, 923-935.

- 117- Kerr J. F. ; Wyllie A. H. and Curie A. R., 1972: Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer.* 26: 239-257.
- 118- Kieffer P., Dommes J., Hoffmann L., Hausman J. F. and Renaut J., 2008: Quantitative changes in protein expression of cadmium-exposed poplar plants. *Plant Proteomics*, 8, (12), 2514-2530.
- 119- Klaassen C. D., Liu J., Choudhuri S., 1999. Metallothionein: an intracellular protein to protect against cadmium toxicity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39, 267-294.
- 120- Klang-Westin E. and Perttu K., 2002: effects of nutrient supply and soil cadmium concentration on cadmium removal by willow. *Biomass and Bioenergy.* 23 (6): 415-426.
- 121- Kluck R. M., Bossy-Wetzl E., Green D. and Newmeyer D. D., 1997: The release of cytochrome C from mitochondria: A primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Sciences*, 275, 1132-1136.
- 122- Kondoh M., Ogasawara S., Araragi S., Higashimoto M. and Sato M., 2001: Cytochrome C release from mitochondria induced by cadmium. *J. Health Sci.*, 47 (1), 78-82.
- 123- Kong I. C. ; Bitton G. ; Koopman B. et Jung K-H., 1995: Heavy metal toxicity testing in environmental samples. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology.* 142: 119-147.
- 124- Kramer U., Cotter-Howells J. D., Charnock J. M., Baker J. M. and Smith A. J. M., 1996: Free histidine is a metal chelator in plants that accumulate nickel. *Nature* 373: 635-638.
- 125- Kroemer G., 1998: A mitochondrion as an integrator/coordinator of cell death pathways. *Cell Death Differ.* 5: 547-549.
- 126- Krupa Z.; Oquist G. et Huner N. P. A., 1993 : The effects of cadmium on photosynthesis of *Phaseolus vulgaris* : A fluorescence analysis. *Physiol. Plant.* 88 (4) :626-630.

## L.

127- Lagadic L.; Caquet T.; Amirad J-C and Ramade F., 1997: Biomarqueurs en écotoxicologie: Aspects fondamentaux. Ed. Masson. 165-184.

128- Lahouel M., 2006: Modulations es fonctions mitochondriales dans la stratégie de prévention du stress oxydatif. Symposium Algéro-Français de Pharmacologie. Jijel, Algérie; Septembre.

129- Lasat M. M., 2002: Phytoextraction of toxic metals. A review of biological mechanisms Journal of Environmental Quality. 31, 109-120.

130- Leïta I.; Contin M. and Maggioni A., 1991: Distribution of cadmium and induced Cd-binding proteins in roots, stems and leaves of *Phaseolus vulgaris*. Plant Science. 77: 139-147.

131- Léon A. M.; Palma J. M. ; Corpas F. J. ; Gomez M. ; Romero-Puertas M. C. ; Chatterjee D. ; Mateos R. M. ; Del Rio I. A. and Sandalio L. M., 2002: Antioxydative enzymes in cultivars of pepper plants with different sensitivity to cadmium. Plant Physiol. Biochem. 40 (10): 813-820.

132- Lichtenthaler H. K., 1998. The stress concept in plants : an introduction. Dans: Czermely, P. (éd.), Stress of life from molecules to man. Ann. N.Y. Acad. Sci., New York, vol. 851: 187-198.

133- Liu D. and Kottke I., 2003: Subcellular localization of cadmium in the root cells of *Allium sativum* by electron energy loss spectroscopy. J. Bioscience. 28 (4): 471-478.

134- Lu F. C., 1992: Toxicologie: données générales, procédures d'évaluation, organes cibles et évaluation du risqué. Ed. Masson, 360 pages.

## M.

135- Mackenzie S.A., and McIntosh L., 1999: Higher Plant Mitochondria. Plant Cell 11, 571-585.

136- Mafoua B. et Alain T. G., 1995: Pollution atmosphérique en droit international et européen. 310 pages.

137- Mass G., 1987: La pollution de l'eau: Origine naturelle et effets des polluants. Contrôle et législation. Epuration des eaux. WWE Belgique. 1-34.

- 138- McGrath S. P., 1997: Behavior of trace elements in terrestrial ecosystems. Third International Conference on the Biochemistry of trace elements. Paris (France) . Ed. INRA.
- 139- McGrath S. P., 1997: Behavior of trace elements in terrestrial ecosystems. Third International Conference on the Biochemistry. Paris Ed. INRA.
- 140- Meharg A. A., 1993: The role of the plasmalemma in metal tolerance in Angiosperms. *Physiologia Plantarum*. 88: 191-198.
- 141- Mendelssohn I. A.; McKee K. L. and Kong T., 2001: A comparison of physiological indicators of sublethal cadmium stress in wetland plants. *Environ. Experim. Bot.* 50 (3): 265-276.
- 142- Mihoub A., Chaoui A. and El Ferjani A., 2004: Biochemical changes associated with cadmium and copper stress in germinating pea seeds (*Pisum sativum* L.). *Colmptes Rendus biologies*. (328), 1, 33-41.
- 143- Miller S. C.; Bowman B. M. and Rowland H. G., 1983: Structure, cytochemistry endocytic activity and immunoglobulin (Fc) receptors of rat testicular interstitial-tissue macrophages. *Am. J. Anat.* 168: 1-13.
- 144- Milone M. T.; Sgherri C.; Clijsters H. and Navari-Izzo F., 2003: Antioxidative responses of wheat treated with realistic concentration of cadmium. *Environ. Experim. Bot.* 50 (3) : 265-276.
- 145- Miquel G., 2001: Rapport sur les effets des métaux lourds sur l'environnement et la santé. 203 pages.
- 146- Misra S. and Genamu L., 1989: Heavy metal tolerant transgenic *Brassica napus* and *Nicotiana tabacum* plants. *Theoretical and Applied Genetics*. 78: 161-168.
- 147- Mitchell P., 1979: Compartmentation and communication in living systems. Ligand conduction: a general catalytic principle in chemical, osmotic and chemiosmotic reaction systems. *Eur. J. Biochem.*, 95, 1-20.
- 148- Moller I. M., 2002: A new dawn for plant mitochondrial NAD(P)H dehydrogenases. *Trends Plant Sci* 7, 235-237.
- 149- Morin D.; Zini R.; Tillemont S. P. and Burdeau A., 2004: Prevention of cell damage in ischemic-reperfusion mitochondrial respiratory chain as a pharmacological target. *Letters in drugs and Discovery*. 1: 279-284.

150- Murphy A. and Taiz L., 1995: Comparaison of metallothionein gene expression and nonprotein thiols in ten *Arabidopsis* ecotypes. Correlation with copper tolerance. *Plant Physiology*.109: 945-954.

## N.

151- Newman D., Lichtenberger O., Gunther D., Tschierch K. and Nover L., 1994: Heat-shock proteins induce heavy-metal tolerance in higher Plants. *Planta* 194: 360-367.

152- Nicholls D. G., 1982: Bioenergetics: an introduction to the chemiosmotic theory. Academic Press, Londres, New-York.

153- Noctor G and Foyer C.H., 1998: Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molecular Biology*. 49 : 249-279.

154- Nriagu J. O., 1989 : A global assessment of natural sources of atmospheric trace metal. *Nature* 338: 47-49.

155- Nations Unies (NU), 2000 : Risques pour la santé liés aux métaux lourds et aux polluants organiques provenant de la pollution atmosphériques transfrontière à longue distance. 2-6.

## O.

156- OMS 1992: Notre planète = notre santé. Ed. Genève, 123 pages.

157- Öncel I. ; Keles Y. and Ustun A. S., 2000: Interactive effects of temperature and heavy metal stress on the growth and some biochemical compounds in wheat seedlings. *Environ. Poll.* 107 : 315-320.

158- Opecst, 2001: Office Parlementaire d'Evaluation des Choix Scientifiques et Technologiques (OPECST): Effets des métaux lourds sur l'environnement et la santé. Rapport N° 261.

159- Ouariti O., Boussama N., Zarrouk M., Cherif A. and Ghorbal M. H., 1997: Cadmium and copper induced changes in tomato membrane lipids. *Phytochemistry*, 45 (7), 1343-1350.

160- Ouzounidou G., Moustakas M. and Eleftheriou E. P., 1997: Physiological and ultrastructural effects of cadmium on wheat (*Triticum aestivum* L.) leaves. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 32, (2), 154-160.

## **P.**

161- Pavia Junior M. A.; Paier B.; Noli M. I.; Haggmuller K. and Zaninovich A. A., 1997: Evidence suggesting that cadmium induces non-thyroidal illness syndrome in the rat. *J. Endocrinol.* 154 (1) : 113-117.

162- Peralta-Videa J. R. ; Gardea-Torresdey J. L. ; Gomez E. ; Tiemann K. J. ; Parsons J. G. and Carillo G., 2002: Effect of mixed cadmium, copper, nickel and zinc at different pHs upon alfalfa growth and heavy metal uptake. *Environmental Pollution*. 119 (3): 291-301.

163- Pichard A., 2000 : Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques : cadmium et ses dérivés. INERIS-DRC-0125590. ETSC-API/SD, 40 pages.

164- Piquears A. Olmos E. ; Martinez-Solano J. R. and Hallin E., 1999: Cd-induced oxidative burst in tobacco BY 2 Cells: time course, subcellular location and antioxidant response. *Free Radicals Research*. 31: 33-38.

165- Popescu M.; Blanchard J. M. et Carré J.,1998 : Analyse et traitement physicochimique des rejets atmosphériques industriels : Emission, fumées, odeurs et poussières. Ed. Tec. Et Doc. Lavoisier, 666-677.

166- Prasad M. N. V., 1995: Cadmium toxicity and tolerance in vascular plants. *Environ. Experim. Bot.* 35 (4): 525-545.

167- Prasad M. N. V. and Freitas H., 2000: Removal of toxic metals from solution by leaf, stem and root phytomass of *Quercus ilex* L. (holly oak). *Environmental Pollution*. 110 (2): 277-283.

168- Prosser C. L., 1991: Definition of comparative physiology : theory of adaptation. Dans: Prosser, C.L. (Ed.), *Environmental and metabolic animal physiology*. Wiley-Liss, New York. 1-11.

## **R.**

169- Rauser W. E., 1987: Changes in glutathione content of maize seedlings exposed to cadmium. *Plant Science*. 51 (2): 171-175.

170- Rasheed B. K. A., Diwan J. J. and Sanadi D. R., 2005: Activation of potassium ion transport in mitochondria by cadmium ion. *Eur. J. Biochem.*, 144 (3), 643-647.

171- Reese R. N. and 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 (2), 123-130.

172- Reinheckel T., Noack H., Lorenz S., Wiswedel I. and Augustin W., 1998: Coparaison of protein oxidation and aldehyde formation during oxidative stress in isolated mitochondria. Free Radic. Res., 4, 297-305.

173- Rembur J. P.; Landré P. and Nougarede A., 1983 : Propriétés des activités ATPasiques mitochondriales et microsomales de l'épicotyle de pois. Z. Pflanz. Physiol. 109: 13-28.

174- Remon E., Bouchardon J-L, Cornier B., Guy B., Leclerc J-C and Faure O., 2005: Soil characteristics heavy metal availability and vegetation recovery at a former metallurgical landfill: implications in risk assessment and site restoration. Environmental pollution 137: 316-323.

175- Rengel Z., 1999: Heavy Metals as essential nutrients. In Prasad M. N. V. and Hagemayer J. Eds. Heavy metal stress in plants. From Molecules to ecosystems. Springer-Verlag. Berlin. 231-251.

176- Riordan J. F., Vallee B. L., 1991: Metallobiochemistry. Part B – Metallothionein and related molecules. Methods Enzymol., vol. 205.

177- Risso de Fverney C., Orsini N., de Sousa G. and Rahmani R., 2004: Cadmium-induced apoptosis through the mitochondrial pathway in rainbow trout hepatocytes: involvement of oxidative stress. Eur. J. Biochem., 28, 5-15.

178- Robert D. and Roland J. C., 1998: Organisation cellulaire: Biologie végétale. Ed. Doin. (1) : 125-345.

179- Roesijadi, G., 1992: Metallothioneins in metal regulation and toxicity in aquatic animals. Aquat. Toxicol. 22, 81-114.

180- Rustin P.; Dupont J. et Lance C., 1982 : Specific and rapid measurement of lipoxygenase activity in biological materials. Physiol. Vég. 20: 721-727.

## **S.**

181- Saeki K.; Okabe Y.; Kim E. Y. ; Tanabe S.; Fukuda M. and Tatsukawa R., 2000: Mercury and cadmium in common cormorants. (*Phalacrocorax carbo*). Environ. Poll. 108: 249-255.

- 182- Salt D. F., Prince R. C., Pickering I. J. and Raskin I., 1995: Mechanisms of cadmium mobility and accumulation in India mustard. *Plant Physiology* 109: 1427-1433.
- 183- Sanders D.; Pelloux J. ; Brownlee C. and Harper J. F., 2002: Calcium at the Crossroad of signaling. *The Plant Cell*. 14: 401-417.
- 184- Sanita di Toppi L. and Gabbrielli R., 1999: Response to cadmium in higher plants. *Environmental and experimental Botany*. 41: 105-130.
- 185- Sbartai H.; Rouabhi R.; Sbartai I.; Berrebbah H. and Djebbar M. R., 2008 : Induction of anti-oxidative enzymes by cadmium stress in tomato (*Lycopersicon esculentum*). *African Journal of Plant Science* Vol. 2 (8): 072–076.
- 186- Sbartai H., 2008: Etude des effets du cadmium sur la tomate (*Lycopersicon esculentum* L.) : essai *in vivo* et *in vitro*. Thèse de Doctorat de l'Université. Université de Annaba. 154 pages.
- 187- Schiitzendübel A.; Nikolova P.; Rudolf C. and Polle A., 2002: Cadmium and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress in *Populus canescens* roots. *Plant Physiol. Biochem.* 40 (6): 577-584.
- 188- Shah K.; Kumar R. G.; Verma S. and Dubey R. S., 2001: Effect of cadmium on lipid peroxidation superoxide anion generation and activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. *Plant Science*. 161 (6): 1135-1144.
- 189- Shih Y-L., Lin C-J., Wang S-H., Chen W-L., Lee M-T., Wei Y-H. and Shih C-M., 2005: Cadmium toxicity toward caspase-independent apoptosis through the mitochondria-calcium pathway in mDNA-depleted cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1042, 497-505.
- 190- Simkiss K.: Taylor M. G. and Mason A. Z., 1982: Metal detoxification and bioaccumulation in mollusks. *Mar. Biol. Letters*. 3: 197-201.
- 191- Simkiss K. and Taylor M. G., 1995: Transport of metals across membranes. In metal speciation and bioavailability in aquatic systems. A. Tessier et D. R. Turner, Wiley 3: 2-39.
- 192- Simpkins C., Balderman S. and Mensah E., 1998: Mitochondrial oxygen consumption is synergistically inhibited by metallothionein and calcium. *Internat. Bibl. Inform. Diet. Suppl.*, 80, (1), 16-21.
- 193- Skorzynski-Polit E. and Baszynski T., 1997: Differences in sensitivity of the photosynthetic apparatus in Cd-stressed runner bean plants in relation to their age. *Plant Science*. 128 (1): 11-21.

194- Sokolova I. M. and Ponnappa K. M., 2005: Cadmium exposure affects mitochondrial bioenergetics and gene expression of key mitochondrial proteins in the eastern oyster *Crassostrea virginica* Gmelin (Bivalvia: Ostreidae). *Aquatic Toxicology*, (73), 3, 242-255.

195- Steinnes E.,1997: Factors influencing heavy metal concentrations in small lakes. Third International Conference on the Biochemistry of trace elements. Paris (France). Ed. INRA.

196- Stohs S. J. and Bagchi D., 1995: Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions., *Free Radic Biol. Med.*, 18 (2), 321-336.

197- Stolt J. P.; Sneller F. E. C. ; Bryngelsson T.; Lundborg T. and Schat H.,2003: Phytochelatin and cadmium accumulation in wheat. *Environ. Experim. Bot.* 49: 21-28.

198- Sunda W. G., Engel D. W., Thuotte R. M., 1978: Effect of chemical speciation on toxicity of cadmium to grass shrimp, *Palaemonetes pugio*: importance of free cadmium ion. *Environ. Sci. Technol.* 12, 409-413.

199- Sun B.; Zhao F. J.; Lombi E. et McGrath S. P.,2001: Leaching of heavy metals from contaminated soils using EDTA. *Environmental Pollution*. 113: 111-120.

200- Susin S. A.; Daugas E.; Ravagnan L.; Samejima K.; Zamzami N.; Loeffler M.; Costantini P.; Ferri K. F.; Irinopoulou T. and Prevost M. C., 2000: Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. *J. Exp. Med.* 192: 571-580.

201- Szalontai B.; Horvath L. I. ; Debreczeng M.; Droppa M. and Horvath G., 1999: Molecular rearrangement of thylakoids after heavy metals poisoning as seen by Fourier transform infrared (FTIR) and electron spin resonance (ESR) spectroscopy. *Photosynthesis Research*. 61: 241-252.

## U.

202- Unseld M., Marienfeld J.R., Brandt P., and Brennicke A., 1997: The mitochondrial genome of *Arabidopsis thaliana* contains 57 genes in 366,924 nucleotides. *Nature Genet.* 15, 57-61.

## V.

203- Vanlerberghe G.C., Day D.A., Wiskich J.T., Vanlerberghe A.E., and McIntosh L., 1995: Alternative Oxidase Activity in Tobacco Leaf Mitochondria (Dependence on Tricarboxylic Acid Cycle-Mediated Redox Regulation and Pyruvate Activation). *Plant Physiol* 109, 353-361.

204- Vaux D. L. and Korsmeyer S. J., 1999 : Cell death in development. *Cell*. 96 : 245-254.

205- Viala A., 1998: *Éléments de toxicologie*. Ed. Tec et Doc. Lavoisier. 521 pages.

206- Vitoria A. P.; Lea P. J. and Azevedo R. A., 2001: Antioxydant enzymes responses to cadmium in radish tissues. *Phytochemistry*. 57 (5): 701-710.

## **W.**

207- Weinberg W. C.; Azzoli C. G.; Chapman K. ; Levine A. J. and Yuspa S. H., 1995: p53-mediated transcriptional activity increase in differentiating epidermal keratinocytes in association with decreased p53 protein. *Oncogene*. 10: 2271-2289.

208- White P. J., 2000: Calcium channels in higher plants. *Biochimica and Biophysica Acta* 1465: 171-189.

209- Wiedemann N., Frazier A.E., and Pfanner N., 2004: The protein import machinery of mitochondria. *J Biol Chem* 279, 14473-14476.

210- Wright D. A., 1977: The effect of salinity on cadmium uptake by the tissues of the shore crab *Carcinus maenas*. *J. Exp. Biol.* 67, 137-146.

211- Wu F.; Zhang G. and Dominy P., 2003: Four barley genotypes respond differently to cadmium lipid peroxidation and activities of antioxidant capacity. *Environ. Experim. Bot.* 50 (1): 67-78.

212- Wüthrich S., 2001: Effect of copper on the glutathione metabolism in *Oocystis marssonii*. *Ecotoxicology of algal communities and populations*. 6-7.

## **X.**

213- Xingfu X., 1990: Relationship between distribution of cadmium in root tissue and cadmium tolerance of *Athyrium yokoscense*., *J. Environ. Sci. Heal.*, 25 (6), 621-628.

## **Y.**

214- Yang L. Y., Wu K. H., Chiu W. T., Wang C. S. and Shih C. M., 2009: The cadmium-induced death of mesangial cells results in nephrotoxicity. *Landes Biosci. J., Autophagy*., 5, (4), 571-572.

215- Yiin S. J. ; Chern C. L. ; Cheu G. Y. and Lin T. H., 1999: Cadmium induced lipid peroxidation in rat testes and protection by selenium. *Biometals*, 12 (4): 353-359.

216- Yoshizuka M.; Mori N.; Hamasaki K.; Tanaka I.; Yokoyama M.; Hara K.; Doi Y.; Umezu Y. ; Araki H. and Sakamoto Y., 1991: Cadmium toxicity in the thyroid gland of pregnant rats. *Experimental and Molecular Pathology*. 55 (1): 97-104.

## **Z.**

217- Zang N. N., Mao W. P., Wei C. J., Zhou L., Liu H. Y. and Feng J., 2008: Influence of cadmium on structure and functions of mitochondria in hepatic cells. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, (88), 1350-1353.

218- Zhiang G.; Fukami M. and Sekimoto H., 2002: Influence of cadmium on mineral concentrations and yield components in wheat genotypes differing in Cd tolerance at seedling stage. *Field Crops Research*. 77 (2): 93-98.

219- Zhu H., Bilgin, M., Snyder, M., 2003 : Proteomics. *Annu. Rev. Biochem.* 72, 783-812.

## SOMMAIRE

	Page
<b>AVANT-PROPOS</b>	
<b>INTRODUCTION</b> .....	01
<b>1. Les métaux lourds</b> .....	01
1.1. Les Eléments traces métalliques.....	02
1.2. Les origines des ETM.....	02
1.3. Bioaccumulation des Métaux Lourds.....	05
1.4. Contamination de l'environnement par les ETM.....	06
1.5. Contamination du sol par les ETM.....	07
1.6. Contamination des milieux aquatiques par les ETM.....	08
1.7. Les ETM dans la plante.....	09
1.7.1. Voie de pénétration des ETM chez les plantes. .	10
<b>2. Le stress</b> .....	10
2.1. Définition.....	10
2.2. Acclimatation.....	13
2.3. Niveaux de réponse des plantes aux xénobiotiques.....	13
2.3.1. La barrière plasmique.....	14
2.3.2. Les systèmes antioxydants des plantes.....	15
<b>3. Le Cadmium</b> .....	18
3.1. Etymologie et description générale.....	18
3.2. Origine et Fabrication.....	19
3.3. Utilisations.....	20
3.4. Sources de contamination.....	20
3.5. Devenir du Cadmium dans l'environnement .....	22
3.6. Toxicité et bioaccumulation du Cadmium.....	23
3.7. Localisation de l'accumulation du Cadmium chez la plante...	27
3.8. Effet du Cadmium sur la germination et la croissance...	27
3.9. Effet du cadmium sur la photosynthèse.....	28
3.10. Effet du Cadmium sur la respiration.....	29
3.11. Relation Cadmium – Eau sur le plan racinaire.....	30
3.12. Effet du Cadmium sur les enzymes.....	31
3.13. Effet du Cadmium sur certains paramètres biochimiques.....	32
3.14. Cadmium et stress oxydatif.....	33
3.15. Peroxydation lipidique et effet sur les membranes.....	33
3.16. Bio marqueurs non enzymatiques du stress oxydant...	33
3.17. Effet du Cadmium sur le cycle du glutathion.....	35
<b>4. Le Calcium</b> .....	36
4.1. Teneur en calcium en calcium intracellulaire.....	36

4.2. Rôles du Calcium.....	37
4.3. Transport du Calcium.....	38
4.3.1. Canaux Perméables au Calcium (CPC).....	38
4.3.1.1. Les DACC.....	39
4.3.1.2. Les HACC.....	39
4.3.1.3. CPC de la vacuole.....	39
4.3.1.4. Canaux voltage-dépendants.....	39
4.3.1.5. Les CPC du réticulum endoplasmique...	39
4.3.1.6. CPC de chloroplaste.....	40
4.3.1.7. CPC de la membrane nucléaire.....	40
4.3.2. Les pompes à calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ - ATPase).....	40
2.3.3. Systèmes antiport $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ .....	41
<b>5. Les interactions Cadmium/Calcium.....</b>	<b>41</b>
<b>6. Les Mitochondries.....</b>	<b>42</b>
6.1. La respiration mitochondriale.....	42
6.2. Glycolyse.....	42
6.3. Cycle de Krebs.....	43
6.4. Le Transfert des électrons.....	43
6.5. Particularités des mitochondries végétales.....	44
6.5.1. NAD (P) H déshydrogénases insensibles à la roténone.....	44
6.5.2. Voie de l'oxydase alternative.....	45
6.5.3. Importance des protéines dans les mitochondries.....	45
6.6. Implication des mitochondries dans le stress oxydatif des ROS.....	46
6.7. Mitochondries, Apoptose et Nécrose.....	46
<b>7. Objectif du travail.....</b>	<b>49</b>

## CHAPITRE II            M A T E R I E L   E T   M E T H O D E S

<b>1. Matériel expérimental.....</b>	<b>50</b>
<b>2. Fractionnement cellulaire des tissus de Pomme de Terre...</b>	<b>50</b>
<b>3. Mesure de la consommation d'oxygène.....</b>	<b>54</b>
<b>4. Mesure des activités enzymatiques.....</b>	<b>55</b>
4.1- Catalase.....	55
4.2. Peroxydase.....	55
4.3. Lipoxygénase.....	56
<b>5. Adénosine Triphosphate (ATPase).....</b>	<b>57</b>

<b>6. Mesure du Potentiel de membrane.....</b>	<b>57</b>
<b>7. Dosages spectrophotométriques.....</b>	<b>58</b>
7.1. Mesure du gonflement mitochondrial.....	58
<b>8. Dosages biochimiques.....</b>	<b>58</b>
8.1. Dosage des protéines.....	58
8.2. Dosage des lipides.....	58
<b>9. Traitement des mitochondries par le Cadmium / Calcium.....</b>	<b>59</b>
<b>10. Mesure des variations de pH dues à l'hydrogène ou à la synthèse d'ATP.....</b>	<b>59</b>

## **CHAPITRE III**

## **R E S U L T A T S**

### **Effet du Cadmium sur les mitochondries végétales**

<b>1. Introduction.....</b>	<b>60</b>
<b>2. Propriétés oxydatives.....</b>	<b>60</b>
<b>3. Potentiel de membrane.....</b>	<b>62</b>
<b>4. Activité ATPasique.....</b>	<b>63</b>
<b>5. Variations du pH.....</b>	<b>66</b>
<b>6. Volume des mitochondries.....</b>	<b>68</b>
<b>7. La voie respiratoire alternative.....</b>	<b>68</b>
<b>8. Dosages enzymatiques.....</b>	<b>69</b>
8.1. Dosage de l'activité catalase.....	69
8.2. Dosage de l'activité Peroxydase.....	70
8.3. Dosage de l'activité lipoxgénase.....	71
<b>9. Dosage des variations du contenu lipidique.....</b>	<b>72</b>

## **Effet du Calcium sur les mitochondries végétales**

<b>1. Introduction.....</b>	<b>73</b>
<b>2. Propriétés oxydatives.....</b>	<b>74</b>
<b>3. Potentiel de membrane.....</b>	<b>75</b>
<b>4. Activité ATPasique.....</b>	<b>77</b>
<b>5. Volume des mitochondries.....</b>	<b>79</b>
<b>6. La voie respiratoire alternative.....</b>	<b>80</b>
<b>7. Dosages enzymatiques.....</b>	<b>81</b>
7.1. Dosage de l'activité catalase.....	81
7.2. Dosage de l'activité peroxydase (GPX).....	82
7.3. Dosage de la lipoxygénase.....	83
<b>8. Effets du calcium sur les variations du contenu lipidique.....</b>	<b>84</b>

## **Etude des interactions : Cadmium/Calcium sur les mitochondries de Pomme de Terre.**

<b>1. Introduction.....</b>	<b>86</b>
<b>2. Effet du traitement combiné Cd/Ca sur l'activité d'oxydation.....</b>	<b>86</b>
<b>3. Potentiel de membrane.....</b>	<b>88</b>
<b>4. Activité ATPasique.....</b>	<b>89</b>
<b>5. Variations du pH.....</b>	<b>92</b>
<b>6. Variations du volume mitochondrial.....</b>	<b>95</b>
<b>7. La voie respiratoire alternative.....</b>	<b>97</b>
<b>8. Dosages enzymatiques.....</b>	<b>98</b>
8.1. Dosage de l'activité CAT.....	98
8.2. Dosage de l'activité APX.....	99
8.3. Dosage de l'activité LOX.....	100

<b>9. Variations du contenu lipidique.....</b>	<b>100</b>
--	------------

## **CHAPITRE IV**

## **DISCUSSION**

<b>1. Effets du cadmium sur les mitochondries isolées de Pomme de Terre..</b>	<b>102</b>
<b>2. Effets du calcium sur les mitochondries isolées de Pomme de Terre....</b>	<b>108</b>
<b>3. Effets du traitement combiné Ca<sup>+</sup>/Cd<sup>+</sup> sur les mitochondries isolées de Pomme de Terre.....</b>	<b>111</b>
<b>4. Perspectives.....</b>	<b>116</b>
<b>Bibliographie.....</b>	<b>117</b>

## ABREVIATIONS

ADP, ATP: Adénosine DiPhosphate, TriPhosphate

ADP/O : Rapport quantité d'ADP phosphorylée sur quantité en oxygène consommée.

CAT : Catalase

CR : Contrôle Respiratoire

EIM : Espace InterMembranaire

ETM : Eléments Traces Métalliques

$\Delta\mu\text{H}^+$ : Force protons-motrice

GPX: Guaiacol Peroxydase

HMW: High Molecular Weight

HSP : Protéines de Choc Thermique

LOX : Lipoxygénase

LMW : Low Molecular Weight

ML : Métaux Lourds

MT : Métallothionéines

MB: Mitochondries Brutes

MP : Mitochondries Purifiés

MOPS: Acide Morpholino Propane Sulfamide

( $\cdot\text{OH}$ ) : Radical hydroxyle

(OH<sup>-</sup>) : Anion hydroxyle

PC : Phytochélatines

POX : Peroxydases

PVP : PolyVinylPyrrolidone

PPTM : Pore de Perméabilité Transitoire Membranaire

ROS : Reactives Oxygen Species

SSS1 : Sub-Système-Sites

SOD : Superoxyde-Dismutase

SAB : Sérum Albumine de Boeuf

TPP<sup>+</sup> : Tétraphénylphosphonium

Vox: Vitesses d'oxydations des substrats respiratoires