

Sciences pour l'Environnement / Biologie - Science - Santé**Faculté des Sciences et Techniques****Thèse N° [14-2010]****THESE****Pour obtenir le grade de****DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LIMOGES****En Biologie - Science - Santé****Spécialité : Biologie de l'environnement****Présentée par****Chris Fabien MOUSSAVOU MOUDOUMA****Soutenue le 11 mai 2010**

Etude des mécanismes d'accumulation du cadmium chez *Arabidopsis thaliana* (écotype Wassilewskija) et chez un mélèze hybride (*Larix x eurolepis*) par des approches moléculaire et développementale.

Thèse dirigée par M^{lle} Gaëlle SALADIN et M. Vincent GLOAGUEN

JURY :***Rapporteurs*****Pr Stanley LUTTS. Université Catholique de Louvain (Belgique).****Pr Christophe CLÉMENT. Université de Reims Champagne-Ardenne.*****Examineurs*****Pr Soulaïman SAKR. Ecole Nationale d'Horticulture d'Angers.****Pr Abderrahman MAFTAH. Université de Limoges.****M^{lle} Gaëlle SALADIN, Maître de conférences. Université de Limoges.****Pr Vincent GLOAGUEN. Université de Limoges.**

Remerciements

Je tiens dans cette rubrique à remercier toutes les personnes qui, de près ou de loin, ont contribué à l'aboutissement de ce travail.

- *Ma chef Gaëlle SALADIN pour m'avoir encadré depuis mon Master. Je te remercie de tout cœur pour ton investissement total dans ma thèse. Quoi que je fasse après la thèse, je n'oublierai pas ce que tu as fait pour moi. Merci de ne m'avoir pas lâché et d'avoir tout fait pour que ma thèse arrive à son terme malgré tous les écueils (que je préfère ne pas aborder ici). Je me souviendrai toujours de ton soutien pendant les moments difficiles.*
- *Monsieur KRAUSZ, le directeur du LCSN pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire lorsque nous nous sommes retrouvés « sans laboratoire fixe » et de m'avoir traité comme les autres thésards qui avaient débuté leur thèse au laboratoire.*
- *Mon chef Vincent GLOAGUEN qui n'a pas hésité à prendre la relève de la codirection de ma thèse lorsqu'il a été sollicité. Merci Monsieur GLOAGUEN de n'avoir fait aucune différence entre les thésards dont vous aviez initié la thèse et moi. Merci pour votre disponibilité et vos conseils même en dehors du cadre académique.*
- *Madame Catherine RIOU qui pour moi est aussi ma chef. C'est d'ailleurs toi, Catherine, qui m'a offert mon premier stage en laboratoire. Tu m'as enseigné les bases des manipulations. Je te suis reconnaissant d'avoir donné de ton temps pour les corrections et de l'avoir fait avec ta bonne humeur légendaire.*

La partie expérimentale a pu se dérouler dans de bonnes conditions grâce à l'apport des personnes qui suivent :

- *Lionel FORESTIER pour l'aspect transcriptomique. Merci pour ta disponibilité et ton apport, aussi bien pour les microréseaux que pour la RT-PCR.*
- *Chantal VIGNOLES pour la mise au point des microréseaux.*
- *Fanny MEYTRAUD pour la mise au point des microréseaux et toutes les galères qu'on a connues.*
- *Sandrine MARION grâce à qui nous avons pu analyser les résultats de puces.*
- *Daniel PETIT pour les statistiques, sa disponibilité et sa gentillesse.*
- *Aline BARBAT, Muriel DEGOT et Stéphanie VALLEERIN pour la partie HPLC.*
- *Cédric ASTIER pour le dosage du cadmium et ses blagues « philosophiques ».*
- *Madame LELU-WALTER qui nous a, à plusieurs reprises, gracieusement fourni des masses proembryogènes de mélèze.*

Je tiens également à remercier tous les membres du LCSN qui m'ont permis de réaliser ce travail en toute sérénité dans un esprit convivial. Je vais éviter de citer des noms au risque d'en oublier. Ce serait dommage de me faire des ennemis à la fin de ma thèse. Je me sens tout de même obligé de citer mes voisins de la salle « Cristallographie » et les « rescapés » du bâtiment de Biologie que je remercie pour leur bonne humeur et les moments de fous rires qu'on a connus :

Amandine, Cédric, Céline, Charlotte, Florence, Frédéric, Julien, Loïc, Martine, Muriel, Raphaël, Sabine, Stéphanie.

Une grande pensée pour toute ma famille restée au Gabon et qui n'a cessé de me soutenir. Je pense particulièrement à mon grand-frère Jean-Romuald KINGA MOUSSAVOU et son épouse Edith qui m'ont élevé comme leur fils et que je considère comme mon père et ma mère. Merci pour votre amour et pour toutes les valeurs que vous m'avez enseignées. Je pense aussi à mes grands-frères Wenceslas MAMBOUNDOU et son épouse Corinne, Guy-Roger DOUMINGOU et son épouse Priva, Dieudonné MOUNDOUNGA et son épouse Jeanine. Merci pour votre soutien, c'est aussi grâce à vous que j'en suis là. La famille est tellement grande qu'il ne faudrait pas moins de deux pages pour citer tout le monde, et encore... Que ceux que je n'ai pas cités ne m'en veuillent donc pas mais qu'ils soient assurés de mon amour. Annaëlle, Anthony, Christelle, Damien, Dan, Karl, Leïla, je pense très fort à vous.

Un grand merci à mes amis Serge et Diaz qui n'ont cessé de m'encourager, surtout pendant les périodes les plus difficiles.

Je remercie la communauté gabonaise du Limousin pour les relations fraternelles que nous avons tissées. Merci pour cet esprit de famille qui m'a apporté l'équilibre et pour l'expérience de la gestion de l'association qui me servira dans ma vie professionnelle.

Je ne t'oublie pas Tanguy Urbain LENDOYE. Repose en paix petit-frère.

Merci mes frères.

Merci pour tout Murielle.

A mon père Pascal MOUDOUMA.

A Dedette et Maman.

Durant toute ma thèse je n'ai cessé de penser à ma mère, qui s'en est allée le 5 novembre 2006. J'ai séché mes larmes mais je ne t'oublie pas. Je n'oublie pas tous les sacrifices que tu as faits pour moi. J'espère que tu es fière de moi où tu es, YATILLE.

SOMMAIRE

ABRÉVIATIONS

LISTE DES TABLEAUX

LISTE DES FIGURES

INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE	4
Première partie : Pollutions métalliques et organiques et toxicologies	4
I. Origine et répartition à l'échelle nationale	4
1. Pollutions métalliques.....	4
2. Pollutions organiques.....	6
3. Répartition spatiale de la pollution en France.....	8
II. Toxicologie et surveillance des principaux polluants	9
1. Organismes français d'évaluation.....	9
2. Valeurs toxicologiques de référence (VTR).....	10
2.1. Définition.....	10
2.2. VTR des effets à seuil.....	11
2.3. VTR des effets sans seuil.....	11
2.4. VTR des principaux polluants.....	12
Deuxième partie : Les différents procédés de phytoremédiation	14
I. Histoire de la phytoremédiation	14
II. Conditions de mise en œuvre de la phytoremédiation	15
1. La phytoremédiation <i>in situ</i>	15
2. La phytoremédiation <i>ex situ</i>	16
3. La phytoremédiation <i>in vitro</i>	16
III. Mécanismes de phytoremédiation	17
1. Phytoremédiation par extraction des polluants.....	18
1.1. Phytoaccumulation.....	18
1.2. Phytodégradation ou phytotransformation.....	20

1.2.1. Enzymes impliquées.....	20
1.2.2. Efficacité de la phytodégradation de quelques familles de composés organiques.....	22
1.3. Phytovolatilisation.....	24
1.4. Rhizofiltration.....	26
2. Phytoremédiation par rétention des polluants dans le substrat.....	27
2.1. Phytostabilisation.....	27
2.2. Rhizodégradation.....	28

Troisième partie : La phytoaccumulation des éléments traces

métalliques.....	31
I. Comportement des ETM dans les sols.....	31
1. Rétention des ETM.....	31
2. Biodisponibilité des ETM.....	33
2.1. Modification de la biodisponibilité par les plantes.....	33
2.2. Modification de la biodisponibilité par des agents chimiques.....	34
II. Fixation des ETM par les parois des cellules végétales.....	35
III. Absorption, transport et compartimentation des ETM dans les cellules.....	37
1. Absorption au niveau de la membrane plasmique.....	37
2. Association aux ligands et transport.....	40
2.1. Acides organiques.....	40
2.2. Acides aminés libres et oligopeptides.....	41
2.2.1. Histidine.....	41
2.2.2. Nicotianamine.....	42
2.2.3. Oligopeptides riches en cystéine.....	42
2.2.3.1. Glutathion.....	43
2.2.3.2. Phytochélatines.....	45
2.3. Métallothionéines et autres protéines chaperonnes.....	48
3. Compartimentation.....	50
3.1. Compartimentation intracellulaire.....	50
3.1.1. Séquestration vacuolaire.....	50
3.1.2. Autres lieux de séquestration.....	52
3.2. Compartimentation à l'échelle de la plante entière.....	54
IV. Cas du cadmium.....	56

1. Effets néfastes.....	56
2. Phytoaccumulation.....	57
POSITIONNEMENT DU SUJET ET OBJECTIFS.....	60
I. Choix de l'ETM.....	60
II. Modèles végétaux.....	61
1. L'arabette de Thalius, <i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) Heynh.....	61
1.1. Intérêts pour la recherche fondamentale.....	61
1.2. Sélection de l'écotype Wassilewskija (Ws).....	62
2. Le mélèze hybride, <i>Larix x eurolepis</i> (Coaz).....	63
2.1. La phytoaccumulation d'ETM par les espèces ligneuses.....	63
2.2. Le choix du mélèze.....	65
III. Démarche expérimentale et objectifs.....	66
MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	67
I. Matériel végétal et traitements.....	67
1. Arabette de Thalius (<i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) Heynh) – écotype Wassilewskija (Ws).....	67
2. Mélèze hybride (<i>Larix x eurolepis</i>).....	68
2.1. Phase de multiplication.....	68
2.2. Première phase de maturation.....	69
2.3. Seconde phase de maturation et développement des embryons.....	69
2.4. Phase de germination et traitement au cadmium.....	70
II. Activités enzymatiques.....	70
1. Extraction et dosage des protéines.....	70
2. Activité γ glutamylcystéine synthétase.....	71
3. Activité glutathion synthétase.....	71
4. Activité phytochélatine synthase.....	71
III. Dosage des groupes thiols.....	72
1. Extraction et dosage des groupes thiols totaux non protéiques.....	72
2. Extraction et dosage par HPLC.....	72
IV. Dosage de la proline.....	73

V. Dosage du cadmium	74
VI. Utilisation des microréseaux à oligonucléotides	74
1. Extraction des ARN totaux	74
2. Visualisation des ARN totaux sur gel d'agarose	75
3. Dosage des ARN totaux par Agilent 2100 Bioanalyzer	75
4. Présentation et préparation du microréseau à oligonucléotides	75
5. Marquage des ARN messagers et hybridation des lames	76
6. Analyse des données	77
6.1. Obtention de l'image	77
6.2. Traitement des données	78
VII. RT-PCR quantitative en temps réel	78
1. Rétro-transcription	78
2. PCR quantitative en temps réel	78
2.1. Test d'efficacité des amorces et amplification	78
2.2. Traitement des données	81
VIII. Analyses statistiques	81
RÉSULTATS	84
I. Effet du cadmium sur la croissance et le développement	84
1. Effets sur la germination d' <i>Arabidopsis thaliana</i>	84
2. Effets sur la croissance et le développement d' <i>Arabidopsis thaliana</i>	86
2.1. Détermination de la dose létale	86
2.2. Sélection de la concentration maximale	88
2.2.1. Croissance des parties aériennes	88
2.2.2. Croissance racinaire	89
2.2.2.1. Biomasse	89
2.2.2.2. Longueur de la racine principale	90
2.2.2.3. Apex racinaires et racines latérales	91
3. Effet sur la croissance du mélèze hybride	93
3.1. Croissance des parties aériennes	93
3.2. Croissance racinaire	94
II. Effet du cadmium sur la teneur en proline et protéines solubles	95
1. Teneur en proline chez <i>Arabidopsis thaliana</i>	95

2. Teneur en protéines solubles totales.....	96
2.1. Chez <i>Arabidopsis thaliana</i>	96
2.2. Chez le mélèze hybride.....	97
III. Quantité de cadmium absorbée par les plantules d'<i>Arabidopsis thaliana</i>	98
IV. Effet du cadmium sur la voie de biosynthèse des phytochélatines	99
1. Teneurs en glutathion et en phytochélatines.....	99
1.1. Chez <i>Arabidopsis thaliana</i>	99
1.2. Chez le mélèze hybride.....	100
2. Régulation des enzymes de la voie de synthèse des phytochélatines.....	101
2.1 Chez <i>Arabidopsis thaliana</i>	101
2.1.1. La γ glutamylcystéine synthétase.....	101
2.1.2. La glutathion synthétase.....	103
2.1.3. La phytochélatine synthase.....	104
2.2. Chez le mélèze hybride.....	106
V. Effet du cadmium sur le transcriptome d'<i>Arabidopsis thaliana</i>	107
1. Validation de l'analyse globale du transcriptome.....	108
2. Analyse des gènes surexprimés.....	112
2.1. Parties aériennes.....	112
2.2. Racines.....	114
3. Analyse des gènes sous-exprimés.....	116
3.1. Parties aériennes.....	116
3.2. Racines.....	116
DISCUSSION	152
I. Le cadmium inhibe le pouvoir germinatif des graines d'<i>Arabidopsis thaliana</i> (écotype Ws)	153
II. Le cadmium modifie la croissance et le développement de la plante	155
1. La tolérance de Ws est corrélée à une « réponse morphogénique induite par le stress » (RMIS) plus prononcée par rapport à Col.....	155
1.1. Définition de la RMIS.....	155
1.2. Réduction de longueur de la racine principale.....	156
1.3. Initiation amplifiée de racines latérales et de poils absorbants.....	157

1.4. La RMIS ne modifie pas la biomasse racinaire.....	159
2. Une dose de cadmium de 100 μ M n'affecte pas la biomasse aérienne	160
3. Bilan de l'effet du cadmium sur la croissance et le développement de l'écotype Ws	162
III. Réponses spécifiques au traitement métallique : le cadmium induit	
la production de phytochélatines	163
1. Le cadmium augmente les teneurs en groupes thiols.....	163
2. Le cadmium stimule la voie de synthèse des phytochélatines.....	166
2.1. Glutamylcystéine et glutathion synthétases.....	167
2.2. Phytochélatine synthases.....	169
3. Hypothèse de régulation de la voie des phytochélatines	171
IV. Transport et phytoaccumulation du cadmium	174
1. Le cadmium s'accumule différemment dans les racines et les organes aériens.....	174
1.1. Le ratio de répartition entre les organes montre un transport important vers les parties aériennes	174
1.2. La quantité de cadmium est plus importante dans les racines.....	178
2. Transporteurs potentiels de cadmium.....	178
3. Accumulation potentielle du cadmium au niveau pariétal.....	180
V. Le cadmium induit également des défenses non spécifiques du stress métallique	181
1. Métabolisme azoté.....	181
2. Lutte contre l'oxydation.....	183
3. Autres défenses non spécifiques.....	184
VI. La phytoaccumulation du cadmium chez le mélèze	185
 CONCLUSIONS et PERSPECTIVES	 188
I. Les réponses au cadmium d'<i>Arabidopsis thaliana</i>, sont-elles « �cotype - dépendantes » ?.....	188
II. Le mélèze hybride, une espèce potentiellement phytoaccumulatrice ?	190
 RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	 192

ABRÉVIATIONS

2,4-D : Acide 2,4 - dichlorophénoxy acétique
ABA : Acide abscissique
ABC : ATP-Binding Cassette (motif de liaison à l'ATP)
ADI : Acceptable Daily Intake (=DJA)
ADN : Acide DésoxyriboNucléique
ADNc : ADN complémentaire
AIB : Acide Indole Butyrique
APS : Adénosine- 5' - phosphosulfate
ARN : Acide RiboNucléique
ARNm : ARN messenger
ASS : Acide SulfoSalicilique
ATP : Adénosine TriPhosphate
BAP : BenzylAminoPurine
BTEX : Benzène, Toluène, Ethylbenzène, et Xylènes
CAA : Concentrations Admissibles dans l' Air
CAA : Concentrations Admissibles dans l' Air
CAX : Calcium Antiporter eXchanger (échangeur de calcium en antiport)
CCH : Copper CHaperone (chaperonne de cuivre)
CCS : Copper Chaperone for Superoxide dismutase (chaperonne de cuivre pour la superoxide dismutase)
Cd : Cadmium
CDF : Cation Diffusion Facilitators (facilitateurs de la diffusion des cations)
CNGC : Cyclic Nucleotide-Gated Channel (canal cyclique à pont nucléotidique)
Col : Columbia
COPT : COPper Transporter (transporteur de cuivre)
COX : Cytochrome OXYdase
DDT : 1,1,1 - trichloro - 2,2 - di(pchlorophenyl) éthane
DETAPAC : acide DiEthylène TriAmine Penta-Acétique
DHPT : Doses Hebdomadaires Provisoires Tolérables.
DHT : Doses Hebdomadaires Tolérables
DHTP : Dose Hebdomadaire Tolérable Provisoire
DJA : Dose Journalière Admissible
DMSO : DiMéthylSulfOxyde
DO : Densité Optique
DTNB : acide 5,5'-DiThiobis-2-Nitro-Benzoïque
DTT : DiThioThréitol
DWUR : Drinking Water Unit Risk (risque unitaire dans les eaux de consommation)
EDTA : Acide Ethylène Diamine Tétra Acétique
ERO : Espèces Réactives de l'Oxygène
ERU : Excès de Risque Unitaire
EST : Expressed Sequence Tag (marqueur de séquence exprimée)
GC (ou EC) : GlutamylCystéine
GCS (ou ECS) : GlutamylCystéine Synthétase
GS : Glutathion synthétase
GSH : Glutathion (forme réduite)

GSSG : Glutathion disulfide (forme oxydée du glutathion)
GST : Glutathion - S - Transférase
HAP : Hydrocarbure Aromatique Polycyclique
HEAST : Health Effects Assessment Summary Tables (Tableaux résumant les effets sur la santé)
HMA : Heavy Metal-Associated domain protein (protéine à domaine de liaison aux ETM)
HMT : Heavy Metal Tolerance (tolérance des ETM)
HMWC : High Molecular Weight Complexes (Complexes à haut poids moléculaire)
HMX : Cyclotétraméthylène - tétranitramine : High Melting point eXplosive (explosif à point de fusion élevé)
HPLC : High Pressure Liquid Chromatography (chromatographie liquide à haute pression)
IRT : Iron Regulated Transporter (transporteur régulé par le fer)
IUR : Inhalation Unit Risk (risque unitaire par inhalation)
LCT : Low affinity Cation Transporter (transporteur de cation à faible affinité)
Ler : Landsberg erecta
LMWC : Low Molecular Weight Complex (complexe à poids moléculaire bas)
MRL : Minimum Risk Level (niveau de risque minimum).
MRP : Multidrug-Resistance Protein (protéine de résistance à plusieurs drogues)
NADH : Nicotinamide Adénosine Dinucléotide
NAS : Nicotinamine Synthase
NHS : N-hydroxysuccinimidyl (ester de cyanine)
NRAMP : Natural Resistance-Associated Macrophage Protein (protéine macrophage naturelle de résistance)
PAST : PAleontological STatistics
PC : Phytochélatine
PC : Phytochélatine
PCB : Polychlorinated Biphenyl (polychlorobiphényle ou biphényle polychloré)
PCE : Tétrachloroéthane
PCR : Polymerase Chain Reaction (réaction de polymérisation en chaîne)
PCS : Phytochélatine synthase
PEP : PhosphoEnol Pyruvate
PMT : PhotoMulTiplicateur
RDX : cyclotriméthylènetrinitramine ou cyclonite ou 1,3,5 - trinitroperhydro - 1,3,5 - triazine - 1,3,5-trinitro - 1,3,5 - triazacyclohexane
REL : Reference Exposure Level (dose d'exposition de référence).
RfC : Reference Concentration (concentration de référence).
RfC : Reference Concentration (concentration de référence).
RfD : Reference Dose (dose de référence).
SAM: S-AdénosylMéthionine.
SDS: Sodium DeodesylSulfate
SOD : SuperOxyde Dismutase
TCA : Tolerable Concentration in Air (concentration tolérable dans l'air).
TCE : Trichloroéthane
TDI : Tolerable Daily Intake (DJT en français : Dose journalière tolérable).
TFA : acide TriFluoroAcétique
TNT : Trinitrotoluène
VTR : Valeur Toxicologique de Référence.
Ws: Wassilewskija
YLS: Yellow Stripe Like protein

ZIP : Zinc regulated transporter - Iron regulated transporter-like Protein (protéine de transport régulée par le zinc et le fer)

AGENCES ET ORGANISMES AGREES

ATSDR : Agency for Toxic Substance and Disease Registry (agence d'enregistrement des substances toxiques et des maladies) (Etats Unis)

INERIS : Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques

InVS : Institut de Veille Sanitaire

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

RIVM : Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (Institut national de la santé publique et de l'environnement) (Pays - Bas)

US EPA : United States Environmental Protection Agency (Agence américaine pour la protection de l'environnement)

LISTE DES TABLEAUX

Numéro	Titre	Page
1	Concentrations moyennes de quelques ETM dans les sols et les plantes.	5
2	Nature des principaux ETM présents dans les sols français.	6
3	Nature des principaux polluants organiques présents dans les sols français.	8
4	Répartition des sites pollués en France et pourcentage de surfaces polluées par rapport à la totalité des sites.	9
5	VTR des principaux polluants organiques.	12
6	VTR des principaux polluants métalliques.	13
7	Nombre d'espèces hyperaccumulatrices d'ETM.	20
8	Enzymes identifiées comme intervenant dans la phytodégradation.	22
9	Principaux polluants traités par phytoremédiation.	30
10	Mobilité des principaux ETM dans le sol en fonction du pH.	33
11	Nombre de gènes chez <i>Arabidopsis thaliana</i> correspondant aux grandes familles de transporteurs pour l'absorption des ions métalliques.	39
12	Quantité minimale d'ETM requise dans les plantes pour qu'elles soient considérées comme hyperaccumulatrices.	60
13	Fréquences d'incorporation de l'ADNc et quantités de cyanines requises pour un échantillon initial d'ARN totaux de 5 µg.	78
14	Gènes d'intérêts, séquences des amorces et taille des produits amplifiés.	80
15	Gènes constitutifs, séquences des amorces et taille des produits amplifiés.	81
16	Teneur en cadmium présent dans des plantes âgées d'une semaine puis transférées pendant une semaine sur 0 ou 100 µM de cadmium.	99
17	Ratio de surexpression du gène codant la GCS.	103
18	Ratio de surexpression du gène codant la GS.	104

19	Ratio de surexpression des deux gènes codant les PCS.	105
20	Effet du cadmium sur l'activité des enzymes de la voie de synthèse des PC.	107
21	Nombre de gènes sur- et sous-exprimés en réponse au cadmium dans les parties aériennes et les racines par la technique des microréseaux à oligonucléotides.	108
22	Pourcentage de gènes dont l'expression est modulée par rapport au nombre total de gènes en réponse à différents stress par la technique des microréseaux à oligonucléotides	109
23	Expression et localisation de gènes codant des transporteurs potentiels de cadmium dans les parties aériennes en réponse au traitement appliqué.	113
24	Expression et localisation de gènes codant des transporteurs potentiels de cadmium dans les racines en réponse au traitement appliqué.	115
25	Gènes surexprimés de manière significative dans les parties aériennes en réponse au cadmium.	117
26	Gènes sous-exprimés de manière significative dans les parties aériennes en réponse au cadmium.	135
27	Gènes surexprimés de manière significative dans les racines en réponse au cadmium.	137
28	Gènes sous-exprimés de manière significative dans les racines en réponse au cadmium.	148
29	Comparaison du taux de germination de différentes espèces et différents écotypes d' <i>A. thaliana</i> en présence de cadmium.	154
30	Comparaison de la teneur en glutathion et en phytochélatines chez les écotypes Ws et Col d' <i>A. thaliana</i>	165
31	Résumé des activités enzymatiques et expression des gènes codant les enzymes impliquées dans la voie de synthèse des phytochélatines chez <i>A. thaliana</i> (Ws) en réponse à l'exposition au cadmium	167
32	Comparaison de l'accumulation de cadmium chez les écotypes Ws et Col d' <i>A. thaliana</i> .	175

LISTE DES FIGURES

Numéro	Titre	Page
1	Mécanismes de phytoremédiation.	17
2	Sites d'action des GST sur différentes molécules organiques.	21
3	Exemple d'activité de mono-oxygénases à cytochrome P450 à travers la transformation de l'herbicide prosulfuron en trois produits chez le blé.	22
4	Transformation du sélénium par incorporation dans des acides aminés ou par phytovolatilisation sous forme de diméthyl sélényde.	25
5	Phytovolatilisation du mercure par sur-expression des gènes <i>MerB</i> et <i>MerA</i> .	25
6	Différence entre les plantes hyperaccumulatrices, les plantes phytostabilisatrices et des plantes uniquement considérées comme bio-indicatrices de pollution par des métaux lourds.	27
7	Localisation des ETM dans le sol.	32
8	Organisation de la paroi des cellules végétales en phase d'élongation.	35
9	Modèle de la "boîte à œufs" montrant des homogalacturonanes liés entre eux par des ponts calciques.	36
10	Familles de transporteurs impliqués dans l'absorption des principaux métaux essentiels au développement des plantes.	37
11	Structure cristalline du complexe formé entre le nickel et deux molécules d'histidine.	41
12	Voie de synthèse de la nicotianamine.	42
13	Schéma de l'assimilation du sulfate et de la compartimentation de ses principales étapes.	43
14	Biosynthèse du glutathion.	44
15	Formule semi développée du glutathion.	44
16	Structure d'une phytochélatine avec $n = 2$.	45
17	Présence de gènes codant des phytochélatine synthases.	47
18	Alignement de séquences en acides aminés de métallothionéines présentes chez plusieurs espèces végétales.	49
19	Formation et accumulation de complexes phytochélatines-métal à haut poids moléculaire dans les vacuoles à partir de l'exemple des ions cadmium Cd^{2+} .	52
20	Transport par des ligands (de types agents chélateurs ou protéines chaperones) et compartimentation intracellulaire des ETM dans les cellules végétales.	53
21	Phases de développement de la masse pro-embryogène jusqu'au développement de plantules de mélèze.	69
22	Formules semi développées des NHS esters de cyanines 3 et 5.	77
23	Formule semi développée du SYBR Green.	81
24	Taux de germination des graines en fonction de la concentration en cadmium du milieu après 5 jours d'exposition.	84
25	Germination en fonction de la concentration du milieu en cadmium du milieu après 5 jours de traitement.	85
26	Effet du cadmium sur la croissance de plantules âgées d'une semaine et transférées pendant une semaine sur un milieu enrichi en cadmium (de 0 à 5 mM).	86

27	Effet du cadmium sur la longueur de la racine principale de plantules âgées d'une semaine et transférées pendant une semaine sur milieu enrichi en cadmium.	87
28	Croissance et développement des plantules après une semaine sur milieu contenant 0 à 500 μM de cadmium.	88
29	Effet du cadmium sur la masse fraîche des parties aériennes de plantules âgées d'une semaine et transférées pendant une semaine sur milieu enrichi en cadmium.	89
30	Effet du cadmium sur la masse fraîche de l'appareil racinaire de plantules âgées d'une semaine et transférées pendant une semaine sur milieu enrichi en cadmium.	90
31	Effet du cadmium sur la longueur de la racine principale de plantules âgées d'une semaine et transférées pendant une semaine sur milieu enrichi en cadmium.	91
32	Morphologie des racines de plantes de 7 jours soumises pendant 7 jours à 0 μM , 50 μM ou 100 μM de cadmium.	92
33	Effet du cadmium sur la masse fraîche des parties aériennes.	94
34	Effet du cadmium sur la longueur de la racine principale et sur la masse fraîche des racines.	95
35	Effet du cadmium sur la teneur en proline des parties aériennes et des racines de plantules âgées d'une semaine et transférées pendant une semaine sur un milieu contenant 100 μM de cadmium.	96
36	Effet du cadmium sur la teneur en protéines solubles totales des parties aériennes et des racines de plantules âgées d'une semaine et transférées pendant une semaine sur un milieu contenant 100 μM de cadmium.	97
37	Effet du cadmium sur la teneur en protéines solubles totales des parties aériennes et des racines de mélèzes âgés d'un mois puis transférés pendant une semaine sur un milieu contenant 0 ou 1,5 mM de cadmium.	98
38	Teneur en glutathion et en phytochélatines à $n = 2$ et $n = 3$ dans les racines et les parties aériennes.	100
39	Effet du cadmium sur la teneur en thiols totaux de mélèzes âgés d'un mois puis transférés sur 0 ou 1 mM de cadmium pendant 1 semaine.	101
40	Activité spécifique de la GCS dans les racines et les parties aériennes en réponse au cadmium.	102
41	Activité spécifique de la GS dans les racines et les parties aériennes en réponse au cadmium.	103
42	Activité spécifique de la PCS dans les racines et les parties aériennes en réponse au cadmium.	105
43	Répartition par fonction des gènes sur- et sous- exprimés en réponse au cadmium dans les parties aériennes et les racines.	111
44	Caractéristiques générales de la réponse morphogénique induite par le stress (RMIS).	155
45	Effet du cadmium chez les écotypes Col et Ws d' <i>Arabidopsis thaliana</i> .	163
46	Effet du cadmium chez les écotypes Col et Ws d' <i>Arabidopsis thaliana</i> sur la croissance et le développement ainsi que sur la production de phytochélatines.	166
47	Régulation potentielle de la voie de synthèse des phytochélatines <i>A. thaliana</i> (écotype Ws) pour des plantules d'une semaine exposées à 100 μM pendant une semaine.	172

48	Régulation potentielle de la voie de synthèse des phytochélatines <i>A. thaliana</i> (écotype Ws) pour des plantules d'une semaine exposées à 100 µM pendant une semaine.	173
49	Effet du cadmium chez les écotypes Col et Ws d' <i>Arabidopsis thaliana</i> et répartition du cadmium absorbé.	177

Introduction Générale

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Les activités humaines ont considérablement accru la libération de diverses molécules dans l'environnement dont certaines se révèlent toxiques non seulement pour la flore et la faune mais également pour l'espèce humaine. Ces activités comprennent notamment les industries agroalimentaires, métallurgiques, minières, pharmaceutiques, les centrales électriques, les raffineries de pétrole, les teintureries, les papeteries... Le développement des transports et l'utilisation massive de produits phytosanitaires en agriculture sont également devenus une source importante de pollution de l'environnement. Parmi les molécules introduites, les métaux lourds occupent une place non négligeable. Ces derniers sont définis par certains auteurs comme des éléments métalliques ayant une masse volumique minimale de 4000 à 5000 kg / m³ (Thornton, 1995 ; Sanita di Toppi et Gabbrielli, 1999). D'autres définissent comme métaux lourds les éléments métalliques compris entre le cuivre et le plomb dans le tableau périodique des éléments (excluant donc le fer et le chrome). L'arsenic est aussi très souvent inclus parmi les métaux lourds ou métalloïdes. Le terme d'éléments traces métalliques (ETM) est donc préférable pour englober l'ensemble de ces molécules (Burnol *et al.*, 2006).

La présence des ETM pose au moins deux problèmes majeurs pour l'Homme, l'un en agriculture et l'autre dans le domaine de la santé :

1) Dans le domaine agricole, la plupart des ETM accumulés dans le sol sont absorbés par les plantes de culture. Les végétaux ont besoin pour leur croissance et leur développement de certains ions métalliques comme par exemple le cuivre, le zinc, le manganèse, le fer ou le cobalt qui entrent dans la composition de certaines enzymes ou servent de co-facteurs (Yang *et al.*, 2005). Ces éléments, nécessaires en faible quantité, s'avèrent cependant toxiques voire létaux lorsqu'ils sont présents en forte concentration (Hänsch et Mendel, 2009). De plus, tous les ions métalliques ne sont pas indispensables aux plantes. En effet, des métaux comme le cadmium, le nickel, le plomb ou le mercure ne jouent aucun rôle dans la croissance et le développement des plantes. Ils sont dits non essentiels et sont toxiques à l'état de traces (Mendoza-Cózatl et Moreno-Sánchez, 2005). Tous les ETM sont cependant toxiques à forte concentration pour la plupart des plantes (McIntyre, 2003 ; Gardea - Torresdey *et al.*, 2005). L'accumulation des ETM dans les sols génère donc des pertes de rendement conséquentes soit

parce que les plantes cultivées se développent moins bien, soit parce que les sols restent inoccupés car impropres à la culture.

2) Dans le domaine de la santé publique, les ETM absorbés par les végétaux entrent dans la chaîne alimentaire et entraînent un phénomène de bio-concentration à chaque passage dans le maillon trophique supérieur (Gonzales *et al.*, 2008 ; McLean *et al.*, 2009). Cette accumulation d'ETM s'avère dangereuse pour la santé. Par exemple, une forte teneur en plomb (maladie appelée saturnisme) ou en mercure dans le corps humain affecte le système nerveux central, les cellules sanguines et les reins (De Burbure *et al.*, 2006). Le cadmium est également très toxique, particulièrement au niveau des reins, et se révèle vraisemblablement cancérigène (De Burbure *et al.*, 2006).

La présence d'ETM dans les écosystèmes aquatiques ou terrestres engendre aussi des conséquences dangereuses pour la majorité des plantes. Cependant, quelques espèces développent des moyens de protection efficaces contre ces molécules. Ces propriétés naturelles des plantes sont exploitées dans le domaine de la phytoremédiation. La phytoremédiation est un ensemble de techniques permettant de dépolluer des sols, d'épurer des eaux usées ou d'assainir de l'air en utilisant des plantes vasculaires, des algues (phycoremédiation) ou encore des champignons formant des mycorhizes avec le système racinaire d'espèces végétales (mycoremédiation). Pour les ETM, un procédé de phytoremédiation nommé phytoaccumulation permet à certaines espèces végétales d'extraire les polluants du sol puis de les séquestrer dans différents compartiments cellulaires (Hall et Williams, 2003). La phytoaccumulation est une méthode de plus en plus étudiée car elle représente une alternative moins coûteuse et plus écologique que des extractions chimiques pour dépolluer les milieux contaminés. En effet, les méthodes chimiques impliquent généralement l'extraction temporaire des substrats contaminés (sol ou eaux) pour un traitement adapté en dehors du site alors que la phytoaccumulation peut être effectuée directement sur le milieu à dépolluer et la récolte ultérieure des plantes engendre moins de dégâts pour le milieu.

Le sujet de thèse s'inscrit dans un axe de recherche plus large développé par le Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles autour de la phytoremédiation des ETM à l'interface des disciplines chimique et biologique. Les premiers travaux du laboratoire concernent la biosorption des ETM en solution par des écorces d'arbres modifiées chimiquement ou non (Martin-Dupont *et al.*, 2006) et ont conduit au développement d'un

filtre naturel à micro-polluants métalliques. Une autre approche concerne l'étude de l'adsorption des ETM présents dans le sol par la plante entière. Elle a permis de caractériser, d'une part, les mécanismes d'adsorption au niveau pariétal et, d'autre part, l'influence de la présence d'ETM sur l'évolution des compositions chimiques des parois cellulaires et, notamment, de sa composante polysaccharidique. Ces deux approches s'intéressent plus particulièrement aux arbres pour deux raisons :

- 1) l'utilisation d'écorces permet de valoriser des produits connexes de la filière bois.
- 2) les arbres pourraient constituer à terme des candidats efficaces pour la phytoremédiation du fait de leur importante biomasse et de leur système racinaire qui pourrait absorber les polluants plus profondément dans le sol en comparaison aux espèces herbacées.

Ce travail de Thèse, en étudiant les mécanismes biochimique et moléculaire d'accumulation intracellulaire du cadmium, ouvre une dimension physiologique complémentaire à l'axe phytoremédiation du Laboratoire. Dans une première démarche, l'étude est menée *in vitro* sur *Arabidopsis thaliana*, une plante modèle dont le génome est entièrement séquencé depuis 2000 (Salanoubat *et al.*, 2000). La mise en œuvre de microréseaux pangénomiques à oligonucléotides doit permettre d'évaluer les modifications de l'expression de la totalité du génome de cette plante en réponse au stress causé par le cadmium. Une attention particulière sera portée à cette occasion à la régulation de la voie de biosynthèse des phytochélatines, oligopeptides synthétisés à partir du glutathion et connus pour chélater les cations métalliques (Grill *et al.*, 1989). Dans une deuxième démarche, le concept de phytoaccumulation du cadmium sera étendu à une autre plante modèle, et posera plus particulièrement la question de l'opportunité d'utiliser les espèces ligneuses, et notamment un mélèze hybride cultivé *in vitro*, en tant qu'espèce phytoaccumulatrice.

Par ailleurs, la phytoremédiation fait également l'objet d'un intérêt croissant de la part des industriels, soucieux de leur image et désireux de réduire leurs investissements en termes de coûts de traitements de leurs rejets. J'ai ainsi pendant ma première année de thèse effectué un stage de 5 mois au centre de recherche et technologie de l'entreprise Rhodia à Lyon, sous la direction de Mme PILAS - BEGUE, responsable des laboratoires « hygiène - sécurité - environnement ». Ce stage était basé sur un état de l'art de la phytoremédiation en milieu aquatique en vue de mettre en place un procédé de traitement des effluents de l'entreprise. Ce travail étant confidentiel, le rapport produit est joint dans un document annexe.

Introduction

Bibliographique

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

Première partie :

Pollutions métalliques et organiques et toxicologies

I. Origine et répartition à l'échelle nationale

Les activités humaines constituent la principale source de l'introduction de composés toxiques dans l'environnement. Cet essor industriel a par ailleurs favorisé la délocalisation d'autres composés au niveau des différents compartiments de l'environnement (sol, étendues d'eau, nappes phréatiques, atmosphère). La pollution engendrée a pour effet de perturber, voire de bloquer les processus d'autoépuration des écosystèmes qui leur servent de réceptacle (Susarla *et al.*, 2002). L'exposition des écosystèmes et des humains à cette pollution va par conséquent entraîner un certain nombre de dysfonctionnements. Les contaminations dues à l'activité humaine peuvent être directes ou indirectes (Baize, 1997). Les diverses contaminations sont constituées :

- d'apports involontaires gérés à l'échelle de la parcelle agricole (fertilisants, fumiers, déjections animales, boues d'épuration, composts urbains...),
- d'apports atmosphériques d'origine lointaine (poussières et aérosols provenant des chauffages, activités industrielles, trafic automobile, incinérateurs...),
- des pollutions localisées massives (souvent à proximité d'une source industrielle).

1. Pollutions métalliques

Les éléments traces métalliques (ETM) sont présents à différents niveaux de la croûte terrestre. Les concentrations moyennes d'ETM rencontrées dans les sols se trouvent dans une gamme allant de moins de 0,01 à plus de 1 500 mg par kg de sol mais peuvent dépasser 50 à 70 g dans les sols métallifères (Alloway, 1995 reporté par Gardea-Torresdey *et al.*, 2005). Ces quantités sont variables selon le type de métal comme indiqué dans le tableau 1. Il en résulte des concentrations variables dans les plantes qualifiées de sensibles.

Tableau 1. Concentrations moyennes de quelques ETM dans les sols et les plantes en mg / kg (Gardea-Torresdey *et al.*, 2005).

Métal	Concentration dans les sols non métallifères	Concentration dans les sols métallifères	Concentration dans les plantes (sols non métallifères)
Cadmium	0,01 – 2	10 – 320	0,1 – 3
Chrome	5 – 1500	50 – 8450	0,2 – 5
Cuivre	2 – 250	52 – 50900	5 – 25
Mercure	0,01 – 0,5	100 – 400	0,1 – 9,5
Nickel	2 – 750	20 – 11250	1 – 10
Plomb	2 – 300	3850 – 49900	0,1 – 5
Zinc	1 – 900	110 – 70450	2 – 400

Les éléments métalliques dans les sols ont deux origines. La première, naturelle, est constituée de l'héritage de la composition chimique initiale, qui a par la suite été plus ou moins modifiée, suite à l'altération de la roche mère. En effet, un sol formé sur une roche riche en un élément donné sera obligatoirement riche en cet élément. Les éléments métalliques issus de cet héritage constituent le fond pédogéochimique, qui correspond aux teneurs en éléments, résultant de phénomènes géologiques et pédogénétiques (différenciation d'horizons) en l'absence de toutes contaminations liées à l'activité humaine (Baize, 1997).

La seconde source de présence d'ETM dans l'environnement est d'origine humaine. L'activité humaine est la cause majeure de la présence d'ETM dont les concentrations dans l'environnement se sont considérablement accrues au cours des 200 dernières années (Roth *et al.*, 2006). Lorsqu'on s'intéresse à un site particulier, il est indispensable de réaliser l'inventaire des pollutions qui peuvent être de différentes natures :

1) Pollutions locales : il s'agit principalement de sites industriels abandonnés laissés en friche et qui sont susceptibles d'être réutilisés. Ces anciens sites comportent des sources polymétalliques. En France, ils sont répertoriés dans la base de données BASOL (<http://basol.environnement.gouv.fr>). Cette base de données répertorie les sites et sols pollués (ou potentiellement pollués) appelant une action des pouvoirs publics à titre préventif ou curatif.

2) Pollutions de proximité : il s'agit de zones polluées par des activités se trouvant dans un périmètre proche. On trouve par exemple les rejets d'entreprises (incinérateurs, industrie sidérurgique...), les contaminations en provenance de stations d'épuration, le dragage des sédiments des canaux et ports qui peut remettre en suspension des éléments métalliques ou

encore l'accumulation de pesticides dont certains contiennent des ETM. Les concentrations en ETM des sédiments du Nord Pas-de-Calais issus des canaux et des rivières en sont un bon exemple (Baize, 1997).

3) Pollutions minières : les zones minières constituent un cas particulier, les concentrations en ETM étant localement très élevées. Bien qu'à l'origine ces éléments soient en général inclus dans des structures cristallines, donc peu mobiles, les risques de migration résultent de l'oxydation des sulfures (au sein des galeries ou des stériles présents en surface). L'acidification des eaux qui en résulte permet le transport à l'état dissous des éléments (Baize, 1997).

Parmi les dix substances polluantes les plus souvent rencontrées sur le territoire français, sept sont des ETM et sont retrouvées au total dans plus de 88 % des sols pollués (tableau 2).

Tableau 2. Nature des principaux ETM présents dans les sols français. Le pourcentage de présence de ces éléments, seuls ou en mélange avec d'autres polluants (métalliques et / ou organiques), a été évalué sur 70 % des sites pollués (<http://basol.environnement.gouv.fr> ; mise à jour le 19/12/2007).

ETM	Pourcentage de présence
Plomb	18,1
Chrome	15,9
Cuivre	14,8
Arsenic	12,5
Nickel	10,5
Zinc	10,4
Cadmium	6,4

2. Pollutions organiques

Les pollutions organiques sont d'origine et de nature variées. Certains composés organiques sont facilement biodégradables alors que d'autres ne sont éliminés qu'au bout de plusieurs dizaines d'années. Tout comme les ETM, ces composés s'accumulent dans les cellules et leur concentration augmente le long de la chaîne trophique. Les polluants organiques les plus fréquemment cités par l'Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie (ADEME) sont les hydrocarbures polycycliques aromatiques (HAP) rejetés lors de la combustion de matières organiques, les dioxines et furanes qui sont des composés aromatiques chlorés résultant d'incinérations et du secteur sidérurgique ainsi que les

polychlorobiphényles et les polychloroterphényles (PCB et PCTT), composés chlorés utilisés comme isolants et lubrifiants dans diverses activités comme l'usinage du métal, les soudures, les peintures ou encore la fabrication de certains papiers.

Une autre forme de pollution organique importante est due à l'utilisation massive de produits phytosanitaires (certains contenant des ETM) sous l'effet de l'agriculture intensive. En 2007, la quantité de substances actives vendues en France (principalement des herbicides et des fongicides) s'élevait à 77 300 tonnes selon les chiffres de l'Union des Industries de la Protection des Plantes (UIPP, <http://www.uipp.org>).

D'autres pollutions organiques sont causées par les matières organiques fermentescibles (MOF) constituées entre autres de matières fécales, boues, résidus de bois, graisses... Ces molécules sont issues non seulement des effluents domestiques mais également des rejets industriels dont ceux du secteur agro-alimentaire. Ces MOF constituent de loin la première cause de pollution des écosystèmes aquatiques et des ressources en eau potable. Leur dégradation génère deux problèmes : 1) une surconsommation d'oxygène par les microorganismes décomposeurs qui génère un déficit en oxygène, létal pour la faune aquatique, 2) la libération en grande quantité d'éléments minéraux azotés et phosphorés qui entraînent une prolifération d'organismes photosynthétiques aquatiques (algues et macrophytes) à l'origine de l'eutrophisation des plans et cours d'eau.

Parmi les dix polluants les plus fréquemment rencontrés sur le territoire français (seuls ou en mélange), trois correspondent à des familles de composés organiques (tableau 3). L'ensemble de ces substances organiques est détecté sur plus de 74 % des zones polluées en France.

Tableau 3. Nature des principaux polluants organiques présents dans les sols français. Le pourcentage de présence de ces éléments, seuls ou en mélange avec d'autres polluants (métalliques et / ou organiques), a été évalué sur 70 % des sites pollués (<http://basol.environnement.gouv.fr> ; mise à jour le 19/12/2007).

Type de polluant	Pourcentage de présence
Hydrocarbures	41,0
Hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP)	17,8
Solvants halogénés	15,4

3. Répartition spatiale de la pollution en France

Les régions ainsi que les départements et territoires d'Outre-Mer présentent des sites pollués dans des proportions variables pour un nombre total de zones contaminées dépassant 4000 (tableau 4). La région la plus atteinte par des problèmes de pollutions métalliques et / ou organiques est la région Rhône-Alpes avec 579 sites pollués en 2007, ce qui représente plus de 14 % des sites pollués en France. La partie Nord-Est est également touchée depuis la Normandie jusqu'à l'Alsace avec selon les régions 200 à 550 sites contaminés, ce qui correspond au total à presque la moitié des sites pollués du pays.

Tableau 4. Répartition des sites pollués en France et pourcentage de surfaces polluées par rapport à la totalité des sites (<http://basol.environnement.gouv.fr> ; mise à jour le 19/12/2007).

Région	Nombre de sites	Pourcentage
Rhône-Alpes	579	14,36
Nord- Pas-de-Calais	550	13,64
Ile de France	398	9,87
Lorraine	300	7,44
Alsace	251	6,22
Haute Normandie	209	5,18
Picardie	198	4,91
Aquitaine	191	4,74
Midi-Pyrénées	176	4,36
Centre	169	4,19
Provence-Alpes-Côte-D'azur	159	3,94
Champagne Ardenne	154	3,82
Pays de la Loire	94	2,33
Franche Comté	87	2,16
Languedoc-Roussillon	83	2,06
Auvergne	79	1,96
Bourgogne	77	1,91
Basse-Normandie	64	1,59
Bretagne	62	1,54
Poitou-Charentes	62	1,54
Limousin	49	1,21
Guadeloupe, Guyane, Martinique	21	0,52
La Réunion	13	0,32
Corse	7	0,17
Territoires d'Outre-Mer	1	0,02
Total	4 033	100

II. Toxicologie et surveillance des principaux polluants

1. Organismes français d'évaluation

Des efforts sont actuellement entrepris dans plusieurs pays pour contrôler les rejets de polluants, de même que pour accélérer le traitement de la pollution existante par les techniques appropriées, dans le but de préserver l'Homme et les écosystèmes. En France, l'INERIS (Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques) qui est sous la tutelle du ministère chargé de l'environnement a pour mission d'évaluer et de prévenir les risques accidentels ou chroniques pour l'Homme et l'environnement liés aux installations industrielles, aux substances chimiques et aux exploitations souterraines. Il effectue des travaux de recherche destinés à mieux comprendre les phénomènes dangereux et à mettre au point des outils opérationnels au service de l'évaluation et de la prévention des risques. Il

apporte un appui technique aux pouvoirs publics pour l'élaboration et la mise en œuvre des réglementations, des normes, des méthodes de référence et des systèmes de certification.

L'institut de veille sanitaire (InVS) quant à lui, réunit les missions de surveillance, de vigilance et d'alerte dans tous les domaines de la santé publique. C'est un établissement public, placé sous la tutelle du ministère chargé de la Santé. Outre les maladies (infectieuses, chroniques, d'origine professionnelle...), le champ d'action de l'InVS s'étend aux effets de l'environnement sur la santé. En effet les risques liés à la pollution de l'air, aux expositions aux polluants chimiques, aux rayonnements ionisants, les risques hydriques, les nuisances physiques ou encore les risques liés aux variations climatiques font partie de ses préoccupations.

2. Valeurs toxicologiques de référence (VTR)

2.1. Définition

Chaque année, à la demande du ministère de l'Environnement, l'INERIS établit une liste de valeurs toxicologiques de référence (VTR). Les VTR sont des indices toxicologiques établis par des instances internationales telles que l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) ou des structures nationales : ATSDR (agence américaine de répertoriage de substances toxiques et de maladies), US EPA (agence américaine pour la protection de l'environnement), Santé Canada, RIVM (institut national de la santé publique et de l'environnement des Pays-Bas)... Elles sont généralement spécifiques d'un effet donné, d'une voie et d'une durée d'exposition. Ce sont des valeurs qui caractérisent le lien entre une exposition à une substance toxique et un effet néfaste observé. Les VTR servent de base à la réglementation. Elles sont principalement élaborées pour des expositions sur la totalité de la durée de vie de l'individu. L'ATSDR et l'US EPA proposent également des VTR pour des périodes beaucoup plus courtes : inférieures ou égales à 14 jours (expositions aiguës) ou de 14 jours à 1 an (expositions subchroniques).

L'exposition à une substance toxique peut produire des effets biochimiques, histologiques ou morphologiques, se traduisant par des altérations spécifiques d'un organe, d'un système ou d'une fonction (système hématopoïétique, fonction de reproduction...), ou d'un processus biochimique ou biologique (cancer et mutagénicité). Ces effets varient selon l'intensité, la voie, la fréquence et la durée de l'exposition mais aussi en fonction de l'espèce,

du sexe, de l'âge et de l'état de santé des populations exposées. Ils peuvent être réversibles ou irréversibles, immédiats ou différés.

2.2. VTR des effets à seuil

Un effet à seuil est un effet qui survient au delà d'une certaine dose administrée de produit. Dès que le seuil est atteint, l'intensité de l'effet croît alors avec l'augmentation de la dose administrée. En deçà de cette dose, le risque est considéré comme nul. Ce sont principalement les effets non cancérogènes qui sont classés dans cette famille. L'effet peut être différent selon la voie d'exposition de l'organisme. Pour une exposition par voie orale, les VTR sont exprimées en masse de substance par kilogramme de poids corporel et par jour (mg/kg pc/j). A l'heure actuelle, il existe plusieurs VTR selon les organisations choisies :

- les « Reference doses (RfD) » (doses de référence) élaborées par l'US EPA,
- les « Minimal risk levels (MRL) » (niveau de risque minimal) élaborés par l'ATSDR,
- les « Acceptable daily intake (ADI) » ou « Dose Journalière Admissible (DJA) », encore appelées « Tolerable Daily Intake (TDI) » élaborées par l'OMS, Santé Canada ou RIVM.

Pour une exposition par voie respiratoire, la VTR s'exprime en masse de substance par mètre cube d'air ambiant (mg / m³) et correspond à la teneur de produit dans l'air ambiant à laquelle un individu peut être exposé sans constat d'effet nuisible. On recense : les « Reference Concentration (RfC) » élaborées par l'US EPA, les « Minimal risk levels (MRL) » élaborés par l'ATSDR et les « Concentrations Admissibles dans l'Air (CAA) » élaborées par l'OMS.

2.3. VTR des effets sans seuil

Un effet sans seuil se définit comme un effet qui apparaît de manière identique quelle que soit la dose reçue. La probabilité de survenue augmente avec la dose mais l'intensité de l'effet n'en dépend pas. L'hypothèse classiquement retenue est qu'une seule molécule de la substance toxique peut provoquer des changements dans une cellule et être à l'origine de l'effet observé. A l'origine, la notion d'absence de seuil était associée aux effets cancérogènes uniquement. Les différentes VTR rencontrées sont :

- pour la voie orale : « l'Excès de Risque Unitaire » (ERU) ou « oral slope factor » (Sfo) et le « Drinking Water Unit Risk » (DWUR) élaborés par l'US EPA,
- pour la voie respiratoire : « l'Inhalation Unit Risk » (IUR) élaboré par l'US EPA,

– quelle que soit la voie d'exposition : « l'excess lifetime Cancer Risk » ou CR élaboré par le RIVM et la « dose ou concentration tumorigène » (TD05 ou TC05) élaborée par Santé Canada.

L'ERU et le CR correspondent à la probabilité supplémentaire, par rapport à un sujet non exposé, qu'un individu contracte un cancer s'il est exposé pendant sa vie entière à une unité de dose du polluant.

2.4. VTR des principaux polluants

Les tableaux 5 et 6 présentent quelques VTR disponibles pour les substances organiques et les ETM ayant fait l'objet d'une fiche de données toxicologiques environnementales de l'INERIS (Bisson *et al.*, 2009). Elles y sont présentées pour les différentes voies d'exposition (orale et inhalation) et les durées ou intensités d'exposition (aigüe, subchronique ou chronique).

Tableau 5. VTR des principaux polluants organiques d'après Bisson *et al.* (2009).

Substances chimiques	Source	Voie d'exposition	Valeur de référence	Année de révision
Benzène	ATSDR	Orale	$MRL = 5.10^{-3} \text{ mg/kg/j}$	2007
		Inhalation (sub-chronique)	$MRL = 0,004 \text{ ppm}$	1997
		Inhalation (aigüe)	$MRL = 0,009 \text{ ppm}$	2007
		Inhalation (sub-chronique)	$MRL = 0,006 \text{ ppm}$	2007
		Inhalation (chronique)	$MRL = 0,003 \text{ ppm}$	2007
	US EPA	Inhalation	$RfC = 3.10^{-2} \text{ mg/m}^3$	2003
		Orale	$RfD = 4.10^{-3} \text{ mg/kg/j}$	2003
Dioxines et dérivés	OMS	Inhalation/orale via la chaîne alimentaire après dépôt	$DJA = 1 \text{ à } 4.10^{-6} \text{ } \mu\text{g TEQ/kg/j}$	2000
Phénanthrène	RIVM	Orale	$TDI = 4.10^{-2} \text{ mg/kg/j}$	2001

Tableau 6. VTR des principaux polluants métalliques d'après Bisson *et al.* (2009).

Substances chimiques	Source	Voie d'exposition	Valeur de référence	Année de révision
Arsenic	ATSDR	Orale (aiguë)	MRL = 5.10^{-3} mg/kg/j	2007
		Orale (chronique)	MRL = 3.10^{-4} mg/kg/j	2007
	US EPA	Orale	RfD = 3.10^{-4} mg/kg/j	1993
	RIVM	Inhalation	TCA = 10^{-3} mg/m ³	2001
		Orale	TDI = 10^{-3} mg/kg/j	2001
Cadmium	ATSDR	Orale (chronique)	MRL = 2.10^{-4} mg/kg/j Draft MRL = 10^{-4} mg/kg/j	1999 2008
		Orale (aiguë)	Draft MRL = 5.10^{-4} mg/kg/j	2008
		Inhalation (aiguë)	Draft MRL = 3.10^{-5} mg/m ³	2008
		Inhalation (chronique)	Draft MRL = 1.10^{-5} mg/m ³	2008
	OMS	Orale	DHTP = 7.10^{-3} mg/kg	2006
	RIVM	Orale	TDI = 5.10^{-4} mg/kg/j	1999
	US EPA	Orale (eau)	RfD = 5.10^{-4} mg/kg/j	1994
		Orale (alimentaire)	RfD = 10^{-3} mg/kg/j	1994
Chrome III	US EPA	Orale (chronique)	RfD = 1,5 mg/kg/j	1998
Chrome VI	US EPA	Orale (chronique)	RfD = 3.10^{-3} mg/kg/j	1998
	RIVM	Orale	TDI = 5.10^{-3} mg/kg/j	2001
Cuivre	OMS	Orale	TDI = 0,5 mg/kg/j	2006
	ATSDR	Orale (aiguë)	MRL = 0,01 mg/kg/j	2004
		Orale (subchronique)	MRL = 0,01 mg/kg/j	2004
	RIVM	Orale sub-chronique	MRL = 0,1 mg/kg/j	2004
		Inhalation	TCA = 1µg/m ³	2001
	ATSDR	Inhalation (sub-chronique)	MRL = 2.10^{-4} mg/m ³	2005
		Inhalation (chronique)	MRL = 9.10^{-5} mg/m ³	2005
	OMS	Orale (chronique)	TDI = 12 µg/kg/j	2006
	RIVM	Inhalation	TCA = 5.10^{-5} mg/m ³	2001
		Orale	TDI = 5.10^{-2} mg/kg/j	2001
Plomb	OMS	Orale	DHT = 25µg/kg	2006
	RIVM	Orale	TDI = $3,6.10^{-3}$ mg/kg/j	2001
Uranium	OMS	Orale	TDI = 0,6 µg/kg/j	2006
	US EPA	Orale (sels solubles)	RfD = 3 µg/kg/j	1989
	ATSDR	Orale (sub-chronique, sels solubles)	MRL = 2 µg/kg/j	1999
		Inhalation (chronique, sels solubles)	MRL = 3.10^{-4} mg/m ³	1999
		Inhalation (forme insoluble)	MRL = 8.10^{-3} mg/m ³	1999
Zinc	US EPA	Orale	RfD = 3.10^{-4} mg/kg/j	1992
	ATSDR	Orale (subchronique)	MRL = 0,3 mg/kg/j	1994
	RIVM	Orale	TDI = 0,5 mg/kg/j	2001

Deuxième partie :

Les différents procédés de phytoremédiation

La phytoremédiation est une technologie émergente qui utilise les plantes ou les microorganismes de la rhizosphère pour extraire, transformer ou stocker les polluants contenus dans les sols, les sédiments, les eaux souterraines ou de surface et même l'atmosphère (Susarla *et al.*, 2002). A l'heure actuelle, la phytoremédiation est utilisée pour le traitement de plusieurs classes de polluants tels que les hydrocarbures, les solvants chlorés, les pesticides, les composés explosifs ou encore les ETM. Cette méthode de dépollution, plus longue qu'une extraction classique, s'avèrerait cependant moins coûteuse, ce qui la place en bonne position dans les stratégies de dépollution. Il est admis que les procédés de phytoremédiation entraînent des dépenses 50 à 80 % inférieures à celles nécessaires pour des traitements conventionnels (Vassilev *et al.*, 2007).

I. Histoire de la phytoremédiation

La phytoremédiation est un concept ancien qui aurait été utilisé dès les premières civilisations pour recycler la ressource en eau par l'exploitation des marais. Cependant les premières installations qui témoignent d'une utilisation volontaire d'une zone humide pour l'épuration de l'eau datent de la fin du XIX^e siècle.

En 1871 les travaux de Mille et Claye sur la dégradation des polluants des eaux usées par les cultures agricoles permirent de mettre en place à Paris un hectare de « jardin modèle » ouvert au public afin de convaincre les cultivateurs du bienfait de ce type d'installation. En 1875, les villes de Moscou et de Berlin mettent en place des systèmes d'épuration similaires sur une surface de 25 000 ha pour la région berlinoise. En 1901, la ville de San Antonio met en place un lac artificiel (lac Mitchell) d'une surface de 275 ha avec pour objectif de traiter ses eaux usées (Boutin *et al.*, 2000). A la même époque, la ville de Munich développe un projet similaire en installant un plan d'eau de 233 ha pour créer une station d'épuration biologique. Cette technique permet de reproduire les mécanismes de dégradation, de transformation et de recyclage de la matière organique grâce aux propriétés épuratrices d'algues microscopiques (Boutin *et al.*, 2000).

Les végétaux vasculaires flottants ou enracinés (les macrophytes), n'interviendront dans le traitement que beaucoup plus tard. Leur effet dépolluant est connu de façon empirique depuis très longtemps mais ce n'est qu'à partir des années 1950 que des chercheurs allemands commencent à étudier ce phénomène de façon scientifique. C'est le docteur Kathe Seidel de l'institut Max Planck qui entreprit les premiers travaux scientifiques suivis d'expérimentations à l'aide d'un pilote de zone humide artificielle pour le traitement d'eaux usées (Campbell et Ogden, 1999). Ces travaux présentés pour la première fois en 1953 montrèrent que certaines espèces végétales comme le jonc des marais (*Scirpus lacustris*) pouvaient avoir une réelle activité épuratrice. Il a cependant fallu attendre jusqu'à 1972 pour que la première station fonctionnelle soit construite à Othfresen en Allemagne (Boutin *et al.*, 2000). Ce procédé a été introduit en France dans les années 1980 et l'une des premières installations, toujours en service à l'heure actuelle, a été réalisée dans la commune de Pannissières dans le Jura.

Depuis les années 1970, la phytoremédiation est en plein essor. L'utilisation de plantes pour éliminer notamment les ETM et les pesticides, suscite un intérêt croissant et fait l'objet de nombreuses études. La nature du polluant et son accessibilité pour les plantes sont déterminantes dans le choix du procédé de phytoremédiation à utiliser pour un traitement optimal.

II. Conditions de mise en œuvre de la phytoremédiation

La localisation dans le substrat du ou des polluant(s) à traiter est un facteur important pour envisager le type de phytoremédiation. Selon le degré d'accessibilité des polluants par les plantes, trois méthodes de traitement sont envisageables.

1. La phytoremédiation *in situ*

Ce procédé est le plus simple à mettre en œuvre et correspond à la stratégie la moins coûteuse. Il consiste à faire pousser des plantes dans des eaux de surface ou sur un sol ou des sédiments contaminés en faible profondeur. Dans cette approche, le matériel contaminé est facilement accessible pour le système souterrain des plantes enracinées ou pour tous les organes des macrophytes flottantes et n'est donc pas extrait du milieu avant le traitement par phytoremédiation (Ghosh et Singh, 2005). Si les polluants sont uniquement extraits et

accumulés dans la plante sans être transformés (ce qui arrive souvent pour les ETM), les plantes utilisées doivent ensuite être récoltées en vue de leur confinement ou de l'extraction des polluants.

2. La phytoremédiation *ex situ*

Cette stratégie est appliquée lorsque les racines des plantes ne peuvent pas atteindre les polluants. C'est le cas par exemple du traitement d'une nappe phréatique profonde ou d'une pollution d'un sol sur une épaisseur importante. Dans ce cas, les matériaux contaminés sont d'abord extraits mécaniquement du site puis transférés dans une zone de traitement où ils pourront être mis directement au contact des espèces végétales sélectionnées. Après l'extraction des polluants et la récupération des plantes, les substrats épurés sont ensuite replacés dans leur environnement d'origine. Le lieu de traitement peut être éloigné ou non du site contaminé mais quelle que soit sa localisation, l'extraction préalable des matériaux contaminés engendre un coût plus élevé que pour la phytoremédiation *in situ*. De plus, cette méthode génère beaucoup plus de perturbations au sein de l'écosystème que la phytoremédiation *in situ*. Elle n'apparaît donc pas plus écologique qu'un traitement chimique classique.

3. La phytoremédiation *in vitro*

Dans cette dernière approche, ce sont uniquement des organes, des composants de la plante (essentiellement des enzymes) ou des cellules (microalgues) qui sont utilisés et non pas des plantes entières comme dans les deux stratégies précédentes (Medina *et al.*, 2004). Ces fractions végétales peuvent être utilisées directement sur le site pollué ou après extraction des substrats contaminés et visent à transformer essentiellement des polluants organiques. La phytoremédiation *in vitro* est plus onéreuse que les techniques précédentes car elle nécessite la préparation de fragments végétaux, de suspensions cellulaires, voire la purification d'enzymes. Cependant, une approche prometteuse est l'utilisation d'écorces modifiées de certaines espèces arborescentes pour fixer des polluants organiques et surtout métalliques présents en milieu aqueux (Prasad *et al.*, 2001). Cette technique permet de concentrer les polluants dans un volume final plus faible et donc plus facile à traiter par la suite. L'autre intérêt de cette méthode est de valoriser en même temps les écorces issues de la transformation du bois, ce qui peut réduire considérablement les coûts de préparation. Cette

méthode constitue un des axes de recherche du Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles et certains travaux déjà réalisés et brevetés font d'ailleurs l'objet d'une collaboration régionale avec les sociétés Pe@rl et AREVA sur des moyens de décontamination d'eaux contenant des radionucléides.

III. Mécanismes de phytoremédiation

Selon les espèces végétales et le type de polluant, la phytoremédiation peut se faire de plusieurs manières qui sont résumées sur la figure 1 ci-dessous.

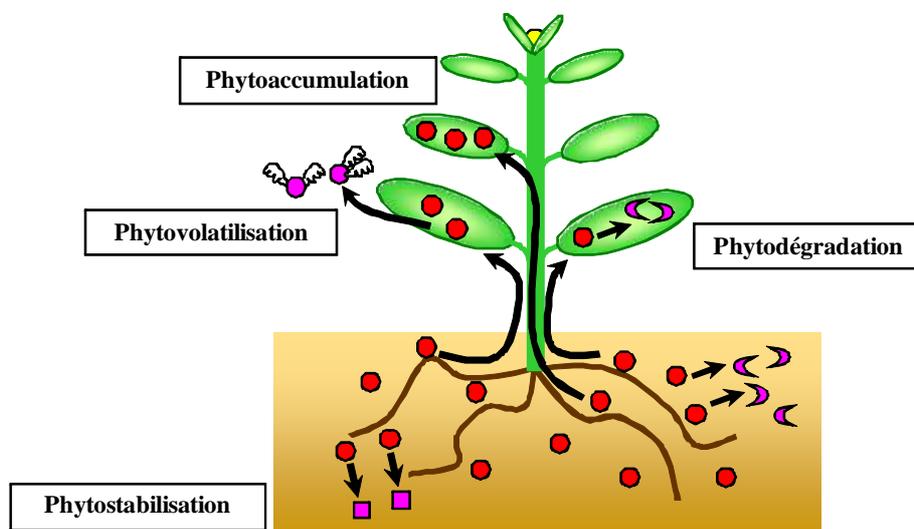


Figure 1. Mécanismes de phytoremédiation. Les xénobiotiques (ETM ou composés organiques) représentés en rouge peuvent s'accumuler dans la plante en conservant la même forme ou être transformés (symboles roses) de différentes manières : dégradation dans le sol ou dans la plante (symboles en croissant), volatilisation dans l'atmosphère (ronds ailés) ou stabilisation dans le sol (carrés).

La première étape de la phytoremédiation est l'absorption ou extraction du polluant par voie racinaire pour un polluant du sol ou des eaux ou par voie aérienne pour un polluant atmosphérique. Ensuite, plusieurs mécanismes peuvent être développés par les plantes : certains polluants sont stockés et compartimentés dans la plante, ce qui correspond à une majorité des ETM (phytoaccumulation). D'autres polluants sont transformés par la plante en composés secondaires moins toxiques (phytodégradation) qui peuvent rester dans la plante ou être éliminés par voie racinaire ou aérienne (phytovolatilisation). Il s'agit généralement de polluants organiques mais quelques ETM comme le mercure et le sélénium peuvent être éliminés par voir aérienne. A l'opposé, certaines plantes sont capables de sécréter des

composés par voie racinaire afin de complexer les polluants dans le sol au lieu de les absorber (phytostabilisation).

1. Phytoremédiation par extraction des polluants

1.1. Phytoaccumulation

Ce mécanisme permet d'extraire et d'accumuler des polluants dans les plantes mais sans que ces derniers ne subissent de dégradation ou de transformation. La phytoaccumulation est observée pour une majorité des EMT et dans des cas plus rares pour des polluants organiques comme les perchlorates (Meagher, 2000 ; Susarla *et al.*, 2002). Certaines plantes dites hyperaccumulatrices sont capables d'emmagasiner des grandes quantités d'éléments métalliques. Les polluants absorbés peuvent ensuite être extraits des tissus végétaux. Lorsque le but est de récolter les plantes, celles-ci doivent être capables de transporter ces polluants des racines vers leurs parties aériennes. En effet, si les polluants demeurent dans les racines, l'efficacité du traitement s'avère amoindrie, certaines racines ne pouvant être arrachées entièrement. Ceci aurait pour conséquence de libérer les polluants préalablement piégés.

Un métal est dit hyperaccumulé lorsque sa masse dans les différents tissus de la plante est supérieure à 0,1 % de la masse sèche de la plante, soit 1 g / kg (Baker et Brooks, 1989). Il existe cependant des exceptions à cette définition : l'hyperaccumulation du cadmium est définie pour une quantité supérieure ou égale à 0,01 % de la masse sèche de la plante et les plantes hyperaccumulatrices de fer, de manganèse ou de zinc doivent contenir au moins 1 % de ces éléments dans leur masse sèche. Il existe peu d'études sur les plantes hyperaccumulatrices de radioéléments. Les rares données publiées sur les plantes capables de stocker de l'uranium mentionnent *Brassica juncea*, une Brassicacée pouvant accumuler dans certaines conditions jusqu'à 5 g par kg de matière sèche (Huang *et al.*, 1998). Certaines espèces sont capables d'accumuler deux ETM ou parfois même davantage. Par exemple, le tabouret bleuâtre (*Thlaspi caerulescens*) est une Brassicacée hyperaccumulatrice de cadmium, plomb, nickel et zinc (Ebbs *et al.*, 2002).

Il existe environ 450 espèces hyperaccumulatrices connues à l'heure actuelle (Baker et Brooks, 1989 ; Verbruggen *et al.*, 2009). Elles sont réparties dans environ 45 familles et près de 25 % de ces espèces appartiennent à la famille des Brassicacées. D'autres familles sont également bien représentées mais dans des proportions plus faibles : Astéracées, Caryophyllacées, Euphorbiacées, Fabacées, Lamiacées ou encore Poacées (Prasad et Freitas,

2003). Parmi ces 450 espèces, environ 390 sont des hyperaccumulatrices de nickel. Le tableau 7 présente quelques exemples de plantes hyperaccumulatrices et montre qu'un ETM peut être extrait pas des espèces appartenant à différentes familles botaniques, à l'exception peut-être de l'arsenic pour lequel les espèces hyperaccumulatrices identifiées à ce jour sont toutes des fougères de la famille des Ptéridacées.

Les mécanismes d'absorption, de transport et de compartimentation des ETM seront décrits plus précisément dans la troisième partie de l'introduction bibliographique car ils sont liés directement aux activités de recherche présentées dans ce manuscrit et nécessitent donc l'apport d'informations supplémentaires.

Tableau 7. Nombre d'espèces hyperaccumulatrices d'ETM.

ETM	Nombre d'espèces	Exemples	Famille	Référence
Arsenic	> 5	<i>Pteris vittata</i> <i>P. cretica</i> , <i>P. longifolia</i> , <i>P. umbrosa</i> <i>Pityrogramma calomelanos</i>	Ptéridacées	Ma <i>et al.</i> , 2001 Zhao <i>et al.</i> , 2002 Francesconi <i>et al.</i> , 2002
Cadmium	> 10	<i>Thlaspi caerulescens</i> <i>Arabis gemmifera</i> <i>Arabidopsis halleri</i> <i>Arabis paniculata</i> <i>Viola baoshanensis</i> <i>Solanum nigrum</i> <i>Conyza canadensis</i>	Brassicacées Brassicacées Brassicacées Brassicacées Violacées Solanacées Astéracées	Baker <i>et al.</i> , 1994 Kubota et Takenaka, 2003 Zhao <i>et al.</i> , 2006 Tang <i>et al.</i> , 2009 Liu <i>et al.</i> , 2004 Wei <i>et al.</i> , 2005 Wei <i>et al.</i> , 2009
Chrome	> 10	<i>Lepertospermum scoparium</i> <i>Dicoma niccolifera</i> , <i>Sutera fodina</i>	Myrtacées Astéracées Scrofulariacées	Lyon <i>et al.</i> , 1967 Baker et Brooks, 1989
Cobalt	> 25	<i>Crotalaria cobalticola</i>	Fabacées	Oven <i>et al.</i> , 2002
Cuivre	> 25	<i>Elsholtzia splendens</i>	Lamiacées	Yang <i>et al.</i> , 1998
Manganèse	> 10	<i>Austromyrtus bidwillii</i> <i>Phytolacca acinosa</i>	Myrtacées Phytolaccacées	Bidwell <i>et al.</i> , 2002 Xue <i>et al.</i> , 2004
Nickel	> 390	<i>Alyssum bertolonii</i> <i>Berkheya coddii</i>	Brassicacées Astéracées	Robinson <i>et al.</i> , 1997, 1999
Plomb	> 5	<i>Sesbania drummondii</i>	Fabacées	Sahi <i>et al.</i> , 2002
Zinc	> 20	<i>Sedum alfredii</i> <i>Arabis gemmifera</i> <i>Thlaspi caerulescens</i>	Crassulacées Brassicacées Brassicacées	Yang <i>et al.</i> , 2002 Kubota et Tanekana, 2003 Baker <i>et al.</i> , 1994
Uranium	< 5	<i>Brassica rapa</i> , <i>B. juncea</i> <i>Helianthus annuus</i>	Brassicacées Astéracées	Sheppard <i>et al.</i> , 1992 Huang <i>et al.</i> , 1998 Entry <i>et al.</i> , 1996

1.2. Phytodégradation ou phytotransformation

La phytodégradation est la capacité des plantes de transformer des polluants organiques en sous-produits peu ou pas toxiques pour la plante (Newman et Reynolds, 2004). Elle ne s'applique donc pas aux ETM. La dégradation peut se faire au niveau des racines ou dans les parties aériennes sans intervention de microorganismes.

1.2.1. Enzymes impliquées

Les polluants organiques possèdent des structures diverses et sont donc dégradés par des enzymes différentes. Certaines enzymes sont cependant fréquemment induites en réponse à divers polluants. C'est le cas de celles appartenant à la famille des mono-oxygénases à cytochrome P450 et celle des glutathion-S-transférases (Pflugmacher *et al.*, 2000 ; Werck-Reichhart *et al.*, 2000 ; Shröder *et al.*, 2007). Les enzymes de ces deux familles sont présentes chez tous les végétaux mais toutes les isoformes ne sont pas produites, ce qui implique que

chaque espèce végétale peut potentiellement transformer certains polluants organiques mais pas tous.

Les isoformes de glutathion-S-transférases (GST) sont séparées en six classes dont deux majoritaires, les classes phi et tau, peuvent catalyser le clivage de nombreux composés organiques (dont les herbicides) comme indiqué sur la figure 2 (Pflugmacher *et al.*, 2000 ; Dixon *et al.*, 2002). Chez *Arabidopsis thaliana*, 48 gènes codant des GST ont été identifiés, ce qui montre la grande quantité potentielle d'isoformes et la possibilité de décomposer des molécules variées. Les sous-produits issus de l'action des GST sont complexés (ou conjugués) avec du glutathion ou homoglutathion selon les espèces puis transférés du cytoplasme vers la vacuole où ces sous-produits sont stockés de manière inoffensive pour la cellule.

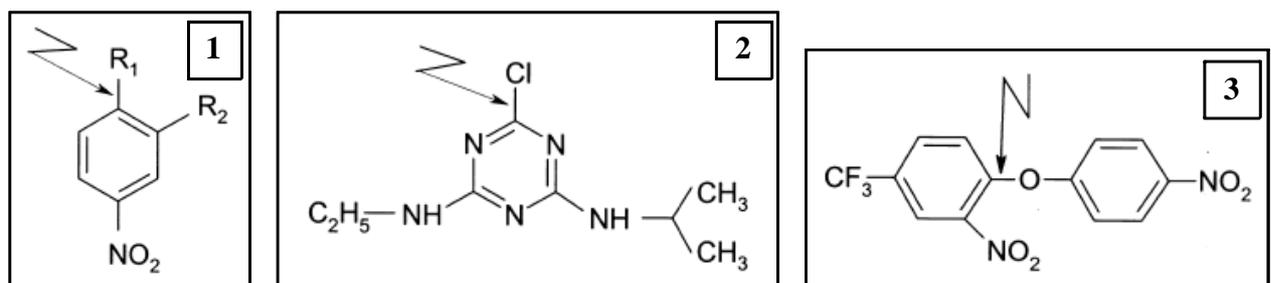


Figure 2. Sites d'action des GST sur différentes molécules organiques comme des dérivés de nitrobenzène (1), des composés chlorés comme l'herbicide atrazine (2) ou des composés fluorés comme l'herbicide flurodifène (3) (Pflugmacher *et al.*, 2000).

Les mono-oxygénases à cytochrome P450 constituent également une vaste famille d'enzymes. Chez *Arabidopsis thaliana*, environ 300 gènes codant ces enzymes ont été identifiés. Ces isoformes peuvent transformer un polluant organique en plusieurs sous-produits comme représenté sur la figure 3.

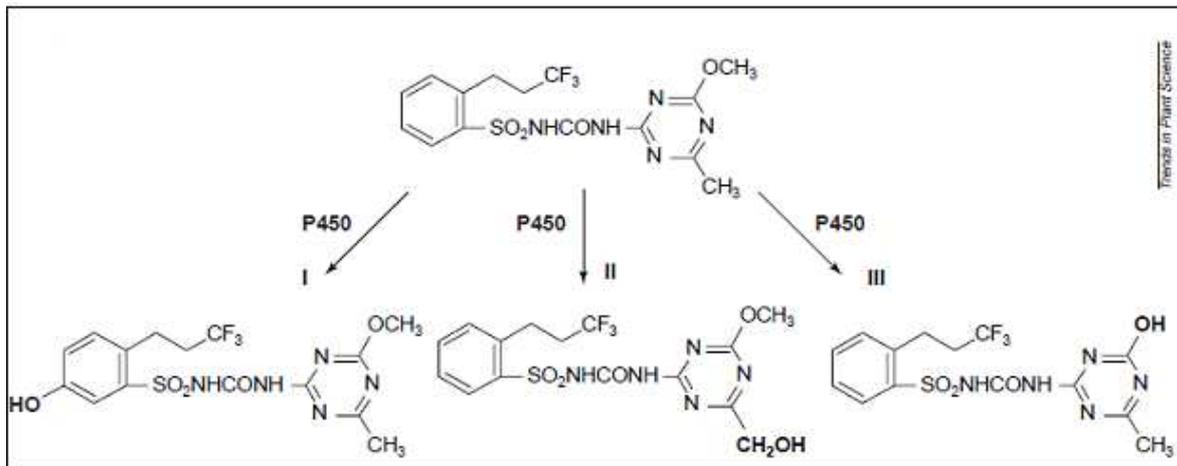


Figure 3. Exemple d'activité de mono-oxygénases à cytochrome P450 à travers la transformation de l'herbicide prosulfuron en trois produits chez le blé (Werck-Reichhart *et al.*, 2000).

D'autres enzymes sont également responsables de la dégradation de polluants organiques mais de manière un peu plus restreinte. Quelques exemples sont présentés dans le tableau 8.

Tableau 8. Enzymes identifiées comme intervenant dans la phytodégradation (reporté par Gerhardt *et al.*, 2009).

Enzyme	Composés dégradés	Exemple d'espèce végétale
Nitroréductase E.C. 1.6.99.7	Composés nitro-aromatiques	Peupliers hybrides (<i>Populus sp.</i>) ; Soja (<i>Glycine max</i>)
Nitrilases E.C. 3.5.5.1 et 3.5.5.7	Nitriles aromatiques et aliphatiques	Saule (<i>Salix sp.</i>)
Phosphatase acide E.C. 3.1.3.2	Organophosphates	Lentille d'eau géante (<i>Spirodela polyrhiza</i>)
Déhalogénases E.C. 3.8.1.5 et 3.8.1.2	Hydrocarbures halogénés aromatiques (PCBs) ou aliphatiques (trichloroéthylène)	Peupliers hybrides (<i>Populus sp.</i>)
Laccase E.C. 1.10.3.2	Composés aromatiques	Luzerne (<i>Medicago sativa</i>)
Peroxydase E.C. 1.1.1.7.	Composés aromatiques, hydrocarbures aliphatiques halogénés	Raifort (<i>Armoracia rusticana</i>)

1.2.2. Efficacité de la phytodégradation de quelques familles de composés organiques

Les pesticides.

Les composés chlorés aromatiques sont très nombreux parmi les pesticides. Deux d'entre eux, l'atrazine et le 1,1,1-trichloro-2,2-bis(p-chlorophényl) éthane (DDT), sont très répandus dans les sols et les eaux de surface. Il y a quelques années des racines de raifort

(*Armoracia rusticana*) ont été proposées pour traiter des eaux de surface contaminées par des phénols chlorés (Roper *et al.*, 1996). Burken et Schnoor (1997) ont quant à eux utilisé des peupliers hybrides (*Populus deltoides* x *nigra* DN34, Imperial Carolina) et ont montré la capacité de ces plantes à extraire, hydrolyser et déalkyler l'atrazine en sous-produits beaucoup moins toxiques pour la plante. D'autres travaux réalisés sur des roseaux (*Phragmites australis*) soumis à différents composés chlorés, ont également montré la dégradation de ces polluants en sous-produits non dangereux pour les plantes (Schröder *et al.*, 2008).

Les composés explosifs.

La capacité des plantes à extraire et transformer le 2,4,6-trinitrotoluène (TNT) contenu dans des eaux ou des sols a déjà fait l'objet de plusieurs travaux (Palazzo et Leggett, 1986 ; Cataldo *et al.*, 1989 ; Mueller *et al.*, 1995; Schnoor *et al.*, 1995 ; Young, 1995 ; Medina et McCutcheon, 1996 ; Best *et al.*, 1997 ; Folsom *et al.*, 1998 ; Rivera *et al.*, 1998). Des études réalisées sur une espèce de myriophylle (*Myriophyllum spicatum*) avec du TNT radioactif ont mis en évidence que la radioactivité augmentait au cours du temps dans la plante mais que les composés radioactifs détectés étaient des sous-produits du TNT (Vanderford *et al.*, 1997). Thomson *et al.* (1998a) se sont intéressés à l'utilisation de peupliers hybrides (*Populus deltoides* x *nigra* DN34) pour traiter des sols contaminés au TNT. Ils ont montré que le composé était dégradé au bout de 10 jours d'expérience en 2-amino-4,6-dinitrotoluène, 4-amino-2,6-dinitrotoluène et d'autres molécules non identifiées. Des travaux réalisés sur *Arabidopsis thaliana* ont montré que les enzymes impliquées dans la dégradation du TNT appartiennent aux familles des cytochromes P450, glutathion-S-transférases (GST) et nitroréductases (Eckman *et al.*, 2003). D'autres études sur une espèce de peuplier (*Populus trichocarpa*) ont confirmé l'implication des GST dans la transformation du TNT (Brentner *et al.*, 2008).

Très peu de travaux ont été menés sur le traitement d'autres types d'explosifs tels que l'hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine (RDX) ou l'octahydro-1,3,5,7-tétranitro-1,3,5,7-tétraocine (HMX). Quelques publications ont montré toutefois que leur traitement par phytoremédiation n'est pas aussi efficace que celui du TNT (Best *et al.*, 1997; Medina *et al.*, 1998; Sikora *et al.*, 1998 ; Groom *et al.*, 2002). Une étude en laboratoire fait tout de même état de la phytodégradation complète de la nitroglycérine en glycérol mononitrate chez la betterave (Goel *et al.*, 1997).

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP).

Des expériences réalisées en serre sur *Mirabilis jalapa* indiquent que cette plante peut dégrader en 120 jours plus de 60 % des résidus de pétrole présents initialement dans le substrat à hauteur de 10 g par kg de sol (Peng *et al.*, 2009). Un sol plus fortement contaminé, de l'ordre de 20 g de résidus par kg, est tout de même décontaminé à plus de 40 % par cette espèce végétale après la même période expérimentale.

Une autre étude récente a mis en évidence la dégradation d'hydrocarbures présents dans des marais salants par une espèce de jonc, *Juncus rosemarinus* (Lin et Mendelssohn, 2009). Un an après le début du traitement, plus de 99 % des résidus étaient éliminés dans la couche 0-2 cm de sol et 97 % des résidus avaient disparu de la couche 8-10 cm.

1.3. Phytovolatilisation

La phytovolatilisation est une forme particulière de phytodégradation. En effet, les plantes absorbent un polluant et le convertissent en une forme volatile peu ou pas toxique. Ce phénomène peu fréquent a été mis en évidence surtout pour la transformation du sélénium, du mercure et de quelques solvants chlorés. Des plantes peuvent par exemple convertir du sélénium en diméthyl sélénide qui est une forme volatile 100 fois moins toxique du sélénium (Meagher, 2000). Deux espèces végétales, la moutarde chinoise (*Brassica juncea*) et une macro algue d'eau douce, la charophyte dioïque (*Chara canescens*) ont été décrites comme de bons phytovolatilisateurs de ce métal (De Souza *et al.*, 2002 ; Terry *et al.*, 2003). Cependant, le sélénium du sol entre en compétition avec les sulfates dans les voies d'absorption et de transport et peut être incorporé à la place du soufre dans la synthèse de cystéine ou de méthionine pour générer des protéines non fonctionnelles comme indiqué sur la figure 4 (Terry *et al.*, 2000). Pour des espèces hyperaccumulatrices, qui n'incorporent pas le sélénium dans des acides aminés mais le compartimentent dans les vacuoles, on peut ainsi trouver des quantités de sélénium comprises entre quelques centaines de milligrammes à presque 10 g / kg de matière sèche (Zhu *et al.*, 2009).

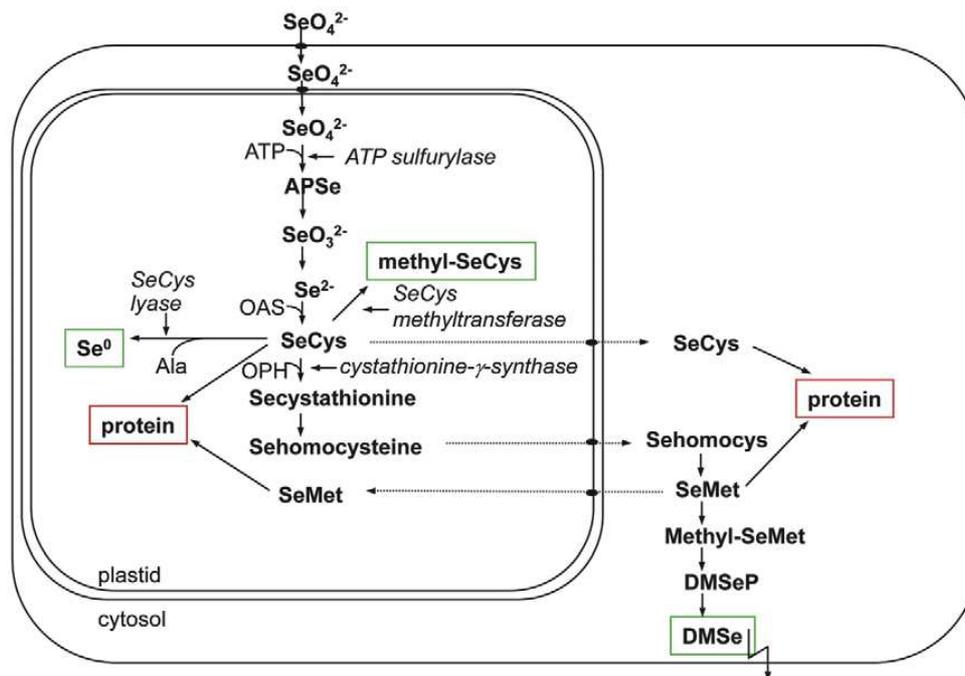


Figure 4. Transformation du sélénium par incorporation dans des acides aminés ou par phytovolatilisation sous forme de diméthyl sélélide, DMS_e (Pilon-Smits et LeDuc, 2009).

Le mercure est un ETM présent généralement sous forme de méthyl mercure. Une étude réalisée en chambre de culture sur *Brassica juncea* a montré la possibilité de volatiliser le mercure présent initialement dans le milieu de culture (Moreno *et al.*, 2008). Cependant, le procédé reste peu efficace car les plantes expulsaient environ 60 µg de mercure par jour pour un milieu contenant ce métal à une concentration de 10 mg / L. L'alternative proposée par Bizily *et al.* (2003) est la surexpression de deux gènes d'origine bactérienne, *MerA* et *MerB* qui codent respectivement une réductase et une lyase (figure 5). Cette surexpression réalisée chez *Arabidopsis thaliana* a permis d'augmenter d'un facteur 50 la capacité de phytovolatilisation du mercure.

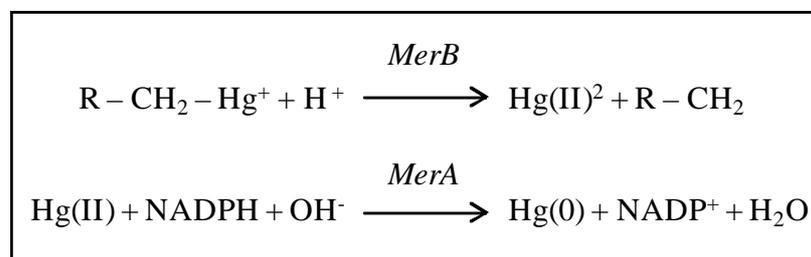


Figure 5. Phytovolatilization du mercure par surexpression des gènes *MerB* et *MerA* d'après Bizily *et al.* (2003).

1.4. Rhizofiltration

Ce mécanisme trouve des applications dans le cadre de la dépollution des eaux usées. Il est basé sur l'utilisation de plantes flottantes ou enracinées (mais partiellement immergées de type hydrophytes et / ou héliophytes) possédant un fort taux d'évapotranspiration (Raskin *et al.*, 1997). Les plantes fonctionnent comme des pompes qui vont absorber de grandes quantités d'eau et en rejeter par transpiration. Certaines espèces ligneuses tolérant des sols gorgés d'eau sont également des modèles intéressants pour la rhizofiltration. C'est par exemple le cas des saules qui peuvent absorber jusqu'à 200 litres d'eau par jour (Susarla *et al.*, 2002). Le résultat est une forte absorption des polluants métalliques ou organiques qui est due à la forte activité d'absorption d'eau par les plantes sélectionnées. La rhizofiltration est donc une étape préalable à une phytoaccumulation ou à une phytodégradation selon le type de polluant. De plus, l'assèchement du milieu aquatique permet la création d'un milieu aérobie favorable à la dégradation par des microorganismes des polluants non absorbés par les plantes. Cette rhizofiltration peut être réalisée directement sur le site (phytoremédiation *in situ*) ou par culture hydroponique en dehors du site après récupération et transfert des eaux contaminées (phytoremédiation *ex situ*).

Parmi les études réalisées, il a été montré que la jacinthe d'eau (*Eichhornia crassipes*), une hydrophyte flottante, est une plante très prometteuse pouvant accumuler de nombreux métaux lourds suite à l'absorption d'eau (Liao et Chang, 2004). Les quantités de métal accumulées par ha vont de 0,24 kg pour le cadmium à plus de 25 kg pour le zinc. Les travaux de Zhang *et al.* (2007a) comparant l'efficacité de plusieurs hydrophytes dans le traitement d'eaux contaminées ont mis en lumière une corrélation entre une extraction active des polluants aquatiques par rhizofiltration et la stimulation d'activités anti-oxydantes comme la catalase ou la synthèse de proline.

Un système de rhizofiltration connu sous le terme général de jardins, bassins ou lits filtrants est commercialisé depuis plusieurs années, notamment par l'entreprise Phytorestore® (<http://www.phytorestore.com/>). De telles solutions intéressent des grands groupes industriels comme l'entreprise Rhodia de Lyon qui m'a recruté sur une période de 5 mois au cours de ma thèse pour réaliser une étude de faisabilité d'un tel système pour le traitement d'effluents aqueux.

2. Phytoremédiation par rétention des polluants dans le substrat

2.1. Phytostabilisation

C'est un mécanisme permettant de limiter la migration des polluants (essentiellement des ETM) dans les sols ainsi que leur absorption par les plantes comme indiqué sur la figure 6.

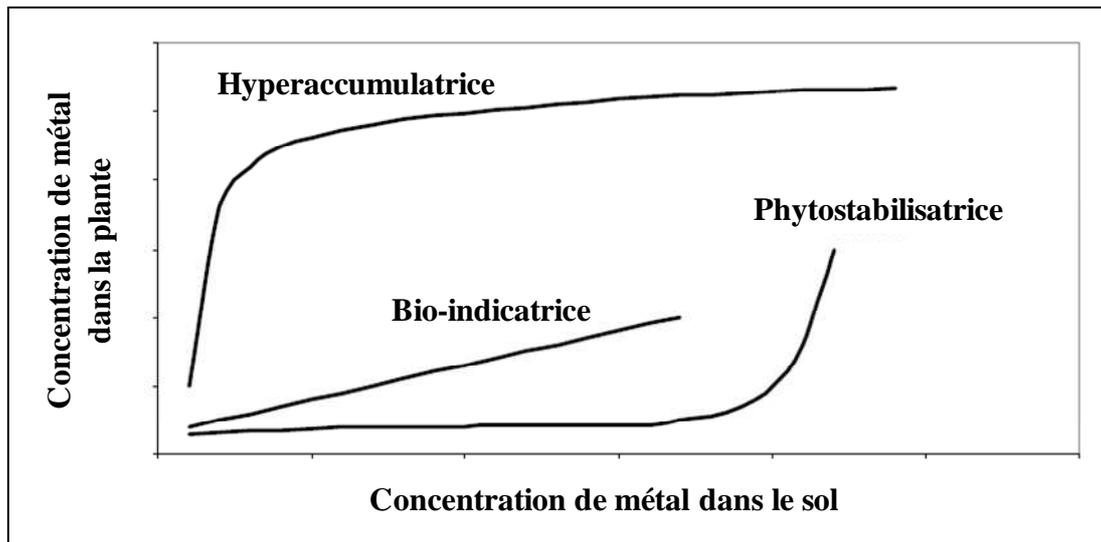


Figure 6. Différence entre les plantes hyperaccumulatrices, les plantes phytostabilisatrices et des plantes uniquement considérées comme bio-indicatrices de pollution par des métaux lourds d'après Ghosh et Singh, 2005 (modifié).

Les polluants sont ainsi immobilisés dans le sol et ne diffusent pas autour du site contaminé. L'avantage de cette stratégie par rapport à la phytoaccumulation est de ne pas avoir à traiter les plantes par la suite. Cependant, la phytostabilisation, si elle évite la propagation des polluants, ne permet pas une réelle décontamination des sites. Il s'agit plutôt d'une solution temporaire pour confiner rapidement une pollution avant qu'elle n'atteigne les milieux situés à proximité. Cette stratégie est généralement mise en place sur des mines d'extraction de métaux en fin d'exploitation avant d'utiliser par la suite des méthodes de dépollution de ces sites. Ce processus serait dû à la capacité de certaines plantes de sécréter des composés dans le milieu par voie racinaire. Ces molécules formeraient des complexes avec les cations métalliques, ce qui entraînerait la précipitation de ces derniers dans le sol et une forte diminution de leur absorption par les racines. La littérature donne peu d'exemples de métaux retenus dans le sol par les exsudats racinaires car ces exsudats ont plutôt l'effet inverse de solubiliser les éléments métalliques. Plusieurs publications font état cependant de

la libération par voie racinaire d'acides organiques permettant la stabilisation de l'aluminium dans le sol. Selon les espèces végétales, un seul acide organique majoritaire peut être sécrété. Par exemple, les racines du haricot (*Phaseolus vulgaris*) sécrètent du citrate (Miyasaka *et al.*, 1991) alors que le blé (*Triticum aestivum*) libère essentiellement du malate (Delhaize *et al.*, 1993). Toutefois, certaines espèces peuvent exsuder plus d'un acide comme le seigle (*Secale cereale*) qui excrète à la fois du malate et du citrate (Li *et al.*, 2000). Ces acides organiques sont sécrétés par les racines grâce à des canaux protéiques à anions liés à la membrane plasmique (Ma *et al.*, 2001 ; Pineros et Kochian, 2001).

La phytostabilisation est souvent améliorée par addition d'amendements dans le milieu contaminé. Ceux-ci ont pour objectif de modifier le sol et plus particulièrement d'augmenter le pH car un sol acide favorise la solubilité et l'absorption des métaux par les plantes. Les métaux sont généralement adsorbés au niveau de ces amendements et ne sont donc plus disponibles pour une absorption par voie racinaire. Il semblerait, d'après de nombreuses publications, que les amendements constituent la source majoritaire de stabilisation des métaux dans le sol et non pas des exsudats racinaires. Les amendements les plus fréquemment apportés (sans que les mécanismes de stabilisation soient réellement expliqués) sont des composés phosphatés, divers produits alcalinisants ou encore des composés organiques de type compost ou boues (Mench *et al.*, 1998 ; Ruttens *et al.*, 2006 ; Santibanez *et al.*, 2008 ; Kumpiene *et al.*, 2009). Des amendements avec des composés riches en calcium sont également efficaces car ce cation entre en compétition avec les cations métalliques au niveau de l'absorption par voie racinaire. Il a été montré par exemple au Brésil qu'un ajout de boues enrichies en silicate de calcium sur un sol colonisé par une Poacée (*Brachiaria decumbens*) permettait de limiter l'absorption de zinc et de cadmium dans la plante et d'augmenter la stabilisation de ces métaux dans le sol (Dos Santos *et al.*, 2007). Une autre étude a montré que la présence de fer et de manganèse dans les amendements entraînait la formation de plaques d'hydroxydes de fer et de manganèse autour des racines de deux espèces de spartines (Cambrollé *et al.*, 2008). Ces structures joueraient un rôle de barrière en adsorbant des métaux comme le plomb ou le zinc et en les stabilisant dans le sol autour du réseau racinaire.

2.2. Rhizodégradation

La rhizodégradation est un traitement biologique d'un polluant organique grâce à l'activité des bactéries et des champignons de la rhizosphère de certaines plantes vasculaires. La rhizosphère est une zone à forte densité et activité microbiennes formée par les racines et

le sol avoisinant. Elle a été décrite pour la première fois chez des Fabacées par Hiltner en 1904 (Curl et Truelove, 1986). Les plantes peuvent modifier les conditions du sol et créer des conditions optimales pour le développement des microorganismes. Ces modifications sont dues à :

- 1) la pénétration des racines dans le sol qui favorise la création de zones aérées stimulant la dégradation aérobie par les microorganismes.
- 2) la sécrétion de divers composés dans le sol qui permettent une croissance et un développement optimal des bactéries et champignons de la rhizosphère.

Les exsudats racinaires constituent une source importante de carbone et d'azote pour les microorganismes décomposeurs. Ainsi des substances phénoliques libérées par les racines de mûrier, comme la catéchine ou la coumarine, stimulent la croissance de bactéries dégradant des PCB (Fletcher et Hedge, 1995 ; Hedge et Fletcher, 1996). Ferro *et al.* (1994) ont également montré qu'une espèce de chiendent (*Agropyron desertorum*) libérait des phénols utilisés comme nutriments par des bactéries dégradant le pentachlorophénol, un polluant de la famille des PCB.

D'autres familles de composés organiques sont dégradées grâce à l'association entre espèces végétales et microorganismes de la rhizosphère. Une étude en laboratoire a montré par exemple que les microorganismes associés à des cultures de solidage (*Solidago sp.*) ou d'une Fabacée (*Lespedeza cuneata*) pouvaient dégrader en 6 jours plus de 80 % de trichloéthylène apporté à hauteur de 70 mg / kg de sol (Walton et Anderson 1990). Pai *et al.* (2001) ont présenté la possibilité d'éliminer le fongicide mefenoxam, un isomère de métalaxyl, grâce aux populations microbiennes associées à une Astéracée, la zinnia du Mexique (*Zinnia angustifolia*). Une concentration en fongicide de 20 mg / kg de sol a pu ainsi être traitée à presque 80 % en l'espace de 3 semaines.

La rhizodégradation est aussi étudiée pour le traitement de milieux pollués par des hydrocarbures polycycliques aromatiques (HAP). Des travaux ont montré par exemple que la présence de 10 mg de phénanthrène par kg de sol dans une culture de sorgho (*Sorghum bicolor*) stimule la libération d'exsudats par les plantes, notamment du fructose et du glucose donc la quantité libérée est presque doublée (Muratova *et al.*, 2009). Il en résulte une croissance plus importante des microorganismes de la rhizosphère dont la quantité est multipliée par 4. Les racines sécrètent également dans le milieu des enzymes de type oxydase

et peroxydase dont les activités sont stimulées par des facteurs compris entre 4 et 8, ce qui renforce l'activité de dégradation du polluant. En 4 semaines, la concentration de polluant dans le sol est ainsi passée de 10 à 0,04 mg / kg.

Le tableau 9 résume une partie des polluants traités par au moins un procédé de phytoremédiation. Les procédés de phyto- et rhizo- dégradation sont spécifiques des polluants organiques alors que l'accumulation, la volatilisation et la stabilisation sont des méthodes de traitement essentiellement utilisées pour des milieux (solides ou aqueux) riches en ETM.

Tableau 9. Principaux polluants traités par phytoremédiation d'après Susarla *et al.* (2002).

Procédé de Phytoremédiation	Polluants traités
Phytoaccumulation	ETM et quelques composés organiques : BTEX (benzène, éthylbenzène, toluène, xylène), pentachlorophénol.
Rhizofiltration	ETM et composés organiques.
Phytovolatilisation	Sélénium, mercure, quelques solvants chlorés (tri- et tétra-chloroéthane, tétrachlorométhane).
Phytostabilisation	ETM, potentialité pour des solvants chlorés (tri- et tétra-chlorométhane).
Phytodégradation	Organiques : explosifs (HMX, nitrobenzène, nitrométhane, nitrotoluène, acide picrique, RDX, TNT), pesticides (atrazine, DDT, pesticides chlorés et/ou phosphorés), PCB, solvants chlorés (chloroforme, tétrachlorure de carbone, di-, tri-, tétra- et hexa-chloroéthane, chlorure de vinyle, di- et tri-chloroéthanol, acide mono-, di- et tri-chloroacétique, tri- et tétra-chlorométhane), bromure de méthyle, tétrabromoéthane.
Rhizodégradation	Organiques : HAP, BTEX, pesticides (atrazine, alachlor), PCB, solvants chlorés (tri- et tétra-chloroéthane).

Troisième partie :

La phytoaccumulation des éléments traces métalliques (ETM)

Pour survivre et se développer dans un environnement contaminé en ETM, les plantes ont mis en place un certain nombre de mécanismes de défense tels que l'exclusion, l'excrétion active, la restriction de la distribution de métaux toxiques dans les tissus sensibles, la liaison de métaux à la paroi cellulaire, ou encore la chélation par des molécules organiques et leur compartimentation dans les vacuoles (Wang *et al.*, 2008). Les mécanismes de défense utilisés par la plante dépendent du type de polluant et de l'aspect sous lequel il se trouve dans le sol.

I. Comportement des ETM dans les sols

Le sol est défini comme la couche supérieure de la croûte terrestre composée de particules minérales, de matières organiques, d'eau, d'air et d'organismes (NF ISO 15799, 2004). Une fois introduits dans l'environnement, les éléments métalliques, contrairement aux polluants organiques, demeurent dans le sol et ne sont pas dégradés. Les seules exceptions sont le mercure et le sélénium qui peuvent être, au moins partiellement, volatilisés grâce à l'action de microorganismes ou de plantes.

1. Rétention des ETM

Le comportement des ETM dans les sols dépend notamment d'interactions physico-chimiques entre les ions métalliques et les particules organiques et minérales du sol. Le piégeage des ETM par les composés du sol peut se faire de plusieurs manières reportées par Deschamps *et al.* (2006) et présentées ci-dessous.

1) Adsorption : les ions métalliques se fixent sur la surface solide d'un substrat. L'adsorption peut être physique (physisorption) lorsqu'elle est due à une attraction électrostatique visant à maintenir l'électroneutralité. Dans ce cas, les énergies de liaisons sont faibles (force de Van der Waals) et les molécules adsorbées conservent les molécules d'eau qui leur sont associées. Plusieurs couches d'atomes ou de molécules peuvent se déposer de cette manière et cette adsorption est facilement réversible, ce qui implique une forte mobilité des ETM. Parmi les constituants du sol, les argiles sont considérées comme des adsorbants efficaces. Les argiles sont des silicates (généralement d'aluminium) possédant une structure en feuillets chargés

négativement entre lesquels de l'eau et des cations peuvent s'accumuler (Stengel et Gelin, 1998). L'adsorption peut également être chimique (chimisorption) lorsque les métaux adhèrent à la surface d'un substrat par des liaisons ioniques ou covalentes. Les liaisons sont spécifiques entre les ions métalliques et des groupes anioniques du sol dont des composés organiques possédant des fonctions carboxyliques, phénoliques ou carbonyles. Cette adsorption est moins réversible que la physisorption et engendre une couche monomoléculaire.

2) Précipitation : les ETM présents sous forme dissoute en solution peuvent passer à un état solide qui sera peu mobile dans le sol. Les précipités peuvent s'accumuler à la surface de particules ou dans des pores du sol occupés par de l'eau. Les ETM précipitent principalement sous forme d'hydroxyde, de carbonate, de phosphate ou de sulfure.

3) Substitution dans le réseau cristallin : un atome du réseau cristallin peut être remplacé par des atomes métalliques si ces derniers possèdent une charge et une taille similaires.

4) Inclusion : lors de la croissance des minéraux, des ETM peuvent être piégés mécaniquement dans des pores fermés n'ayant pas d'échanges avec les particules du sol situées autour.

Un ETM retenu à la surface d'un substrat sera donc plus rapidement mis en solution que s'il est inséré dans le réseau cristallin ou piégé mécaniquement dans le sol comme le résume la figure 7 (Manceau *et al.*, 2002).

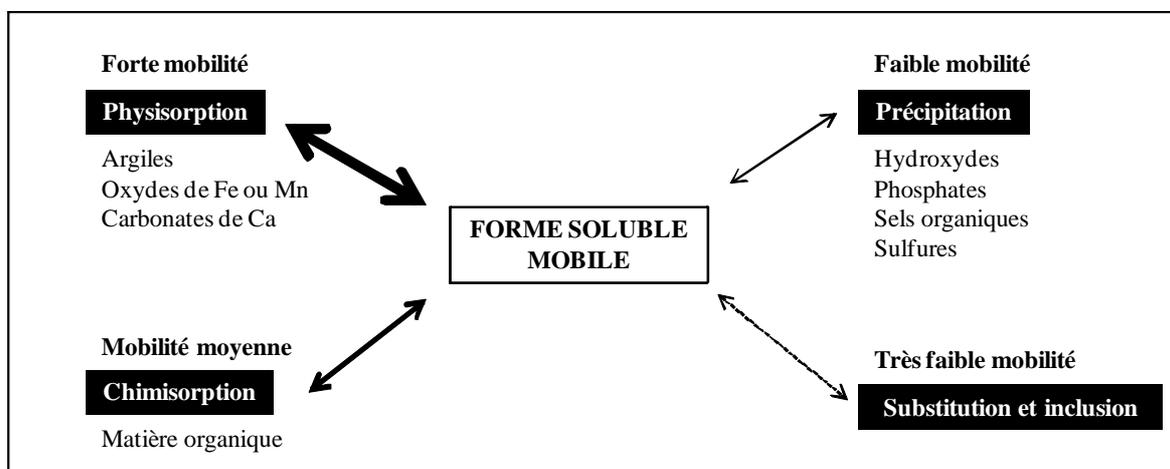


Figure 7. Localisation des ETM dans le sol d'après Juste *et al.*, (1995, modifié).

2. Biodisponibilité des ETM

Le pH et les conditions d'oxydoréduction dans le sol jouent un rôle important dans la mobilité des métaux : un sol à pH acide entraîne la désorption des cations métalliques et donc leur mise en solution sous forme de sels métalliques (Deschamps *et al.*, 2006). A l'opposé, un pH neutre à basique aura plutôt tendance à immobiliser les ETM et donc à réduire fortement leur absorption par voie racinaire. Cependant, tous les ETM ne sont pas solubilisés et donc mobiles aux mêmes valeurs de pH comme le montre le tableau 10.

Tableau 10. Mobilité des principaux ETM dans le sol en fonction du pH d'après Förstner (1985).

Mobilité	pH neutre-alkalin	pH acide
Très forte	Se	
Forte	As	Cd, Co, Hg, Ni, Zn, (Mn)
Moyenne	Mn	Al, Cr, Cu, Pb
Faible	Cd, Fe, Pb, Zn	Fe(III)
Très faible	Al, Co, Cr, Cu, Hg, Ni	Se, As

A l'inverse, la température n'est pas un facteur clé dans la régulation de la mobilité des polluants métalliques. En effet, une température située entre 10 et 30 °C a un effet direct négligeable sur la disponibilité des métaux (Serpaud *et al.*, 1994). Elle peut par contre avoir un effet indirect en contrôlant le développement des microorganismes, ce qui modifie les activités de décomposition de la matière organique et donc les capacités de piégeage des ETM.

2.1. Modification de la biodisponibilité par les plantes

Les végétaux sont capables de modifier localement le pH du sol (c'est-à-dire au niveau de la rhizosphère) par sécrétion, via le système racinaire, d'acides organiques. Les acides les plus couramment détectés sont le malate, l'oxalate et le citrate (Dakora et Phillips, 2002). Ces composés anioniques forment des complexes avec les cations métalliques et augmentent ainsi leur désorption et leur solubilisation dans le sol à quelques exceptions près comme pour l'aluminium (voir partie consacrée à la phytostabilisation : deuxième partie, paragraphe III.2.). Les éléments métalliques sont alors plus facilement absorbables par les racines (Moreno Pires *et al.*, 2007). Zeng *et al.* (2008) ont ainsi démontré une corrélation entre la sécrétion d'acides organiques (essentiellement de l'oxalate et du malate) par les racines de deux variétés de riz et l'accumulation de chrome dans les plantes. Duarte *et al.* (2007) ont

également mis en évidence ce type de corrélation entre une libération de citrate et une augmentation de l'absorption de cadmium chez l'halimione faux-pourpier (*Halimione portulacoides*).

2.2. Modification de la biodisponibilité par des agents chimiques

Plusieurs travaux ont mis en évidence la possibilité d'appliquer des agents chélatants sur les sols contaminés par des ETM afin de solubiliser ces derniers et d'améliorer leur extraction du sol par les plantes. Parmi ces composés, l'EDTA (acide éthylène diamine tétra acétique) est celui qui semble pour l'instant présenter la meilleure efficacité pour bon nombre d'éléments métalliques à quelques exceptions près (Barona *et al.*, 2001 ; Madrid *et al.*, 2003 ; Liphadzi et Kirkham, 2006 ; Pastor *et al.* 2007). En effet, les quelques travaux réalisés sur des sols contaminés en uranium, montrent que l'acide citrique est un des meilleurs agents chélatants pour cet élément (Huang *et al.*, 1998 ; Duquene *et al.*, 2009). Ebbs *et al.* (1998) précisent qu'un pH du sol inférieur à 5,5 est nécessaire pour une absorption optimale de l'uranium par les plantes et préconisent aussi l'utilisation d'acide citrique.

L'amendement en EDTA reste toutefois pour les autres éléments métalliques, le composé le plus utilisé. Il est particulièrement étudié pour les pollutions au plomb car ce métal est faiblement mobile dans les sols et sa chélation par l'EDTA pourrait être un moyen d'y pallier (Saifullah *et al.*, 2009). Les travaux de Wu *et al.* (2004) réalisés en serre à partir de prélèvements de sols contaminés en cuivre, plomb, zinc et cadmium ont montré que l'ajout de 3 mmol d'EDTA par kg de sol permettait de tripler l'absorption de cuivre et de plomb par des plantes (*Brassica juncea*) ; les effets sur l'absorption du zinc et du cadmium étant plus limités.

Cependant l'utilisation d'EDTA peut poser des problèmes environnementaux comme par exemple une hausse de mortalité des nématodes du sol (Jones *et al.*, 2007). D'autre part, l'EDTA peut entraîner des problèmes de lessivage d'éléments métalliques lorsque la solubilisation de ces derniers dépasse fortement les capacités d'absorption par les racines. Ainsi les travaux de Wu *et al.* (2004) précédemment mentionnés font état de 10 à 30 % de lessivage des ETM considérés lorsque la concentration de 3 mmol d'EDTA, permettant une absorption suffisante ces ETM par *Brassica juncea*, est appliquée. Une concentration de 12 mmol par kg de sol quant à elle provoque un lessivage de 40 à plus de 80 % des ETM.

II. Fixation des ETM par les parois des cellules végétales

Au niveau cellulaire, la première barrière contre les agressions extérieures est constituée par la paroi (Wang *et al.*, 2008). La composition de cette dernière varie au cours de la croissance cellulaire et aussi en fonction des espèces. La paroi, schématisée sur la figure 8, est constituée d'une lamelle moyenne formée peu de temps après la mitose et d'une paroi primaire déposée au cours de l'élongation cellulaire. Lors de la différenciation cellulaire, une paroi secondaire est mise en place mais n'est cependant pas présente dans toutes les cellules (Popper, 2008). C'est notamment le cas pour les cellules de parenchyme et de collenchyme.

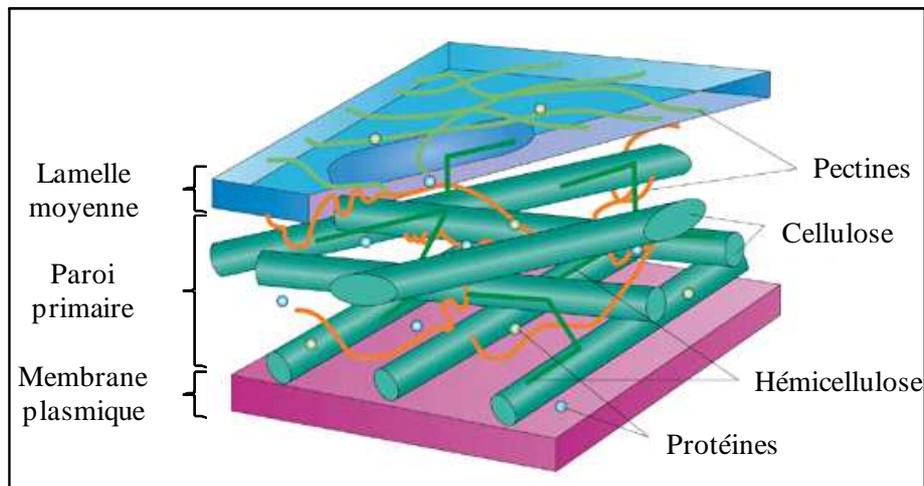


Figure 8. Organisation de la paroi des cellules végétales en phase d'élongation (Sticklen, 2008).

La paroi primaire est approximativement composée de 30 % de cellulose, 30 % d'hémicelluloses comme des xylogucanes, 35 % de composés pectiques et 5 % de glycoprotéines (Cosgrove, 1997). Les pectines constituent un groupe de polysaccharides très varié. On trouve cependant des structures majoritaires qui sont des homogalacturonanes ou acides polygalacturoniques et des rhamnoglacturonanes (Albersheim *et al.*, 1996). Les homogalacturonanes sont des polymères d'acides galacturoniques liés en α -1,4 qui peuvent être méthylestérifiés sur la fonction carboxylique en C6 ou acétylestérifiés en C2 et/ou C3 (Mc Cann et Roberts, 1996). Les homogalacturonanes peuvent s'associer via des ponts calciques entre les fonctions carboxyliques non méthylestérifiées créant ainsi une structure rigide dite « boîte à œufs », laquelle est représentée sur la figure 9 (Caffal et Mohnen, 2009).

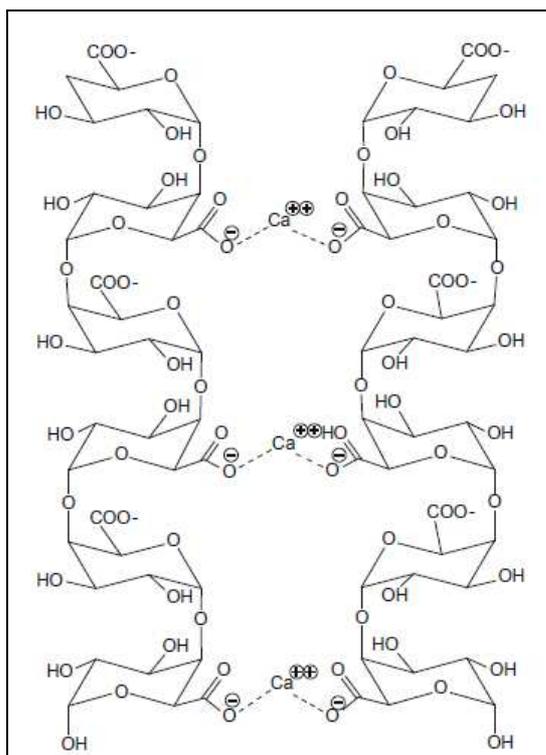


Figure 9. Modèle de la « boîte à œuf » montrant des homogalacturonanes liés entre eux par des ponts calciques (Caffal et Mohnen, 2009). La liaison avec les ions calcium se fait au niveau des fonctions carboxyliques des acides galacturoniques.

Les pectines jouent un rôle privilégié dans le piégeage des métaux par la paroi. Il est en effet estimé que 70 à 90 % des métaux piégés par la paroi le sont par des composés pectiques, le reste étant réalisé par des glycoprotéines pariétales (Haynes, 1980 reporté par Macfie et Welbourn, 2009). Cette efficacité de fixation est due à la capacité d'échange de cations : des cations métalliques peuvent se substituer aux ions calcium au sein des réseaux en « boîte à œufs » des homogalacturonanes mais aussi au niveau des rhamnogalacturonanes. Matsunaga et Ishii (2004) ont par exemple montré chez la betterave et la vigne que des dimères de rhamnogalacturonanes de type 2 (complexés par une liaison borate-diol ester) avaient la capacité de se lier au plomb. Le site de liaison du plomb à ce type de dimère n'a cependant pas été mis en évidence par les auteurs. Des études menées sur deux lignées de riz exposées à un milieu enrichi en aluminium confirment que les composés pectiques peuvent fixer des cations métalliques (Yang *et al.*, 2008). D'autres travaux montrent également une réelle capacité des parois à fixer des ETM. Par exemple, des plants de ramie (*Boehmeria nivea*), exposés pendant 20 jours à des concentrations de cadmium comprises entre 1 et 7 mg /L fixent environ 50 % du cadmium au niveau de la paroi des cellules de racines, de

tiges et de feuilles (Wang *et al.*, 2008). De la même manière, *Halimione portulacoides*, une plante de milieux salins littoraux, peut stocker plus de 55 % du zinc dans les parois de ses différents organes (Sousa *et al.*, 2008). Une Lamiacée asiatique (*Elsholtzia splendens*), exposée pendant 16 jours à une concentration de 500 μM de cuivre, peut stocker dans les parois des cellules racinaires environ 60 % du cuivre accumulé par la plante (Peng *et al.*, 2005).

III. Absorption, transport et compartimentation des ETM dans les cellules

1. Absorption au niveau de la membrane plasmique

La plupart des ETM pénètre dans les cellules grâce à des transporteurs situés au niveau de la membrane plasmique. Certains cations métalliques n'étant pas indispensables pour les végétaux, ils entrent en compétition avec des éléments essentiels (métalliques ou non) de structure et / ou de charge proche(s) afin d'être pris en charge par des transporteurs qui ne leur sont pas spécifiques. La figure 10 résume les grandes familles de transporteurs impliqués dans l'absorption des principaux métaux essentiels au développement des végétaux. Le cuivre peut entrer par les transporteurs YSL et COPT sous forme mono ou divalente.

Les protéines CNGC (Cyclic Nucleotide-Gated Channel) sont des transporteurs non sélectifs de cations qui peuvent être monovalents (Na^+ , K^+ ...) ou divalents comme le calcium (Ca^{2+}) et la majorité des ions métalliques. Les transporteurs de cette famille qui sont localisés au niveau de la membrane plasmique (d'autres CNGC sont situés au niveau du tonoplaste) possèdent un domaine de liaison à la calmoduline et sont régulés par la présence de calcium (Kaplan *et al.*, 2007).

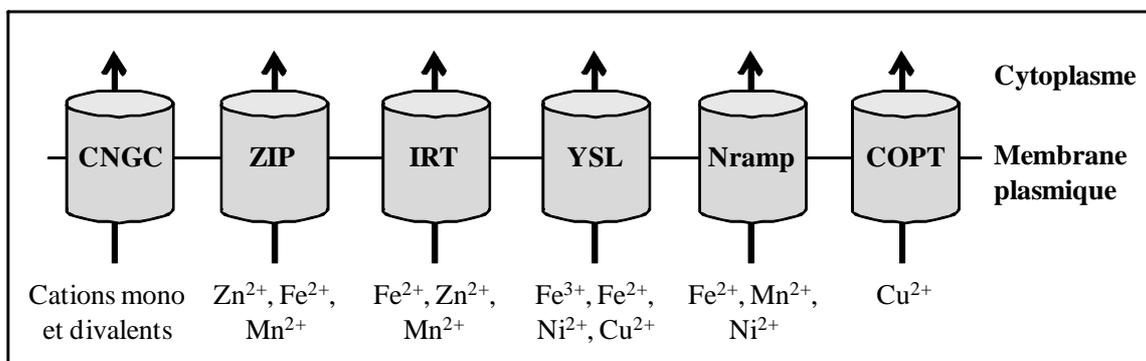


Figure 10. Familles de transporteurs impliqués dans l'absorption des principaux métaux essentiels au développement des plantes. Cyclic Nucleotide-Gated Channel (CNGC), Zinc regulated transporter - Iron

regulated transporter-like Protein (ZIP), Iron Regulated Transporter (IRT), Yellow Stripe Like (YSL), Natural resistance associated-macrophage protein (NRAMP), COPper Transporter (COPT).

Les protéines ZIP (Zinc regulated transporter - Iron regulated transporter-like Protein) possèdent un domaine riche en histidine dont l'azote du cycle imidazole peut se lier au zinc mais aussi à d'autres cations métalliques (Hall and Williams, 2003). Ces protéines sont essentiellement situées au niveau de la membrane plasmique mais quelques unes ont été localisées au niveau du tonoplaste (Guérinot, 2000).

Les protéines IRT (Iron Regulated Transporter) sont souvent regroupées dans la famille des protéines ZIP car les ions transportés sont les mêmes avec cependant des affinités différentes. En effet, les protéines ZIP ont davantage d'affinité pour le zinc alors que les IRT transportent préférentiellement le fer (Fe^{2+}) réduit préalablement par une chélate réductase membranaire (Grotz et Guérinot, 2006).

Les protéines YSL (Yellow Stripe Like) ont tout d'abord été identifiées chez le maïs (Curie *et al.*, 2001). Elles permettent l'entrée de fer trivalent (Fe^{3+}) couplé à des phytosidérophores. Les phytosidérophores sont des molécules sécrétées par les racines pour mobiliser le fer trivalent situé au niveau de la rhizosphère. Les composés les plus souvent rencontrés sont la nicotianamine (qui peut aussi fixer du fer divalent mais en proportion moindre) et l'acide muginéique, ce dernier n'étant produit que chez des plantes monocotylédones (Von Wiren *et al.*, 1999). Les transporteurs YSL peuvent aussi transporter d'autres métaux que le fer comme le nickel ou le cuivre (Colangelo et Guérinot, 2006).

Les protéines NRAMP (Natural Resistance Associated Macrophage Protein) ne sont pas toutes localisées au niveau de la membrane plasmique car certaines ont été identifiées comme des transporteurs du tonoplaste (Hall et Williams, 2003). Plusieurs protéines NRAMP sont considérées comme des transporteurs privilégiant le fer mais d'autres métaux peuvent entrer dans les cellules par cette voie comme le manganèse ou le nickel (Mizuno *et al.*, 2005).

Les protéines COPT (COPper Transporter) sont des transporteurs spécifiques du cuivre. Jusqu'à présent, la littérature ne fait pas mention d'autres ions métalliques empruntant cette voie d'absorption. Les protéines COPT ont été mises en évidence non seulement au niveau de la membrane plasmique mais aussi au niveau du tonoplaste (Yruela, 2005).

Le tableau 11 rassemble le nombre de gènes identifiés pour chacune de ces familles de transporteurs chez *Arabidopsis thaliana*. Ces informations, disponibles sur la base de données TAIR (The Arabidopsis Information Resource), montrent qu'à travers l'exemple de cette espèce, les végétaux semblent posséder de nombreux transporteurs de métaux qui se révèlent être aussi des voies d'entrée pour les éléments métalliques non indispensables au développement des végétaux.

Tableau 11. Nombre de gènes chez *Arabidopsis thaliana* correspondant aux grandes familles de transporteurs pour l'absorption des ions métalliques (TAIR, <http://www.arabidopsis.org/browse/genefamily/index.jsp>, dernière mise à jour le 20 Juin 2008). Pour la famille ZIP, deux gènes sont actuellement annotés comme putatifs.

Famille	CNGC	ZIP	IRT	YSL	NRAMP	COPT
Gènes identifiés	20	11 (+ 2)	3	6	6	5

Les ETM non essentiels pour les plantes ne pénètrent pas tous dans les cellules par l'un des transporteurs précédemment décrits. En effet, quelques éléments métalliques empruntent d'autres voies pour être absorbés.

Le plomb n'étant pas un élément essentiel pour les plantes, il n'existe pas de transporteur spécifique pour son absorption. Il a été montré que le plomb se lie aux groupes carboxyliques d'acides uroniques présents dans le mucilage de la surface racinaire (Morel *et al.*, 1986; Sharma et Dubey, 2005) ou au niveau des parois (Blaylock et Huang, 2000; Sahi *et al.*, 2002; Sharma et Dubey, 2005). Le plomb peut pénétrer à l'intérieur des cellules mais à ce jour, le processus d'absorption de ce métal n'est pas totalement établi (Peralta-Videa *et al.*, 2009). Quelques études suggèrent que le plomb pourrait pénétrer grâce à un transporteur de type CNGC (Arazi *et al.*, 1999 ; Sunkar *et al.*, 2000). Des travaux réalisés sur le tabac (*Nicotiana tabacum*) et sur une gesse (*Lathyrus sativus*) suggèrent une absorption du plomb par des transporteurs de calcium de faible affinité de type LCT pour Low affinity Cation Transporter (Wojas *et al.*, 2007 ; Brunet *et al.*, 2008).

L'arsenic est présent sous forme d'arsenite (As(III)) ou sous forme plus mobile et plus stable d'arsenate (As(IV)). L'arsenate est donc la forme d'arsenic la plus souvent absorbée par les plantes. Il a été montré que l'arsenate entre en compétition avec le phosphate pour l'absorption via des canaux à phosphate (Tripathi *et al.*, 2007).

Le chrome, présent sous forme Cr(III) ou Cr(VI), entrerait dans les cellules par complexation avec des acides organiques provenant d'exsudats racinaires (Bluskov *et al.*, 2005). Des travaux réalisés sur le tabac (*Nicotiana tabacum*) suggèrent une absorption de ce métal par des transporteurs de sulfate ou de phosphate (Kim *et al.*, 2006a). Au moins deux publications indiquent que c'est la forme Cr(VI) qui emprunte ces canaux membranaires alors que la forme Cr(III) diffuserait de manière passive à travers la membrane (Zayed et Terry, 2003 ; Cohen *et al.*, 2006).

2. Association aux ligands et transport

Une fois absorbés, les ETM ne sont pas toujours transportés sous forme libre. Ils peuvent être rapidement complexés dans le cytoplasme à différentes molécules en fonction du composé métallique. Le transport peut se faire sur une courte distance à l'intérieur de la cellule et sur une distance plus longue vers d'autres cellules et tissus de l'organe d'absorption ou vers d'autres organes de la plante.

2.1. Acides organiques

Ces molécules ont été présentées précédemment comme des composés sécrétés par voie racinaire dans le milieu afin de solubiliser les ETM. Ces mêmes acides, majoritairement du citrate, du malate et de l'oxalate, peuvent également s'accumuler dans les cellules et former des complexes avec certains métaux absorbés pour faciliter leur transport dans la plante.

Le nickel peut aussi se lier à des acides organiques. Il a été montré que chez trois espèces phytoaccumulatrices de nickel, ce métal est complexé au malate ou au citrate (Montargès-Pelletier, 2008). De même, une étude réalisée sur le chêne vert (*Quercus ilex*) confirme la forte affinité du nickel avec des acides organiques identifiés ici comme de l'oxalate et du citrate (Araujo *et al.*, 2009).

Le plomb ayant pénétré dans les cellules épidermiques des racines peut être transporté jusqu'à l'endoderme par des canaux calciques (Huang et Cunningham, 1996; Antosiewicz, 2005). D'autres travaux indiquent que les cadres de Caspary pourraient jouer un rôle de barrière partielle au plomb lorsque ce métal est en faible concentration (Seregin *et al.*, 2004). Cependant, le plomb parvient à atteindre le xylème pour être transporté plus rapidement.

Plusieurs études ont montré que le plomb est transporté sous forme de complexe avec des acides organiques comme le citrate (Varga *et al.*, 1997). *Sesbania drummondii*, une Fabacée hyperaccumulatrice de plomb, transporte ce dernier depuis les racines vers les parties aériennes sous forme de complexe plomb-acétate mais aussi plomb-nitrate et plomb-sulfide (Sharma *et al.*, 2004a et b).

2.2. Acides aminés libres et oligopeptides

2.2.1. Histidine

Plusieurs études ont montré que des espèces hyperaccumulatrices de nickel transportaient ce métal sous forme complexée à de l'histidine (figure 11). Il est cependant précisé que l'histidine n'est pas un ligand efficace du nickel contrairement à ce qui est admis sur des espèces hyperaccumulatrices et des espèces sensibles supplémentées en histidine (Krämer *et al.*, 1996).



Figure 11. Structure cristalline du complexe formé entre le nickel (en rose) et deux molécules d'histidine (Callahan *et al.*, 2006).

Chez *Alyssum lesbiacum* et *Thlaspi caerulescens* (Brassicacées), la forte production d'histidine au niveau racinaire permet de former rapidement des complexes avec le nickel absorbé et ainsi d'acheminer le métal vers les parties aériennes (Singer *et al.*, 2007 ; Richau *et al.*, 2009). Cependant, il est difficile de généraliser la corrélation entre synthèse d'histidine et transport ou accumulation du nickel. Par exemple, chez *Matricaria chamomilla* (Astéracée), qui produit également de grandes quantités d'histidine au niveau du système racinaire, le nickel reste accumulé préférentiellement dans les racines (Kovacik *et al.*, 2007). Chez d'autres espèces hyperaccumulatrices de nickel comme *Leptoplax emarginata*, *Alyssum murale* ou encore *Thlaspi caerulescens*, l'histidine n'est pas impliquée dans l'accumulation et

/ ou le transport du nickel (Montargès-Pelletier *et al.*, 2008). Cette observation chez *Thlaspi caerulescens* est cependant contradictoire avec les travaux de Richau *et al.* (2009).

2.2.2. Nicotianamine

La nicotianamine est composée de trois molécules de S-adiénosylméthionine dont l'assemblage est catalysé par la nicotianamine synthase (figure 12). Plusieurs travaux reportés dans la revue de Verbruggen *et al.* (2009) ont montré la formation de complexes entre la nicotianamine et plusieurs ETM comme le nickel, le zinc et le fer avec toutefois une affinité plus forte pour le nickel. Ces travaux suggèrent que la nicotianamine joue un rôle dans le transport des métaux vers les parties aériennes. Une étude réalisée sur l'espèce hyperaccumulatrice *Thlaspi caerulescens* a mis en évidence que la nicotianamine est impliquée dans l'hyperaccumulation du nickel mais pas du zinc (Callahan *et al.*, 2007). D'autres travaux réalisés avec la même espèce végétale suggèrent que la nicotianamine serait impliquée dans le chargement et le déchargement du nickel au niveau du xylème et que le nickel serait transporté en grande partie sous forme non complexée dans la sève brute (Mari *et al.*, 2006).

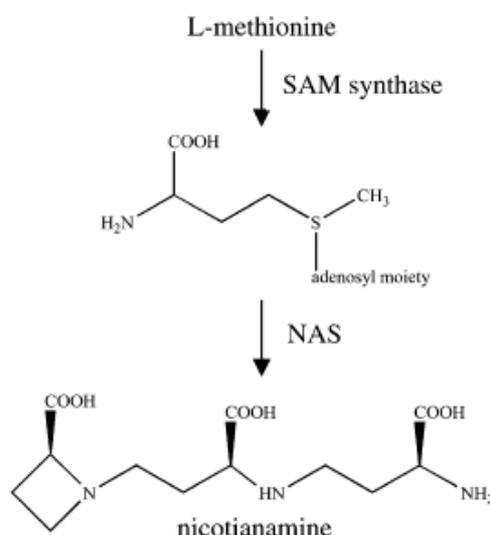


Figure 12. Voie de synthèse de la nicotianamine (Callahan *et al.*, 2006). NAS : nicotianamine synthase ; SAM : S-adiénosylméthionine.

2.2.3. Oligopeptides riches en cystéine

La cystéine est un acide aminé clé dans la fixation d'ETM. Sa voie de synthèse à partir de l'assimilation de sulfate est résumée sur la figure 13. Cet acide aminé sert de précurseur pour la synthèse de glutathion (GSH), de cofacteurs, de vitamines (biotine, thiamine), d'esters

de soufre (coenzyme A) et de dérivés soufrés (Droux, 2004). La cystéine possède un groupement sulfhydryle (ou thiol) permettant non seulement de former des ponts disulfures avec d'autres molécules mais aussi de lier des ETM. Ceci a été montré notamment chez *Crotalaria crobalticola*, une Fabacée hyperaccumulatrice de cobalt (Oven *et al.*, 2002).

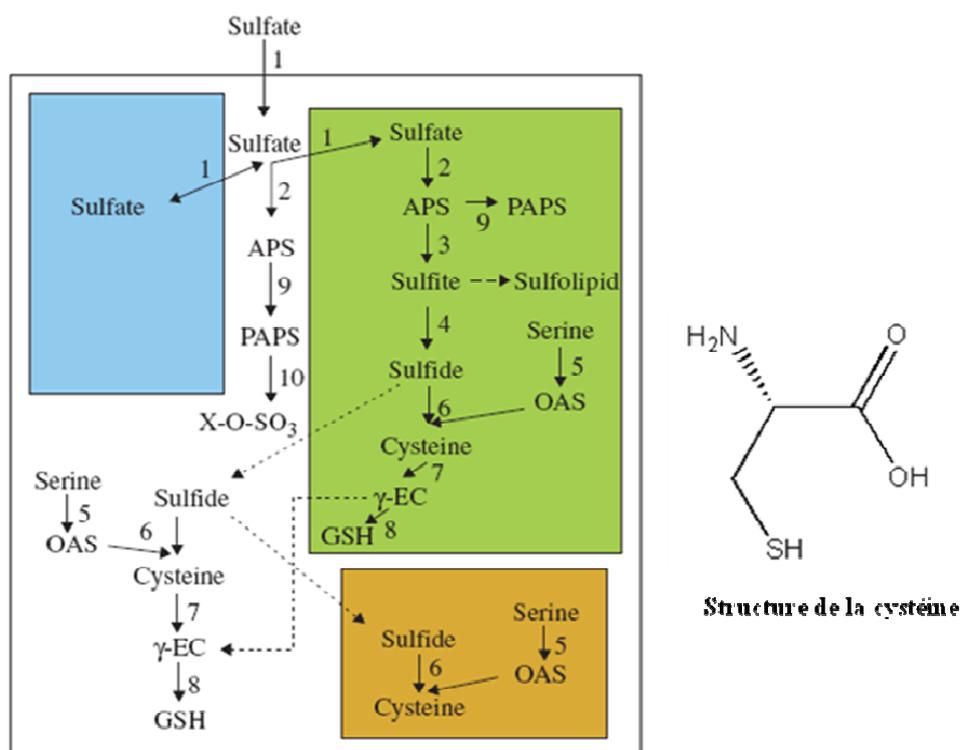


Figure 13. Schéma de l'assimilation du sulfate et de la compartimentation de ses principales étapes (Kopriva et Koprivova, 2005). La couleur verte représente les chloroplastes, la brune les mitochondries, la bleue les vacuoles et la partie blanche correspond au cytoplasme. Les chiffres représentent les enzymes : transporteurs de sulfate (1), ATP sulfurylase (2), APS réductase (3), sulfite réductase (4), sérine acétyltransférase (5), O-acétylsérine thiolase (6), γ -glutamylcystéine (EC) synthétase (7), glutathion (GSH) synthétase (8), APS kinase (9) et sulfotransférase (10). Les traits discontinus représentent des réactions en plusieurs étapes et ceux en pointillés des étapes du transport non confirmées.

2.2.3.1. Glutathion

Ce tripeptide est composé de glutamate, cystéine et glycine (figures 14 et 15). Il se présente sous trois formes dans les cellules (figure 14) : une forme réduite abrégée sous le terme de GSH, une forme oxydée appelée glutathion disulfide (GSSG) et une forme conjuguée à des xénobiotiques via la glutathion-S-transférase (GST) (Mendoza-Cózatl et Moreno-Sanchez, 2006). Le glutathion est synthétisé en deux étapes successives : la γ -glutamylcystéine synthétase (γ -ECS) catalyse tout d'abord la liaison du glutamate à la cystéine puis la glutathion synthétase (GS) catalyse l'addition de glycine à la molécule précédemment formée.

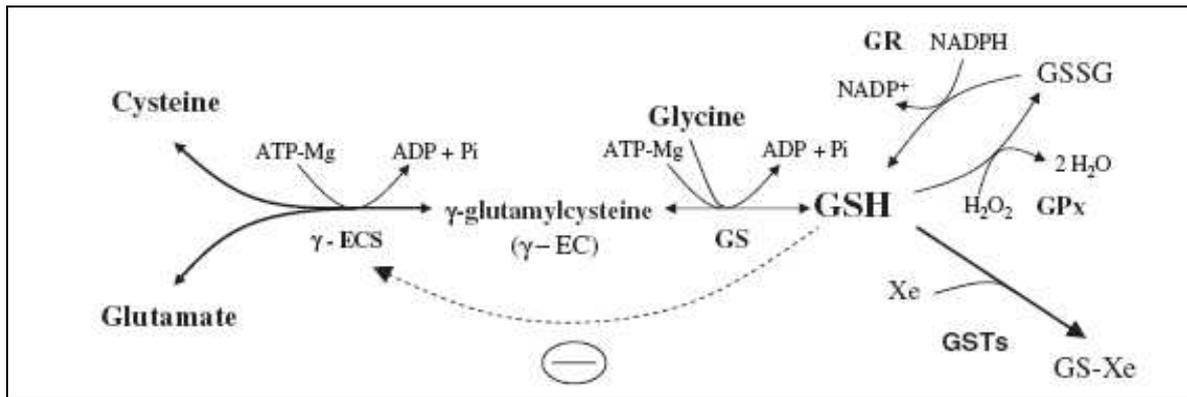


Figure 14. Biosynthèse du glutathion (Mendoza-Cózatl et Moreno-Sanchez, 2006).

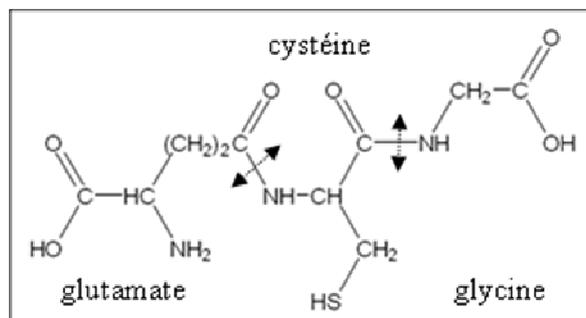


Figure 15. Formule semi développée du glutathion.

Le glutathion est une molécule ubiquitaire synthétisée dans le cytoplasme et les chloroplastes. Sa forte concentration (jusqu'à 1 mM dans le cytoplasme et 5 mM dans les chloroplastes) fait du glutathion une source importante de soufre pour les cellules (Noctor *et al.*, 1998). Le rôle principal du glutathion est un rôle anti-oxydant contre les agressions biotiques et abiotiques subies par les plantes. Le glutathion permet de réguler l'état d'oxydoréduction des cellules notamment en luttant 1) directement contre les espèces réactives de l'oxygène comme le peroxyde d'hydrogène grâce au cycle ascorbate / glutathion (Noctor et Foyer, 1998), et 2) indirectement par des voies de signalisation induisant l'expression de gènes codant des enzymes anti-oxydantes comme des superoxyde dismutases (Noctor *et al.*, 2002). Outre le rôle d'anti-oxydant, le glutathion intervient dans les mécanismes de détoxification de xénobiotiques où il sert de substrat aux glutathion-S-transférases, dans le transport et le stockage d'acides aminés, dans la régulation de la prolifération cellulaire ou encore dans la synthèse de désoxyribonucléotides (Mendoza-Cózatl *et al.*, 2005).

Le glutathion est aussi capable de piéger des ETM. Par exemple le chrome hexavalent (Cr (VI)) peut se lier à des groupes thiols présents sur la cystéine, la N-acétylcystéine, la glutamylcystéine (précurseur du glutathion) ou sur le glutathion (Brauer *et al.*, 1996). De même, l'arsenic peut être piégé par le glutathion (Spuches *et al.*, 2005). Une étude récente sur une fougère aquatique (*Salvinia minima*) a montré que le plomb pouvait être fixé par une phytochélatine de type 1 (les PC sont présentées dans la partie suivante), ce qui correspond en fait au glutathion (Estrella-Gomez *et al.*, 2009). Des travaux réalisés sur *Sedum alfredii* avaient déjà montré que le plomb et le zinc, pouvaient se fixer sur des groupes thiols de glutathion (Sun *et al.*, 2005). Cependant, le glutathion n'est pas le seul ligand riche en cystéine pouvant fixer des ions métalliques. En effet, les phytochélatines sont aussi capables de piéger les ETM et de manière plus efficace que le glutathion pour certains d'entre eux.

2.2.3.2. Phytochélatines

Ces oligopeptides riches en cystéine sont représentés par la formule générale $(\gamma\text{Glu-Cys})_n\text{-Gly}$, n allant de 2 à 11 mais étant généralement compris entre 2 et 5 (Zenk, 1996). Dans quelques familles de végétaux, les PC sont synthétisées sous une forme un peu différente mais avec un rôle similaire ; la différence provenant du remplacement de la glycine par un autre acide aminé (Inhoue, 2005). Cet autre acide aminé peut être du glutamate chez le maïs (on parle alors d'iso-PC), de la sérine chez d'autres Poacées comme le riz (les PC sont alors appelées hydroxyméthyl-PC) ou encore de la β -alanine chez des Fabacées comme le pois (les PC sont qualifiées d'homo-PC). Cependant, dans la majorité des cas, les PC sont synthétisées par voie enzymatique à partir du glutathion. La synthèse de PC est catalysée par la phytochélatine synthase (PCS) qui permet le transfert d'un motif $\gamma\text{Glu-Cys}$ d'une molécule de glutathion sur une autre molécule de glutathion pour former au départ une phytochélatine à n = 2 comme indiqué sur la figure 16 (Grill *et al.*, 1989 ; Ha *et al.*, 1999).

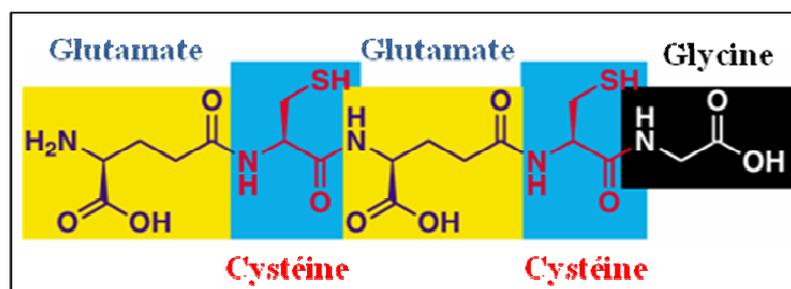


Figure 16. Structure d'une phytochélatine avec n = 2 (Donald Danforth Plant Science Center, <http://www.danforthcenter.org/jez/research.asp>).

La PCS catalyse ensuite l'ajout de nouveaux motifs γ Glu-Cys. La synthèse des PC est activée par la présence d'ETM dans la cellule et par leur liaison à la PCS (Zenk, 1996). La phytochélatine synthase est active lorsque deux molécules de glutathion et une molécule de métal forment un thiolate (GS-métal-GS) (Mendoza-Cózatl *et al.*, 2005). Les PC possèdent également un site de liaison aux ETM. Elles vont se lier, par l'intermédiaire des groupes sulfhydryles des cystéines, aux ions métalliques libres et former des complexes PC-métal au sein desquels la toxicité du métal est réduite (Satofuka *et al.*, 2001). Les PC sont connues pour piéger plusieurs ETM dont l'arsenic, le plomb, le mercure, l'argent mais aussi des métaux essentiels lorsqu'ils sont en forte concentration comme le zinc et le cuivre (Grill *et al.*, 1989). Les phytochélatines ne sont pas exclusivement présentes au sein de la lignée verte ou Archéplastidés comme le montre la figure 17. En effet, une synthèse récente indique que des gènes codant des PCS sont également présents chez des champignons, chromalvéolés, euglénozoaires, métazoaires (Clemens et Persoh, 2009). Concernant les champignons, des travaux antérieurs ont montré la présence de phytochélatines chez le champignon *Boletus edulis* (Basidiomycètes) (Collin-Hansen *et al.*, 2007). L'absence de séquençage d'une PCS chez ce champignon explique peut-être pourquoi ce dernier n'est pas indiqué dans les résultats de Clemens et Persoh qui considèrent les Basidiomycètes comme ayant perdu le gène PCS au cours de l'évolution. La présence de gènes proches de PCS a été mise en évidence chez quelques procaryotes mais les enzymes produites sont deux fois plus petites et leur capacité à synthétiser des phytochélatines n'a pas été prouvée (Clemens et Persoh, 2009).

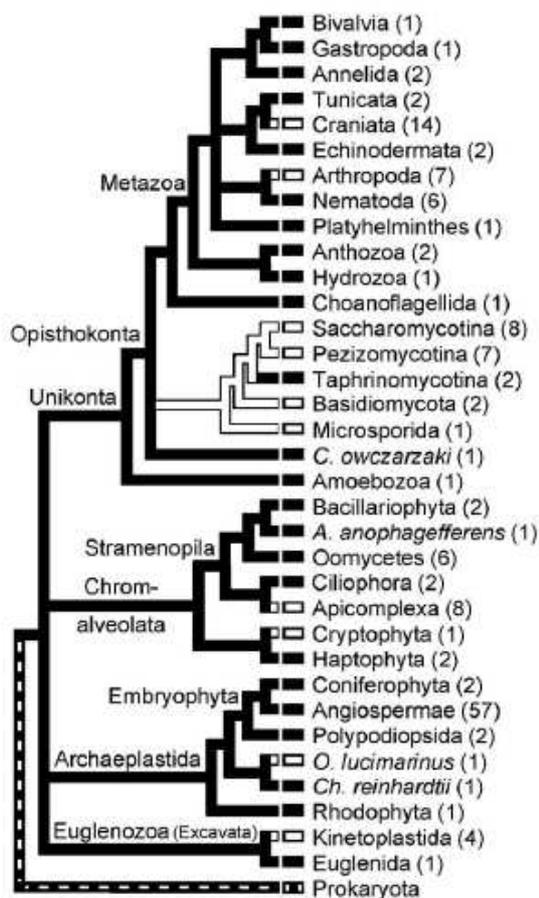


Figure 17. Présence de gènes codant des phytochélatine synthases d'après Clemens et Persoh (2009). Les chiffres entre parenthèses correspondent au nombre d'espèces pour lesquelles la présence de gènes codant la PCS a été recherchée. Les traits plein (noirs) indiquent la présence d'au moins un gène de PCS alors que les traits blancs sont signe d'absence de gène codant cette enzyme.

L'arsenic présent dans les sols est souvent absorbé sous forme d'arsenate. Une fois dans les cellules, l'arsenate est réduit en arsenite par une arsenate réductase ou en composés mono ou diméthylés moins toxiques (Dhankher *et al.*, 2006). L'arsenite se lie avec des groupes sulfures d'enzymes (pour les plantes sensibles) mais peut être piégé par les groupes thiols de molécules de glutathion et surtout de phytochélatines chez les plantes tolérantes (Pickering *et al.*, 2000). Un autre exemple est fourni par les travaux de Gupta *et al.* (2004) qui ont montré que le pois (*Pisum sativum*) pouvait piéger de l'arsenic grâce à une production accrue de phytochélatines en présence du métal.

Le plomb peut également se lier aux groupements thiols des phytochélatines. Une étude sur plusieurs Fabacées comme le pois (*Pisum sativum*), le haricot (*Phaseolus vulgaris*) et la fève (*Vicia faba*) ont mis en évidence une fixation du plomb sur des phytochélatines et /

ou des homophytochélatines possédant 2 et 3 motifs « Glu-Cys » (Piechalak *et al.*, 2002). Une autre étude réalisée chez une fougère aquatique, *Salvinia minima*, indique que ce sont plutôt des phytochélatines à $n = 4$ qui sont produites en réponse à une exposition au plomb (Estrella-Gomez *et al.*, 2009). Le vétiver (*Vetiveria zizanoides*), une espèce de la famille des Poacées, produit également des phytochélatines ainsi que des iso-phytochélatines se fixant au plomb et avec un nombre de motifs « Glu-Cys » allant de 2 à 6 (Andra *et al.*, 2009). Dans cette publication, les auteurs précisent que les racines, qui sont en contact direct avec le polluant et donc davantage exposées à une toxicité potentielle, produisent toutes ces phytochélatines alors que les feuilles synthétisent des phytochélatines plus « courtes » avec 2 à 4 répétitions « Glu-Cys ». Il est suggéré ici qu'en présence d'une forte concentration en plomb (et peut-être en d'autres ETM), la plante privilégie la synthèse de phytochélatines à nombreux motifs Glu-Cys plutôt que la synthèse de phytochélatines possédant peu de répétitions Glu-Cys. Cette stratégie peut être interprétée comme une économie en glycine qui peut être recyclée et utilisée pour la synthèse de glutathion ou de protéines. Par exemple, une phytochélatine à $n = 6$ peut chélater 6 ETM et n'utilise au final qu'une seule molécule de glycine alors que trois phytochélatines à $n = 2$ (qui fixent donc aussi 6 ETM au total) vont nécessiter trois molécules de glycine.

2.3. Métallothionéines et autres protéines chaperonnes

Les métallothionéines sont de petites protéines riches en cystéine et présentes chez la majorité des eucaryotes et chez plusieurs prokaryotes (Palmiter, 1998). Elles sont constituées de 45 à 80 acides aminés et sont divisées en 4 classes en fonction de la distribution des cystéines. Les métallothionéines sont composées de deux domaines contenant 4 à 8 cystéines séparés par une région de 30 à 50 acides aminés dépourvue de cystéine (Domènech *et al.*, 2006 ; Freisinger, 2008). Il existe de rares exceptions : les protéines de classe 4 possèdent un troisième domaine riche en cystéine et quelques protéines de classe 1 possèdent une région centrale courte d'environ 10 acides aminés. La figure 18 présente quelques exemples d'alignements de séquences en acides aminés de métallothionéines montrant la localisation des résidus cystéine et des domaines de liaison aux ETM.

Globalement, les classes de métallothionéines s'expriment dans des organes différents : la classe 1 plutôt dans les racines et les organes reproducteurs et moins dans les feuilles contrairement à la classe 2, la classe 3 essentiellement dans les fruits mais aussi au niveau foliaire et la dernière classe est spécifique des graines. Chez *Arabidopsis thaliana*,

certaines métallothionéines sont détectées dans le phloème (ce qui permet un transport sur des distances plus ou moins longues) alors que d'autres ont une localisation plus restreinte à certains tissus (Guo *et al.*, 2003).

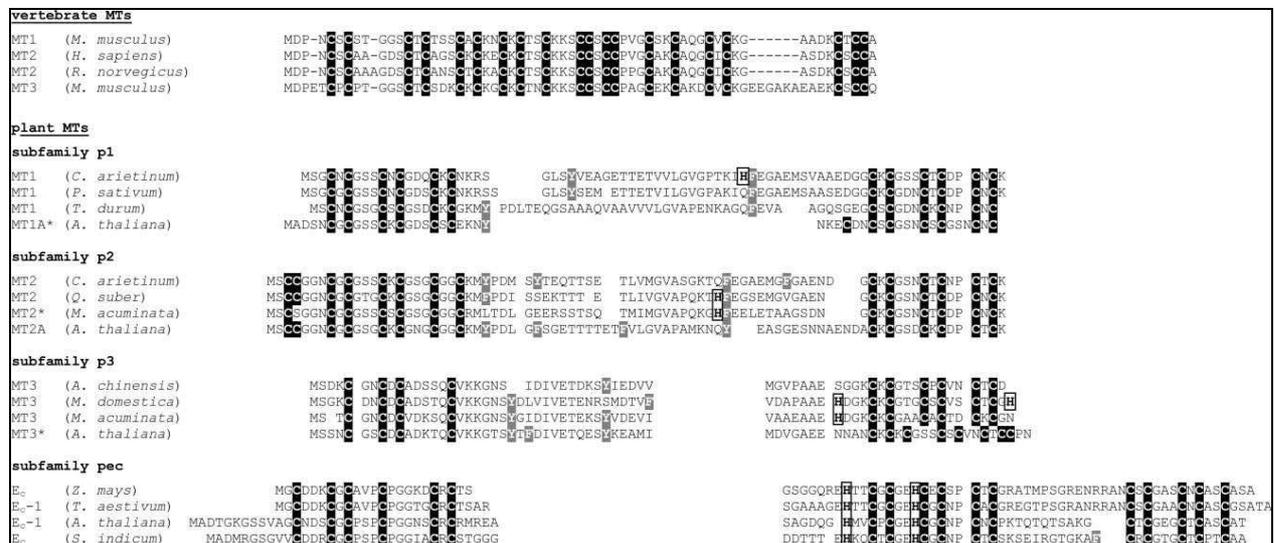


Figure 18. Alignement de séquences en acides aminés de métallothionéines présentes chez plusieurs espèces végétales (Freisinger, 2008). Les résidus de cystéine sont indiqués sur fond noir pour mettre en évidence leur localisation dans deux ou trois domaines (selon les classes de protéines) de liaison aux ETM.

Des études effectuées sur plusieurs espèces végétales dont le silène enflé (*Silene vulgaris*), un peuplier hybride (*Populus trichocarpa x deltoides*), *Thlaspi caerulescens* ou encore la massette (*Typha latifolia*), indiquent que les métallothionéines sont impliquées essentiellement dans le transport du cuivre et du zinc et réguleraient donc la distribution de ces métaux essentiels au sein des cellules et de la plante entière (Van Hoof *et al.*, 2001 ; Kohler *et al.*, 2004 ; Roosens *et al.*, 2004 ; Zhang *et al.*, 2004). Cependant, il a été montré que ces protéines peuvent aussi se lier aux ETM non essentiels au développement des plantes. Des métallothionéines de fétuque rouge (*Festuca rubra*) peuvent en effet fixer du plomb et du chrome (Ma *et al.*, 2003).

D'autres protéines sont impliquées dans des liaisons aux cations métalliques essentiels aux plantes en faible concentration mais peu d'entre elles sont clairement identifiées à ce jour. Le cuivre est pris en charge par plusieurs protéines pour être transporté vers les sites demandeurs. Ces protéines chaperonnes présentent des homologies avec des protéines bactériennes à domaines riches en cystéine, domaines permettant la fixation du cuivre

(Hiromura et Sakurai, 2001 ; Grotz et Guérinot, 2006). Parmi les protéines chaperonnes identifiées, la protéine CCH (Copper CHaperone) a été mise en évidence chez *Arabidopsis thaliana* (Mira *et al.*, 2001). Cette protéine a été localisée au niveau du phloème et serait impliquée dans la redistribution du cuivre provenant des feuilles sénescents. Une seconde protéine de type CCH a été récemment mise en évidence chez *Arabidopsis thaliana* et a été détectée au niveau du cytoplasme (Puig *et al.*, 2007). Cette protéine permettrait de transporter le cuivre vers les vésicules golgiennes via une pompe ATPase. Deux autres protéines chaperonnes ont été identifiées : une de ces protéines, (CCS1 pour Copper Chaperone for Superoxide dismutase), est localisée dans les chloroplastes et a pour fonction d'acheminer le cuivre impliqué dans le fonctionnement de superoxyde dismutases chloroplastiques. L'autre protéine (COX17 pour Cytochrome OXYdase) est localisée dans les mitochondries et jouerait un rôle dans le transport du cuivre vers le complexe cytochrome oxydase (Balandin et Castresana, 2002 ; Wintz et Vulpe, 2002).

3. Compartimentation

3.1. Compartimentation intracellulaire

3.1.1. Séquestration vacuolaire

Les ETM restent rarement dans le cytoplasme où ils peuvent générer des effets toxiques. Certaines protéines utilisant des métaux comme cofacteurs ont cependant besoin d'une concentration minimale de ces éléments pour leur fonctionnement et leur renouvellement. Cependant, chez les plantes non tolérantes, les ETM peuvent s'accumuler dans le cytoplasme avec des conséquences létales. Chez les plantes tolérantes ou les plantes sensibles faiblement exposées à des ETM, la vacuole constitue généralement le lieu de stockage majoritaire car elle est moins sensible aux oxydations que des organites comme les chloroplastes. Les ETM y sont acheminés par différents ligands (chaperonnes, composés riches en cystéines, acides organiques...) et entrent dans la vacuole seuls ou complexés à certains ligands par des transporteurs du tonoplaste (Hall et Williams, 2003).

Il existe 3 familles majoritaires de transporteurs d'ETM vers la vacuole :

1) Les transporteurs de type CDF (Cation Diffusion Facilitators) sont, comme leur nom l'indique, impliqués dans le transport de cations dont certains cations métalliques. Le métal qui emprunte le plus cette voie d'entrée est le zinc mais d'autres ETM comme le cobalt, le nickel ou le manganèse peuvent entrer dans les vacuoles par l'intermédiaire de ces protéines

comme il a été montré chez *Thlaspi goesingense* (une espèce hyperaccumulatrice de nickel), *Arabidopsis thaliana* et chez deux espèces de tabac, *Nicotiana tabacum* et *N. glauca* (Persans *et al.*, 2001 ; Desbrosses-Fonrouge *et al.*, 2005 ; Shingu *et al.*, 2005).

2) Les transporteurs antiports cations / H⁺ permettent l'entrée dans la vacuole de cations (dont des cations métalliques) parallèlement à une sortie de protons. Les ETM pour lesquels cette voie d'entrée a été identifiée sont le manganèse et le cadmium qui entreraient en compétition avec le calcium. Chez *Arabidopsis thaliana*, deux antiports échangeurs de cations, CAX1 et 2 (pour Calcium Antiporter eXchanger), ont été identifiés au niveau de la vacuole et les auteurs indiquent que CAX2 serait une voie d'entrée privilégiée pour les ETM car cet antiport a une plus faible affinité pour le calcium (Pittman *et al.*, 2005).

3) Les transporteurs de type ABC (ATP-Binding Cassette) constituent une famille de protéines que l'on retrouve chez un certain nombre d'organismes vivants, allant de la bactérie à l'homme. Ces protéines ATP-dépendantes transportent des molécules variées vers l'intérieur de la vacuole comme des ions, des glucides, des lipides, des pigments, des antibiotiques et des xénobiotiques organiques (Klein *et al.*, 2006 ; Verrier *et al.*, 2008). *Arabidopsis thaliana* possède environ 130 protéines appartenant à cette famille et le riz (*Oryza sativa*) au moins 120 mais la fonction de la plupart de ces protéines ainsi que leurs substrats spécifiques sont peu connus à ce jour (Kim *et al.*, 2006b ; Schulz et Kolukisaoglu, 2006). Cependant, certains transporteurs ABC constituent les voies d'entrée d'ETM et sont donc regroupés dans une sous-famille notée HMT pour Heavy Metal Tolerance ou MRP pour Multidrug Resistance associated-Proteins (Rea, 1999). Ces ETM n'entrent pas sous forme libre mais sous forme complexée avec du glutathion ou le plus souvent avec des phytochélatines (Verrier *et al.*, 2008). Une fois dans la vacuole, le devenir de l'association métal-ligand n'est pas clairement établi. Certains auteurs pensent que les ETM forment des complexes plus importants et stables grâce à la présence de sulfides vacuolaires et d'autres ETM entrés sous forme libre par des transporteurs différents des transporteurs ABC tels que des antiports cations / protons (Cobett et Goldsbrough, 2002 ; Mendoza-Cozatl et Moreno-Sanchez, 2006). La figure 19 montre la formation de ces complexes de haut poids moléculaire dans la vacuole.

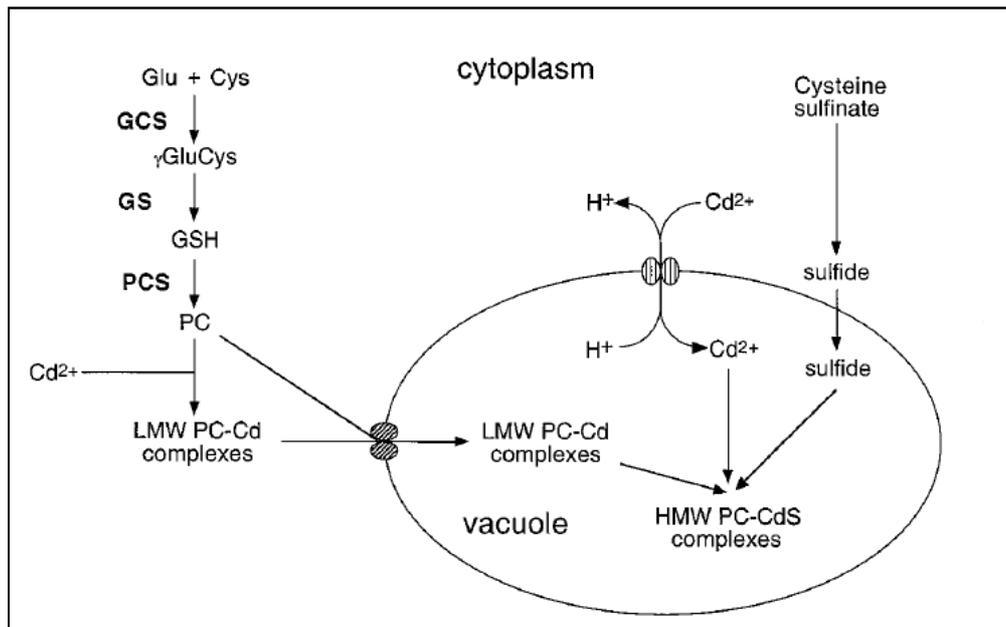


Figure 19. Formation et accumulation de complexes phytochélatines-métal à haut poids moléculaire dans les vacuoles à partir de l'exemple des ions cadmium Cd^{2+} (Cobbett, 2000). Les complexes de faible poids moléculaire (LMW pour Low Molecular Weight), c'est-à-dire les complexes phytochélatine-métal, forment des complexes de plus haut poids moléculaire (HMW pour High Molecular Weight) avec des associations phytochélatine-métal mais aussi des formes libres de métal (entrée par d'autres transporteurs que les transporteurs ABC) et des sulfides.

Cependant, d'autres auteurs pensent que les complexes de haut poids moléculaire ne sont pas définitifs : les métaux seraient libérés puis se lieraient ensuite à des acides organiques vacuolaires tandis que les ligands riches en cystéine seraient clivés en acides aminés pouvant retourner vers le cytoplasme et être ainsi réutilisés (Zenk, 1996 ; Grzam *et al.*, 2007).

3.1.2. Autres lieux de séquestration

Les ETM non essentiels sont stockés au niveau de la vacuole afin de préserver les autres compartiments de la cellule. En revanche, les ETM nécessaires à l'élongation, la différenciation et / ou à la défense des cellules sont en partie stockés dans d'autres organites où ils interviennent de diverses manières. Par exemple, le cuivre est un co-facteur de nombreuses enzymes comme la Cu/Zn superoxyde dismutase chloroplastique (enzyme anti-oxydante), la plastocyanine intervenant dans l'activité de photosynthèse, la cytochrome c oxydase impliquée dans la respiration au niveau des mitochondries, l'amine oxydase qui oxyde les polyamines et génère du peroxyde d'hydrogène pour la lignification des parois (au cours de la maturation et de la défense contre les pathogènes), la laccase intervenant dans la synthèse de lignine ou encore la polyphénol oxydase qui est une enzyme de défense contre les

pathogènes (Yruela, 2005). Le cuivre intervient également dans la synthèse de récepteurs à éthylène et est intégré à ces récepteurs au niveau de l'appareil de Golgi (Stearns et Glick, 2003). Le cuivre en excès est certes stocké dans les vacuoles mais les autres organites stockent également ce métal afin d'en disposer rapidement pour réguler les activités enzymatiques. Ce stockage ne concerne pas que le cuivre car d'autres ETM comme le zinc, le fer ou le manganèse sont également transportés vers d'autres lieux que la vacuole (figure 20). Il a de plus été montré que le reticulum endoplasmique peut être un autre lieu de stockage du manganèse lorsque celui-ci est présent en excès (Geisler *et al.*, 2000).

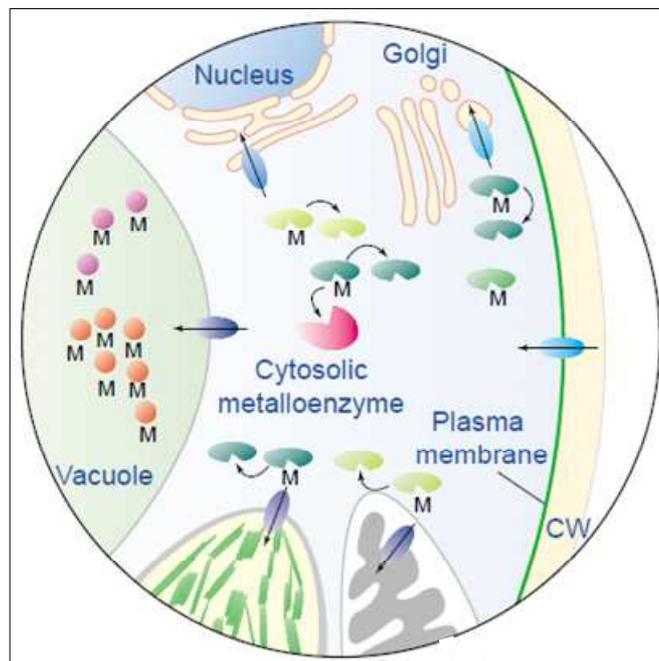


Figure 20. Transport par des ligands (de type agents chélateurs ou protéines chaperonnes) et compartimentation intracellulaire des ETM dans les cellules végétales (Clemens *et al.*, 2006). CW : cell-wall (paroi) ; M : métal.

Les transporteurs situés sur les membranes intracellulaires (mitochondries, chloroplastes...) appartiennent à des familles de transporteurs déjà citées précédemment comme les familles ZIP et CDF (Hall et Williams, 2003). Une autre famille de transporteurs est également impliquée et correspond à des ATPases de type P qui tiennent leur nom du fait qu'ils forment un intermédiaire phosphorylé lors du transport. Ces ATPases de type P sont groupées dans une sous-catégorie CPx (car elles contiennent un motif Cys-Pro-X) ou HMA pour Heavy Metal ATPases. Les HMA sont de deux types : certaines transportent des cations métalliques monovalents comme l'argent, et d'autres des cations métalliques divalents comme le zinc, le manganèse ou le plomb (Geisler *et al.*, 2000 ; Gravot *et al.*, 2004 ; Mills *et al.*,

2005). Le cuivre peut être présent dans les cellules sous forme divalente (Cu^{2+}) ou monovalente (Cu^+). Cependant, le cuivre divalent n'est pas pris en charge par les ATPases de type II et seul le cuivre monovalent peut être transporté par des ATPases de type I.

3.2. Compartimentation à l'échelle de la plante entière

Les plantes hyperaccumulatrices sont caractérisées par une capacité à transporter efficacement les ETM des racines vers les parties aériennes alors que chez les plantes sensibles, les ETM ont globalement tendance à rester en plus grande quantité au niveau des parties souterraines (McGrath *et al.*, 2002). Cette répartition différente entre plantes hyperaccumulatrices et sensibles peut s'expliquer par le fait que les hyperaccumulatrices ont une capacité plus faible à séquestrer les ETM dans les vacuoles des racines et sont plus efficaces pour les transporter par le xylème vers les parties aériennes comme l'ont montré Lasat *et al.* (1998) en comparant une espèce hyperaccumulatrice de zinc, *Thlaspi caerulescens*, et une espèce sensible, *Thlaspi arvense*. De nombreuses publications confirment cette accumulation préférentielle dans les parties aériennes pour plusieurs ETM comme l'arsenic (Srivastava *et al.*, 2006), le nickel (Sagner *et al.*, 1998) ou l'uranium (Overall et Parry, 2004 ; Tomé *et al.*, 2009). Par ailleurs, le stockage des ETM s'effectue souvent de manière privilégiée dans les feuilles matures, ce qui permet probablement aux jeunes feuilles d'être protégées et donc d'investir davantage d'énergie pour la croissance. Des travaux sur la fougère *Pteris vittata*, accumulatrice d'arsenic, ont montré que les jeunes feuilles stockent moins d'arsenic que les feuilles matures (Tu et Ma, 2002). Ainsi dans un sol concentré à 200 mg d'arsenic par kg de sol, les jeunes feuilles accumulent environ 5 g par kg contre 7,5 g pour les feuilles matures.

L'efficacité de l'acheminement vers les parties aériennes est liée à la présence importante de transporteurs membranaires (déjà cités précédemment) et d'ATPases CPx membranaires au niveau des tissus conducteurs. Ces protéines permettent de transférer des ETM dans le xylème des tissus racinaires puis de les libérer dans les organes aériens (Krämer *et al.*, 2007). Le transport dans le xylème se fait sous forme parfois libre mais souvent sous forme de complexe métal-ligand. Il a été reporté par exemple que l'aluminium est transporté dans le xylème sous forme liée à du citrate chez le sarrasin, *Fagopyrum esculentum* (Ma *et al.*, 2001).

Il est communément admis que les plantes accumulatrices stockent davantage d'ETM dans les parties aériennes que dans les racines. Cependant, cette généralité n'est pas valable pour la totalité des ETM car le plomb et le chrome sont souvent présents en plus grande quantité dans les racines que dans les parties aériennes (Singh *et al.*, 1997 ; Shanker *et al.*, 2005). Des travaux réalisés sur une Poacée hyperaccumulatrice de chrome, *Leersia hexandra*, indiquent ainsi que les racines sont plus riches en chrome III et en chrome IV que les feuilles avec des ratios racines / feuilles respectivement d'un facteur 2 et 1,5 (Zhang *et al.*, 2007b). Les plantes semblent aussi stocker le plomb plutôt au niveau racinaire. Par exemple, une espèce de tabac (*Nicotiana glauca*) surexprimant un gène de blé codant une phytochélatine synthase accumule certes plus de plomb que les plantes sauvages mais avec une quantité de plomb restant deux fois plus élevée dans les racines que dans les feuilles. Estrella-Gomez *et al.* (2009) reportent aussi une plus grande accumulation de plomb dans les racines de *Salvinia minima* (une fougère aquatique avec des racines flottantes), de l'ordre de 75 % par rapport aux feuilles. Dans cette étude, les auteurs mettent également en évidence une plus forte accumulation de phytochélatines dans les racines, ce qui tend à montrer que les vacuoles racinaires constitueraient le lieu de stockage préférentiel du plomb. Une autre étude réalisée sur *Brassica juncea* confirme la plus forte accumulation du plomb dans les racines (Meyers *et al.*, 2008). Les auteurs suggèrent que ce phénomène pourrait être dû à une plus faible quantité ou efficacité de transporteurs racinaires pouvant exporter le plomb vers le xylème.

Les ETM ne s'accumulent pas de manière homogène dans tous les tissus. Au niveau racinaire, les ETM absorbés sont stockés dans les vacuoles mais également acheminés vers les parties aériennes, ce qui génère une concentration assez similaire dans toutes les cellules (Milner et Kochian, 2008). Par contre, au niveau des feuilles, qui constituent un stockage final et non pas un organe de transit, il a été observé que les ETM s'accumulent préférentiellement dans les tissus épidermiques et beaucoup moins dans les parenchymes, probablement pour préserver les cellules photosynthétiques. Cette différence de compartimentation a été montrée par exemple chez *Thlaspi caerulescens*, une Brassicacée hyperaccumulatrice de zinc chez laquelle le zinc foliaire est en concentration 5 fois plus grande dans les cellules épidermiques que dans les cellules de parenchyme (Küpper *et al.*, 1999). Plusieurs Brassicacées du genre *Alyssum*, identifiées comme hyperaccumulatrices de nickel, stockent également davantage de métal dans les cellules épidermiques, et plus particulièrement au niveau des trichomes (Broadhurst *et al.*, 2004).

IV. Cas du cadmium

La phytoaccumulation du cadmium est décrite à part dans cette introduction bibliographique car l'exposition des plantes à ce métal fait l'objet de ce travail de thèse et nécessite donc quelques précisions supplémentaires concernant ses effets sur les plantes ainsi que les mécanismes d'accumulation.

Le cadmium est l'un des principaux polluants métalliques de l'environnement. Il provient essentiellement des activités humaines avec une émission chiffrée à presque 30 000 tonnes par an (Sanita di Toppi et Gabrielli, 1999). L'origine de la présence de cadmium dans les sols est attribuée aux retombées atmosphériques de fonderies de zinc, raffineries, incinérateurs ainsi qu'aux combustions de charbon, à divers déchets urbains et à l'utilisation de fertilisants en agriculture (Sanita di Toppi et Gabrielli, 1999 ; Roth *et al.*, 2006). Il est rare de trouver des sols uniquement pollués par du cadmium car ce métal est plus souvent présent dans des milieux contenant aussi du plomb et / ou du zinc (Daud *et al.*, 2008). Les sols faiblement pollués contiennent des concentrations de cadmium comprises entre 0,04 et 0,32 mM de Cd. Les sols modérément à fortement contaminés atteignent quant à eux des concentrations supérieures à 0,32 mM et pouvant aller jusqu'à 1 mM (Daud *et al.*, 2008).

1. Effets néfastes

Le cadmium (Cd) est un métal non essentiel pour les organismes vivants. Sa toxicité est un phénomène avéré chez la plupart des êtres vivants dont l'Homme car le cadmium est classé comme agent cancérigène et génotoxique de groupe 1 par l'« International agency for research on cancer » ou IARC (Daud *et al.*, 2008). A ce jour, une seule protéine utilisant du cadmium comme cofacteur a été décrite : il s'agit d'une anhydrase carbonique découverte chez la diatomée marine *Thalassiosira weissflogii* (Lane *et al.*, 2005 ; Xu *et al.*, 2008).

Le cadmium peut provoquer des dommages oxydatifs en augmentant la concentration cellulaire des espèces réactives de l'oxygène et en réduisant le pouvoir antioxydant de la cellule (Caçoilo Corticeiro *et al.*, 2006). Un excès de Cd perturbe plusieurs métabolismes physiologiques au sein de la plante tels que la photosynthèse, l'absorption d'eau et de minéraux, l'évapotranspiration ou encore la respiration (Yoshihara *et al.*, 2006 ; Wang *et al.*, 2008). Il en résulte des carences minérales, une déshydratation et une oxydation des composants cellulaires qui provoquent des chloroses, un brunissement des racines et un

ralentissement de croissance aboutissant finalement à la mort de la plante (Das *et al.*, 1997 ; Sanita di Toppi et Gabbrielli, 1999).

La cible préférentielle du cadmium correspondrait à des enzymes anti-oxydantes de type thiol-transférase qui contiennent deux résidus cystéine dans leur site actif : des thiorédoxines et thiorédoxine transférases intervenant notamment dans l'activité de photosynthèse, des glutarédoxines impliquées dans la détoxification d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou encore des glutathion réductases qui ont pour rôle de réduire le glutathion oxydé afin de le recycler pour les mécanismes de lutte contre l'oxydation cellulaire (Chrestensen *et al.*, 2000). La toxicité du cadmium peut être liée à sa liaison aux groupes sulfhydryles des protéines. Cette liaison entraîne une inhibition de l'activité des enzymes et induit ainsi une perturbation de l'état d'oxydoréduction de la cellule et / ou la production d'ERO, plus particulièrement H_2O_2 (Schutzendubel *et al.*, 2002 ; Cho et Seo, 2005).

Il a aussi été proposé que le processus de synthèse des centres fer / soufre soit inhibé, conduisant à une perturbation du métabolisme du fer et à une production accrue de radicaux libres (Chrestensen *et al.*, 2000). Chez les eucaryotes supérieurs s'ajoute un effet inhibiteur du cadmium sur la protéine p53 (« p53-like » chez les plantes) qui coordonne la réponse aux génotoxiques et notamment l'induction des systèmes de réparation. L'inhibition de la p53 par le métal amplifierait son potentiel mutagène (Méplan *et al.*, 1999). Les études ont montré que le cadmium est un puissant inhibiteur des systèmes de réparation de l'ADN, notamment des systèmes d'excision / réparation, des nucléotides ainsi que des mésappariements (Liu *et al.*, 2008). La plupart des enzymes des systèmes de réparation de l'ADN contenant un atome de zinc essentiel à leur activité, il est supposé que le mécanisme en cause est le remplacement du zinc par le cadmium.

2. Phytoaccumulation

Pour pénétrer dans la cellule, le cadmium entre en compétition avec de nombreux cations divalents et notamment avec le calcium et emprunte de nombreux transporteurs appartenant aux familles mentionnées précédemment (figure 10) à l'exception des transporteurs de type COPT (Clemens *et al.*, 1998 ; Hall et Williams, 2003). Le cadmium peut également emprunter une autre famille de transporteurs appelée LCT (Low affinity Cation

Transporter) qui permet plutôt l'entrée de calcium lorsque les plantes ne sont pas soumises à un milieu pollué par des ETM. Le cadmium semble emprunter davantage de transporteurs membranaires que les autres ETM probablement parce qu'il est l'un des ETM les plus mobiles dans le sol et qu'il entre ainsi davantage en compétition avec les éléments essentiels au développement des plantes comme le calcium, le cuivre, le zinc ou le fer (Sanita di Toppi et Gabbrielli, 1999). Cependant, le cadmium étant l'un des ETM les plus étudiés, il est possible que la découverte du grand nombre de transporteurs potentiels de ce métal soit due à davantage de travaux réalisés par rapport à l'absorption des autres ions métalliques.

Une fois dans la cellule, le cadmium se lie de façon préférentielle aux ligands contenant des groupes sulfhydriles, c'est-à-dire essentiellement des phytochélatines et dans une moindre mesure du glutathion et des métallothionéines (Cobbett, 2000 ; Cobbett et Goldsbrough, 2002). En réponse au stress causé par le cadmium, les plantes activent la voie d'assimilation des sulfates et amplifient la biosynthèse de cystéine, de glutathion et de phytochélatines en activant la transcription des gènes impliqués (Harada *et al.*, 2002 ; Nocito *et al.*, 2002 ; Sakulkoo *et al.*, 2005 ; Roth *et al.*, 2006 ; Mishra *et al.*, 2009). La réorientation du métabolisme soufré vers la production de glutathion limite la disponibilité en acides aminés soufrés pour la biosynthèse des protéines. Ainsi, il a été montré que la levure *Saccharomyces cerevisiae* exposée au cadmium synthétise des isoformes protéiques avec une teneur plus faible en méthionine et en cystéine (Li *et al.*, 1997). Ce changement d'expression du protéome permet une économie globale de 30 % en acides aminés soufrés dans les protéines. C'est le premier exemple de mise en évidence d'un tel mécanisme d'économie chez un eucaryote.

Comme pour bon nombre d'ETM non essentiels, le cadmium est stocké presque exclusivement dans la vacuole. L'entrée du cadmium sous forme complexée aux phytochélatines est réalisée par des transporteurs de type ABC (Klein *et al.*, 2006 ; Verrier *et al.*, 2008). D'autres transporteurs font entrer le cadmium sous forme non complexée comme des pompes ATPase de type HMA, des CDF et des antiports cations / protons (Bernard *et al.*, 2004 ; Gravot *et al.*, 2004 ; Desbrosses-Fonrouge *et al.*, 2005 ; Pittman *et al.*, 2005 ; Colangelo et Guérinot, 2006). Certaines plantes peuvent cependant accumuler le cadmium en grande quantité au niveau des parois. Ainsi l'hyperaccumulatrice *Sedum alfredii* et la ramie (*Beckmeria nivea*) fixent respectivement plus de 60 et 50 % du cadmium présent dans la plante au niveau des parois (Ni et Wei, 2003 ; Wang *et al.*, 2008). Il en va de même pour

l'hyperaccumulatrice *Thlaspi caerulescens*, qui stocke le cadmium à hauteur de 60 à 70 % dans les parois et plus particulièrement en association avec des composés pectiques (Boominathan et Doran, 2003 ; Wojcik *et al.*, 2005).

Au niveau des tissus, comme pour les autres ETM, le métal est plus souvent concentré dans les cellules épidermiques que dans les cellules de parenchyme. Pour les feuilles, il a été montré par exemple chez *Arabidopsis thaliana* que l'épiderme, et plus particulièrement les trichomes, accumule davantage de cadmium que les autres cellules (Gutierrez-Alcala *et al.*, 2000 ; Ager *et al.*, 2002). Cette accumulation préférentielle au niveau des trichomes est confirmée par Isaure *et al.* (2006). Les auteurs ont montré cependant que pour les racines, la principale zone d'accumulation correspond à la gaine périvasculaire et non à l'épiderme. Une autre étude portant sur des plants de tabac (*Nicotiana tabacum*) cultivés sur milieu riche en cadmium et en calcium a montré une exportation de ces deux ions vers les trichomes et même une excrétion de cristaux de cadmium et de calcium par ces cellules, le cadmium étant cependant libéré en quantité beaucoup plus faible que le calcium, ce qui constitue au final un moyen de défense assez limité (Choi *et al.*, 2001). Un autre exemple souvent étudié est la jacinthe d'eau car elle est considérée comme une espèce intéressante pour les processus de phytoremédiation en zone aquatique. Une expérience réalisée avec un milieu contenant 50 mg de cadmium par litre a montré qu'au niveau des feuilles, le métal est principalement stocké dans des trichomes épidermiques, et plus particulièrement dans les feuilles âgées (Lavid *et al.*, 2001). De plus, au niveau du rhizome, les auteurs ont observé que le cadmium est concentré presque exclusivement dans l'épiderme et très peu au niveau du parenchyme.

Au niveau de la plante entière, les quelques plantes hyperaccumulatrices de cadmium stockent ce métal de manière différente selon les espèces. Par exemple, l'herbe à aiguilles (*Bidens pilosa*) et l'érigéron du Canada (*Conyza canadensis*) (Astéracées) contiennent davantage de cadmium dans les parties aériennes que dans les racines, ce qui correspond au résultat attendu pour les hyperaccumulatrices de nombreux ETM (Sun *et al.*, 2009 ; Wei *et al.*, 2009). En revanche, il semblerait que davantage d'espèces hyperaccumulatrices stockent autant, voire plus, de cadmium dans les racines : la Crassulacée *Sedum alfredii* (Ni et Wei, 2003), la Caprifoliacée *Lonicera japonica* (Liu *et al.*, 2009) ou encore les trois Brassicacées *Thlaspi caerulescens* (Ebbs *et al.*, 2002 ; Wojcik *et al.*, 2005), *Arabidopsis halleri* (Zhao *et al.*, 2006) et récemment *Arabis paniculata* (Qiu *et al.*, 2008 ; Tang *et al.*, 2009).

POSITIONNEMENT DU SUJET ET OBJECTIFS

Le sujet de thèse s'inscrit dans une thématique visant à étudier les mécanismes qui interviennent dans les processus d'accumulation du cadmium par des plantes. Une telle étude nécessite dans un premier temps de sélectionner l'ETM ainsi que le modèle végétal, et dans un second temps d'élaborer la démarche expérimentale.

I. Choix de l'ETM

L'ETM sélectionné pour ce projet est le cadmium. Il est l'un des ETM les plus mobiles dans les sols plus ou moins acides, ces derniers représentant le cas le plus fréquent à l'échelle planétaire (Lafuente *et al.*, 2008). La forte mobilité du Cd le rend facilement absorbable par les plantes et donc rapidement toxique. Même les plantes les plus tolérantes vis-à-vis du Cd ne stockent pas des quantités exceptionnelles de ce métal. En effet, les espèces considérées comme hyperaccumulatrices de Cd doivent accumuler une quantité minimale de 100 mg de ce métal par kg de matière sèche (Baker et Brooks, 1989), ce qui est faible par rapport aux espèces hyperaccumulatrices d'autres ETM comme le montre le tableau 12. Par exemple, les hyperaccumulatrices d'arsenic ou de plomb, autres ETM non nécessaires au développement des plantes, doivent stocker une quantité 10 fois supérieure à ce que doivent accumuler les plantes hyperaccumulatrices de Cd.

Tableau 12. Quantité minimale d'ETM en mg par kg de matière sèche (MS) requise dans les plantes pour qu'elles soient considérées comme hyperaccumulatrices (Baker et Brooks, 1989 ; Huang *et al.*, 1998 ; Ma *et al.*, 2001 ; Liang *et al.*, 2009).

ETM	Quantité minimale (mg / kg MS)
Fe, Mn, U, Z	10 000
Al, As, Co, Cr, Cu, Ni, Pl, Se	1 000
Cd	100
Hg	10

Le Cd est également un ETM régulièrement reporté dans la littérature, ce qui nous a permis d'inscrire ce travail dans un contexte plus large et d'envisager une comparaison entre différents modèles végétaux pour préciser les mécanismes impliqués dans la tolérance au Cd.

II. Modèles végétaux

Deux modèles végétaux ont été choisis : 1) l'un pour un aspect relevant de la recherche fondamentale afin de comprendre les mécanismes moléculaires mis en jeu suite au traitement par le Cd ; 2) l'autre comme une espèce potentiellement utilisable dans une optique applicative de la phytoremédiation.

1. L'arabette de Thalius, *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.

L'arabette de Thalius ou arabette des dames ou encore arabette rameuse est une Angiosperme eudicotylédone de la famille des Brassicacées, anciennement Crucifères. Elle fut découverte au 16^{ème} siècle dans les montagnes du Harz en Allemagne par Johannes Thal qui l'identifia sous le nom de *Pilosella siliquosa*. Linné lui donna ensuite le nom d'*Arabis thaliana* (en hommage à Thal) en 1753 dans son ouvrage *Species Plantarum*. Enfin, en 1841, Gustav Heynhold lui attribua un autre nom de genre pour aboutir au nom encore actuel *Arabidopsis thaliana*.

1.1. Intérêts pour la recherche fondamentale

L'arabette est très utilisée en recherche pour plusieurs raisons :

a) l'arabette est une plante facile et rapide à cultiver. Tout d'abord, elle présente une taille modeste de 30 à 40 cm à maturité, ce qui permet de cultiver un grand nombre d'individus sur une petite surface. Par ailleurs, son cycle de développement est court car en conditions optimales, il faut environ 7 semaines pour aller de la germination de la graine à la plante présentant ses premières siliques (Boyes *et al.*, 2001). L'arabette, qui est diploïde, se reproduit principalement par autofécondation et chaque plante peut produire plusieurs dizaines de milliers de graines, ce qui en fait une plante très utilisée par les généticiens. De plus, son cycle entier de développement peut se dérouler non seulement en serre mais aussi en culture *in vitro*, ce qui permet de faire varier de manière plus contrôlée certains paramètres (lumière, température, composition du milieu...).

b) son génome a été entièrement séquencé en 2000 (Salanoubat *et al.*, 2000) et les gènes sont répertoriés dans la base de données TAIR ou « The Arabidopsis Information Resource » (<http://www.arabidopsis.org/>). Le génome d'*Arabidopsis thaliana* est le plus petit génome végétal connu, ce qui explique probablement son choix comme premier génome végétal séquencé car cette espèce adventice n'a pas de valeur économique. L'arabette possède 27 379 gènes répartis sur 5 chromosomes ($2n = 10$). A titre comparatif, le génome du riz (*Oryza sativa*) et celui du maïs (*Zea mays*) sont respectivement 4 et 20 fois plus grands. En revanche, le génome d'une espèce de peuplier (*Populus trichocarpa*) présente environ 45 500 gènes, soit un peu moins de deux fois le génome d'*Arabidopsis thaliana* (Tuskan *et al.*, 2006). Chez *A. thaliana*, chaque locus possède, dans la base de données TAIR, un code d'identification et de nombreuses annotations mais tous les gènes n'ont pas encore de fonction et de régulation totalement connues. Le séquençage de l'arabette permet donc d'étudier de manière plus précise des gènes impliqués potentiellement dans certaines voies de synthèse ou de signalisation. Il existe également pour l'arabette des microréseaux à oligonucléotides permettant de suivre dans des conditions choisies, l'évolution non pas d'un gène mais de la totalité du génome. Des banques de données protéomiques sont également disponibles.

1.2. Sélection de l'écotype Wassilewskija (Ws)

Il existe environ 750 écotypes recensés sur le site TAIR dont la majorité a été répertoriée en Europe et à l'Est des Etats-Unis d'Amérique. Les autres écotypes sont présents pour la plupart à des latitudes similaires, c'est à dire au niveau des pays du Maghreb, de la Turquie et de l'Asie (essentiellement Inde, Pakistan, Chine et Japon). L'écotype Ws, originaire de Russie, est reconnu comme ayant un taux de division cellulaire et un cycle de développement plus rapides que l'écotype de référence Columbia (Col) et que Landberg erecta (Ler), un autre écotype assez souvent utilisé en recherche (Beemster *et al.*, 2002; Passardi *et al.*, 2007). L'écotype Ws arrive à floraison presque deux semaines avant l'écotype Col et 1 semaine avant l'écotype Ler. Par ailleurs, l'écotype Ws présente une production plus précoce de racines secondaires. En effet, en conditions identiques (culture *in vitro* sur des boîtes en position horizontale), des plants Ws de 2 semaines possèdent en moyenne 5 racines secondaires contre 2 pour les plants Col et Ler (Passardi *et al.*, 2007). L'objectif, en utilisant l'écotype Ws (à croissance plus rapide que Col et Ler), est de voir si une exposition au cadmium entraîne un effet toxique plus précoce ou si au contraire, le développement plus rapide de Ws lui permet de mieux tolérer la présence de métal dans son milieu.

2. Le mélèze hybride, *Larix x eurolepis* (Coaz)

Avant de présenter les critères qui nous ont amenés à choisir cette espèce, il est nécessaire d'indiquer dans un premier temps quels sont les avantages potentiels d'utiliser des espèces ligneuses dans le cadre de la phytoremédiation.

2.1. La phytoaccumulation d'ETM par les espèces ligneuses

L'utilisation des arbres pour la phytoremédiation est encore peu développée alors que ceux-ci peuvent se révéler être de bons candidats pour plusieurs raisons :

a) Le système racinaire des arbres est plus développé que celui des herbacées hyperaccumulatrices, ce qui permet d'une part une plus grande absorption des ETM localisés en profondeur et d'autre part une érosion des sols plus limitée et donc un risque de lessivage moindre des ETM vers les milieux adjacents au site contaminé (Pulford et Dickinson, 2005).

b) Les arbres possèdent une biomasse beaucoup plus importante que les herbacées hyperaccumulatrices, ce qui permettrait d'accumuler davantage d'ETM en quantité relative même si la concentration d'ETM en mg par kg de masse sèche est inférieure à celle des herbacées hyperaccumulatrices (Pulford et Watson, 2003). Par exemple, *Thlaspi caerulescens* (une herbacée hyperaccumulatrice particulièrement performante) peut produire de 0,5 à 4 tonnes de biomasse par hectare et par an selon le type de sol (Yanai *et al.*, 2006), alors que la biomasse annuelle moyenne de saules ou de peupliers atteint en moyenne 20 tonnes par ha (Robinson *et al.*, 2000). Dans ces deux exemples, les plantes ont été mises en contact avec du cadmium et les auteurs ont obtenu une concentration du métal au niveau des parties aériennes comprise entre 0,5 et 1,2 g par kg de matière sèche pour *Thlaspi caerulescens* (qui semble tributaire du type de sol) et 0,5 g pour les peupliers hybrides testés. Même si la concentration en cadmium est plus faible pour les peupliers, la quantité de cadmium rapportée à la biomasse annuelle (20 tonnes) donne au final une accumulation de 10 kg de cadmium pour les peupliers contre un maximum de 4,8 kg pour *Thlaspi caerulescens*. Les résultats vont dans le même sens avec d'autres ETM comme par exemple le zinc. Les travaux menés par Yanai *et al.* (2006) indiquent que *Thlaspi caerulescens* stocke jusqu'à 4,8 g de zinc par kg dans les parties aériennes. Des études réalisées avec des peupliers hybrides (Laureysens *et al.*, 2004) et des saules (Vandecasteele *et al.*, 2005) exposés au zinc montrent que ce métal s'accumule dans les parties aériennes à hauteur d'environ 1,2 g par kg. En rapportant ces concentrations à la biomasse à l'hectare, les quantités accumulées sont plus importantes pour les espèces ligneuses. Ces quelques comparaisons suggèrent fortement que les arbres peuvent constituer

des modèles intéressants pour extraire des quantités plus importantes d'ETM du sol, tout en dépolluant en profondeur.

Les arbres les plus aptes à la phytoremédiation sont ceux dont la croissance est rapide comme les peupliers et les saules. Une étude réalisée en Inde sur *Cassia siamea* (Fabacées) indique que cet arbre peut être un bon candidat pour détoxifier des sols contaminés par divers ETM (Tripathi *et al.*, 2004). Cette espèce exposée à un milieu contaminé surtout par du fer, est capable de stocker environ 0,4 g de ce métal et 0,2 g de nickel et de zinc par kg et par an. Ces résultats ont été confirmés par une autre étude sur des plants de *Cassia siamea* cultivés sur un site riche en fer et en manganèse (Jambhulkar et Juwarkar, 2009). Cette espèce a stocké des quantités de fer et de manganèse de 0,95 et 0,2 mg par kg respectivement.

L'inconvénient majeur de l'utilisation des arbres semble résider dans l'accumulation préférentielle dans les racines que dans les parties aériennes. Cette compartimentation limite l'extraction des ETM à moins d'un prélèvement total des arbres et non pas uniquement des parties aériennes, ce qui est envisageable sur de jeunes arbres de quelques mètres de hauteur mais pas sur des arbres proches de la maturité. Cependant, la répartition des ETM semble variable selon les genres et espèces d'arbres. Par exemple, une étude sur la réponse de deux espèces de saules (*Salix fragilis* et *Salix viminalis*) à différents ETM montre que ces espèces compartimentent différemment les métaux : le zinc et le cadmium sont répartis presque équitablement entre tous les organes alors que d'autres métaux comme le chrome, le cuivre, le fer, le plomb et le nickel s'accumulent de manière privilégiée au niveau du système racinaire (Vandecasteele *et al.*, 2005). D'autres études réalisées des aulnes, des bouleaux, des hybrides de saules et de peupliers indiquent que le cadmium et le zinc s'accumulent généralement davantage dans les feuilles contrairement au cuivre localisé plutôt dans les troncs et les branches (Pulford et Watson, 2003 ; French *et al.*, 2006). Quant à la localisation cellulaire des ETM, de nombreux travaux restent encore à faire. Vollenweider *et al.* (2006) ont montré que le cadmium accumulé dans les feuilles d'une espèce de saule (*Salix viminalis*) est localisé en grande partie dans les parois des cellules de collenchyme. Mais le peu d'études réalisées sur la localisation des ETM chez les arbres ne permet pas pour l'instant d'établir de généralités.

2.2. Le choix du mélèze

Les mélèzes sont des Gymnospermes appartenant à la famille des Pinacées et au genre *Larix*. Ils font partie des rares conifères à posséder un feuillage caduc. Le mélèze est assez répandu dans le Limousin qui est la troisième région la plus productive de bois et la seconde pour le mélèze selon les sources du conseil régional (Dupont *et al.*, 2008). L'espèce de mélèze la plus fréquemment rencontrée dans la région est le mélèze du Japon qui occupe moins de 5 % des surfaces boisées. La Corrèze est actuellement le département français possédant la plus grande surface de boisements de mélèzes.

Le mélèze est une essence dite pionnière, c'est à dire qu'il a un fort taux de croissance, qu'il est peu exigeant en terme de richesse du sol en minéraux et qu'il a besoin d'une forte intensité lumineuse pour un développement optimal (<http://www.onf.fr>). Il est largement exploité dans les programmes de reboisement (lors de la tempête de 1999, les mélèzes sont les arbres qui ont le mieux résisté) et également pour les constructions. En effet, le mélèze présente une résistance naturelle aux insectes et champignons, ce qui fait de ce bois réputé imputrescible un produit intéressant pour la fabrication de matériaux durables et ne nécessitant pas de traitements chimiques.

L'espèce sélectionnée dans cette étude est un mélèze hybride issu du croisement entre le mélèze d'Europe, *Larix decidua* (Miller), et le mélèze du Japon, *Larix kaempferi* (Lamb.). cet hybride a une amplitude écologique plus grande que celle de ses parents et est en voie de remplacer le mélèze du Japon dans le reboisement. Les plantules sont obtenues *in vitro* à partir de masses pro-embryogènes par la technique d'embryogenèse somatique mise au point par l'INRA d'Orléans et utilisée au laboratoire (Von Aderkas *et al.*, 2002a et b ; Guillaumot *et al.*, 2008 ; Lelu-Walter et Pâques, 2009). Les étapes sont présentées dans la partie « Matériels et Méthodes »

Le mélèze a donc été choisi comme modèle expérimental pour :

- 1) son importance au niveau régional,
- 2) son fort taux de croissance (les espèces pionnières étant considérées comme de meilleurs candidats pour la phytoaccumulation),
- 3) son fort enracinement qui permettrait de traiter des pollutions profondes,
- 4) l'absence de données bibliographiques sur les réponses des mélèzes aux ETM (et notamment au cadmium), ce qui apporte un aspect très novateur à cette étude,

5) la possibilité en utilisant l'embryogenèse somatique d'obtenir *in vitro* un grand nombre d'embryons puis de plantules.

III. Démarche expérimentale et objectifs

1) Croissance et développement. Tout d'abord, les travaux portant sur *A. thaliana* ont pour objectif d'établir si l'écotype Ws présente ou non une différence de sensibilité au Cd par rapport aux écotypes plus fréquemment étudiés, Ler et surtout Col. Des mesures de croissance ont donc été réalisées avec différentes concentrations en Cd (biomasses aérienne et souterraine, longueur de la racine principale).

2) Approche biochimique. De plus, la littérature fait état du rôle des phytochélatines dans la tolérance à différents ETM dont le Cd. Ces molécules ont donc été étudiées plus précisément à travers la production des différents types de phytochélatines, l'activité spécifique des enzymes intervenant dans leur synthèse et le niveau d'expression des gènes codant ces enzymes. Ce travail a aussi pour but d'avoir une vision globale de la régulation de la voie de synthèse des phytochélatines car la littérature ne donne pas d'informations claires à ce sujet (cet aspect sera abordé dans la partie « Discussion »). Pour compléter cette étude, le Cd a également été quantifié dans les parties aériennes et souterraines afin de savoir comment est réparti le Cd absorbé et si cette répartition diffère entre les écotypes.

3) Approche transcriptomique. Par ailleurs, le suivi global de la régulation du génome d'*A. thaliana* en réponse au Cd doit permettre d'identifier les voies régulées au niveau transcriptionnel. Les effets du Cd sur *A. thaliana* ont donc été suivis au niveau transcriptomique à l'aide de microréseaux pangénomiques à oligonucléotides pour évaluer le niveau d'expression de la totalité des gènes. Une telle approche a déjà été proposée mais dans des conditions expérimentales différentes des nôtres (voir tableau 12 page 108) et sur un autre écotype que celui que nous avons utilisé (Kovalchuk *et al.*, 2005 ; Herbette *et al.*, 2006).

4) Développement d'un modèle ligneux. Un autre objectif de la thèse était d'obtenir des résultats préliminaires sur la phytoremédiation par les résineux, et plus précisément par le mélèze hybride sélectionné pour l'étude. Le génome du mélèze n'étant pas séquencé, l'utilisation de microréseaux à oligonucléotides n'est pas envisageable pour cette espèce. En ce qui concerne les espèces ligneuses, peu de travaux décrivent les mécanismes

d'accumulation du Cd ou d'autres ETM. La majorité des références disponibles est en effet souvent liée à la quantification des ETM dans les différents organes.

Matériels et Méthodes

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Les produits utilisés au cours de ces travaux ont été achetés chez Sigma-Aldrich (Saint Louis, Etats-Unis). Dans les cas contraires, le nom des fournisseurs sera précisé.

I. Matériel végétal et traitements

1. Arabette de Thalius (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh) - écotype Wassilewskija (Ws)

La stérilisation des graines d'*Arabidopsis thaliana* écotype Wassilewskija se fait par immersion des graines pendant 15 min dans 1 mL d'une solution à 70 % d'éthanol contenant 0,01 % (p/v) de Triton X-100. Les graines sont ensuite rincées 3 fois dans 1 mL d'éthanol absolu puis déposées sur un filtre Whatman[®] 44 (70 mm de diamètre) stérile pour laisser évaporer l'éthanol. Les graines sont alors mises en germination sur un milieu synthétique B5 (Duchefa Biochemie, Haarlem, Pays-Bas). Ce milieu, composé de sels minéraux et de vitamines (Gamborg *et al.*, 1968) est supplémenté en saccharose à 2 % (p/v), ajusté à pH 5,8 et solidifié avec 0,6 % (p/v) d'agar (Difco, Dallas, Etats-Unis). Le milieu est autoclavé 20 min à 120 °C puis refroidi avant d'être coulé dans des boîtes de Pétri carrées (12 cm de côté). Après dépôt des graines, les boîtes sont ensuite scellées avec du parafilm et placées à 4 °C pendant 2 jours avant d'être posées verticalement en chambre de culture à 21 °C avec une photopériode de 16 h. Après 7 jours, les plantules sont transférées sur un autre milieu de même composition avec ou sans cadmium. Le cadmium est apporté sous forme sulfatée (CdSO_4) à partir d'une solution mère à 10 mM préparée dans de l'eau ultrapure et filtrée stérilement. Après 7 jours sur ces nouveaux milieux, les plantes sont prélevées pour les analyses. Pour les paramètres de croissance (biomasses, longueur de la racine principale), les expériences ont été réalisées sur 3 lots indépendants comprenant chacun 5 plantules. Pour les autres dosages, les expériences ont été réalisées sur 3 lots indépendants (le nombre de plantules utilisées dépend des tests réalisés car ce sont des quantités de matière fraîche ou sèche de départ qui sont prises en compte). Des tests de germination ont également été réalisés *in vitro* sur des milieux contenant 0 à 500 μM de cadmium. Les comptages, effectués au bout de 5 jours, correspondent pour chaque concentration à la moyenne de 3 expériences indépendantes avec 3 boîtes chacune (une boîte contenant environ 200 graines).

2. Mélèze hybride (*Larix x eurolepis*)

Le matériel de départ (lignée N23), sous forme de masse pro-embryogène, nous a été gracieusement fourni par le Docteur Marie-Anne Lelu-Walter de l'INRA d'Orléans. Le mélèze hybride utilisé est issu du croisement entre le mélèze d'Europe, *Larix decidua* (Miller), et le mélèze du Japon, *Larix kaempferi* (Lamb.). Les différentes étapes de l'embryogenèse somatique sont illustrées sur la figure 21 et sont décrites dans la suite de ce paragraphe.

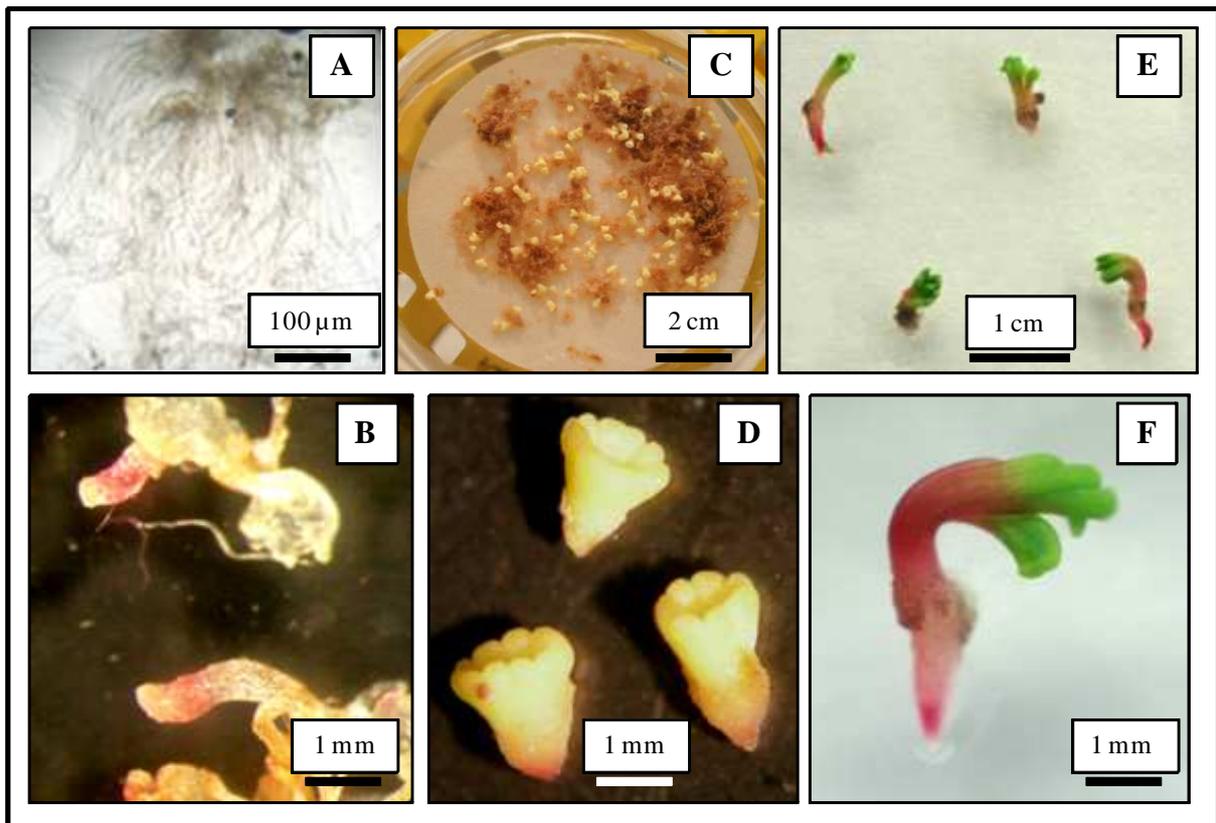


Figure 21. Phases de développement de la masse pro-embryogène jusqu'au développement de plantules de mélèze. A) masse pro-embryogène. B) Début de différenciation après une semaine sur un milieu contenant du charbon actif. Les tissus apparaissant en rose foncé sont des suspenseurs. C et D) Embryons après 5 semaines sur un milieu contenant de l'acide abscissique. E et F) Plantules âgées d'une semaine.

2.1. Phase de multiplication

Les masses sont dans un premier temps multipliées sur un milieu MSG (Becwar *et al.*, 1990) pendant 7 jours. Le milieu MSG est composé des éléments suivants dont les valeurs entre parenthèses correspondent aux quantités nécessaires pour préparer un litre de milieu de culture : glutamine (1,5 g), CaCl₂, 2 H₂O (0,44 g), Fer (0,04 g), MgSO₄, 7 H₂O (0,37 g), KH₂PO₄ (0,17 g), KCl (0,74 g), KNO₃ (0,1 g), myo-inositol (0,1 g), MnSO₄, H₂O (16,9 mg),

ZnSO₄, 7 H₂O (8,6 mg), H₃BO₃ (6,2 mg), Ki (0,83 mg), acide nicotinique (0,5 mg), pyridoxine HCl (0,5 mg), Na₂MoO₄, 2 H₂O (0,25 mg), thiamine HCl (0,1 mg), CuSO₄, 5 H₂O (0,025 mg), CoCl₂, 6 H₂O (0,025 mg). Pour cette première étape d'embryogenèse, le milieu MSG est supplémenté de saccharose à 2 % (p/v), de 2,2 µM d'acide 2,4-dichlorophénoxy acétique (2,4-D) et de 2,3 µM de benzylaminopurine (BAP). Le pH est ajusté à 5,8 et le milieu est solidifié avec 0,8 % (p/v) de gelrite (Duchefa Biochemie, Haarlem, Pays-Bas).

Les masses pro-embryogènes se présentent sous forme de petits filaments blanchâtres. Une quantité de 100 mg de masse pro-embryogène est immergée dans 30 mL de milieu MSG sans hormone et secouée vigoureusement afin de mieux séparer les filaments. Le mélange est filtré (à l'aide d'une pompe aspirante) sur un Büchner muni d'un disque de papier filtre stérile Whatman[®] 44. Le disque est ensuite déposé dans une boîte de Pétri scellée avec du parafilm, laquelle est ensuite placée pendant une semaine à l'obscurité dans une chambre de culture maintenue à 25 °C.

2.2. Première phase de maturation

Les masses en prolifération sont ensuite transférées et maintenues à l'obscurité à 25 °C pendant une semaine sur un milieu de maturation. Ce milieu est un milieu MSG supplémenté avec du charbon actif à 1 % (p/v) et du saccharose à 3,4 % (p/v) et solidifié avec 0,8 % (p/v) de gelrite. L'absence de facteurs de croissance dans ce milieu permet le début de la différenciation cellulaire. Ce processus est favorisé par le charbon actif qui piège non seulement les molécules sécrétées par les cellules qui pourraient s'avérer toxiques (comme des composés phénoliques) mais aussi les facteurs de croissance encore présents dans les masses pro-embryogènes (von Aderkas *et al.*, 2001).

2.3. Seconde phase de maturation et développement des embryons

Les masses en début de différenciation sont ensuite transférées et maintenues 5 semaines sur un milieu MSG contenant 60 µM d'acide abscissique (ABA), 2 µM d'acide indole butyrique (AIB) et du saccharose à 6,84 % (p/v). Le milieu est solidifié avec 0,6 % (p/v) de gelrite. Les boîtes de Pétri scellées sont placées en chambre de culture à 25°C avec une photopériode de 16 h et recouvertes d'une feuille de papier (semi-lumière). L'ABA favorise l'accumulation de réserves et inhibe la germination trop précoce des embryons, mimant ainsi le processus de maturation des embryons zygotiques (von Aderkas *et al.*, 2001). Au bout de 4 semaines, les embryons sont « matures » et prêts à germer.

2.4. Phase de germination et traitement au cadmium

Les embryons sont transférés sur un milieu MSG supplémenté de saccharose à 3 % (p/v). L'absence d'ABA dans ce milieu lève la dormance et favorise donc la germination. Les boîtes carrées (12 cm de côté) sont placées en position verticale en chambre de culture à 25 °C avec une photopériode de 16 h de lumière et 8 h d'obscurité. Au bout de 4 semaines, les plantules sont transférées sur un autre milieu de même composition contenant ou non du cadmium. Les plantules sont prélevées pour analyse après une semaine d'exposition au métal.

II. Activités enzymatiques

1. Extraction et dosage des protéines

Une quantité de 500 mg de matière fraîche de racines ou de parties aériennes est broyée au mortier à 4 °C dans 1 mL de tampon d'extraction composé de 100 mM de TRIS-Base à pH 8, 10 mM de MgCl₂ et 5 mM d'acide éthylène diamine tétra-acétique (EDTA). Le broyat est centrifugé à 4 °C pendant 15 min à 13 000 g puis le surnageant est ultrafiltré pendant 2 h à 4 °C et 4 000 g avec un système Centricon[®] YM-3 (Amicon Bioseparations, Millipore Corporation, Etats-Unis). Ce système possède un réservoir (partie supérieure de dépôt de l'échantillon) et un tube de filtration (partie inférieure) séparés par une membrane de cellulose dont les pores ont un seuil de coupure à 3 kDa. A la fin de la centrifugation, le rétentat (200 µL), qui contient alors les molécules de plus de 3 kDa (dont les protéines d'intérêt), est récupéré par retournement du réservoir (fermé par un tube de récupération) et centrifugation pendant 2 min à 500 g et à 4 °C. Le volume est ensuite ajusté à 1 mL avec le tampon d'extraction.

Le dosage est réalisé avec le réactif Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad, Munich, Allemagne) selon le protocole fourni par le fabricant. Un volume de 5 µL d'extrait protéique est mélangé au vortex à 5 µL d'HCl 0,1 M, 40 µL d'eau distillée et 1,75 mL de réactif préalablement dilué 4 fois dans de l'eau distillée. Après 5 min d'incubation à température ambiante, la DO est lue à 595 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (Uvikon 942, Kontron Instruments, Allemagne). Une gamme d'étalonnage est réalisée avec de l'albumine de sérum bovin de 0 à 5 mg. mL⁻¹.

2. Activité γ glutamylcystéine synthétase (EC 6.3.2.2)

Le réactif utilisé (800 μ L) est composé de 100 mM d'acide N-[2-Hydroxyéthyl]piperazine-N'-[2-éthane sulfonique] (HEPES) à pH 7,5, 150 mM de NaCl, 20 mM de $MgCl_2$, 5 mM d'ATP, 2 mM de phosphoénol pyruvate, 10 mM de cystéine, 20 mM de glutamate, 0,2 mM de NADH, 5 unités de pyruvate kinase de muscle de lapin et 10 unités de lactate déshydrogénase de type II de muscle de lapin (Jez *et al.*, 2004). La réaction débute avec l'ajout à température ambiante de 75 μ g de protéines dans du tampon d'extraction (200 μ L). La DO est lue au spectrophotomètre à 340 nm (Uvikon 942, Kontron Instruments, Allemagne) à T = 0 min et T = 5 min. La diminution de la DO correspond à la consommation de NADH pour régénérer l'ATP nécessaire à l'activité de l'enzyme testée. Elle est donc proportionnelle à la quantité de γ glutamylcystéine formée. Une gamme étalon est réalisée avec du NADH de 0 à 2 μ M. L'activité enzymatique spécifique est exprimée en nmoles de γ glutamylcystéine formée par min et par mg de protéines.

3. Activité glutathion synthétase (EC 6.3.2.3)

Le réactif utilisé (800 μ l) est le même que le précédent à l'exception du remplacement du glutamate et de la cystéine par 10 mM de glycine et 2,5 mM de γ glutamylcystéine (Jez et Cahoon, 2004). Le mode opératoire est similaire à celui décrit dans le paragraphe précédent. La diminution de la DO à 340 nm est inversement proportionnelle à la quantité de glutathion formée. L'activité est exprimée en nmoles de glutathion formé par min et par mg de protéines.

4. Activité phytochélatine synthase (EC 2.3.2.15)

Le protocole d'extraction des protéines est identique à celui utilisé pour mesurer les 2 activités enzymatiques précédentes hormis le tampon d'extraction composé de TRIS-Base 100 mM à pH8 contenant 2 mM de dithiothréitol (DTT). Une quantité de 100 μ g de protéines (dans 200 μ L de tampon d'extraction) est mélangée avec 300 μ L de réactif composé de TRIS-Base 200 mM (pH 8), DTT (2 mM), glutathion (10 mM) et cadmium (1 mM) (Clemens *et al.*, 1999). Ce mélange est incubé à 35 °C au bain-marie pendant 1 h puis la réaction est arrêtée avec 500 μ L d'acide 5-sulfosalicylique (ASS) à 5 % (p/v) contenant 6,3 mM d'acide diéthylène triamine penta-acétique (DETAPAC), un chélateur de cations. Les tubes sont centrifugés à 13 000 g et 4 °C pendant 30 min. Le surnageant est ensuite lyophilisé, repris dans 100 μ L d'ASS à 5 % (p/v) contenant 6,3 mM de DETAPAC puis filtré (filtres 0,22 μ m).

Les échantillons sont alors analysés par chromatographie liquide à haute pression (HPLC) pour doser les phytochélatines synthétisées (le protocole est décrit au paragraphe III.2).

III. Dosage des groupes thiols

1. Extraction et dosage des groupes thiols totaux non protéiques

Ce dosage est une estimation rapide et globale des thiols. Il ne permet pas de différencier le glutathion, ses précurseurs (cystéine et glutamylcystéine) et les différentes formes de phytochélatines.

Une quantité de 500 mg de matière fraîche (racines ou parties aériennes) est broyée au mortier à 4 °C avec 1,5 mL de tampon d'extraction composé d'ASS à 5 % (p/v) et 6,3 mM de DETAPAC. Les extraits sont ensuite centrifugés à 13 000 g pendant 30 min à 4 °C. L'ASS permet de précipiter les protéines et de conserver dans le surnageant les groupes thiols d'acides aminés libres (cystéine) et d'oligopeptides (glutamylcystéine, glutathion, phytochélatines).

Le dosage des thiols totaux est obtenu en mélangeant 80 µL de surnageant avec 20 µL de triéthanolamine à 25 % (p/v) pour neutraliser l'acidité, 620 µL de tampon phosphate de potassium à 0,1 M (pH 7) et 50 µL d'acide 5,5'-dithiobis-2-nitro-benzoïque (DTNB) à 10 mM dans du tampon phosphate. Le DTNB oxyde les groupes thiols pour donner du 5-thio-2-nitrobenzoate, un composé jaune dont la DO est mesurée au spectrophotomètre (Uvikon 942, Kontron Instruments, Allemagne) à 412 nm après 2 min. Une gamme de cystéine est réalisée de 0 à 200 µM. Les résultats sont exprimés en nmoles de groupes thiols par g de matière fraîche.

2. Extraction et dosage par HPLC

Une quantité de 1 g de matière fraîche (racines ou parties aériennes) est broyée au mortier à 4 °C avec 1,5 mL de tampon d'extraction composé d'ASS à 5 % (p/v) et 6,3 mM de DETAPAC. Les extraits sont centrifugés pendant 30 min à 4 °C et à 13 000 g. Le surnageant est ensuite lyophilisé puis repris dans 100 µL de tampon d'extraction. L'extrait est à nouveau centrifugé pendant 30 min à 4 °C et à 13 000 g puis le surnageant est filtré (filtres 0,22 µm) et analysé par HPLC.

Un volume de 25 μL d'échantillon est injecté dans une colonne Hypersil ODS C18 (250 mm \times 4,6 mm, taille des particules 5 μm ; A.I.T. Chromato, France). L'HPLC est reliée à un ordinateur qui pilote le programme de séparation du glutathion et des phytochélatines grâce au logiciel Chromeleon[®] Chromatography Management System, version 6,5 (Dionex Corporation, Californie, Etats-Unis). Le glutathion et les phytochélatines sont élués pendant 40 min à un flux de 0,5 mL \cdot min⁻¹ par un gradient linéaire d'acétonitrile de 0 à 20 % (v/v) dans de l'acide trifluoroacétique (TFA) à 1 % (v/v). La colonne est ensuite nettoyée pendant 5 min avec 20 % d'acétonitrile dans 0,1 % de TFA puis équilibrée 15 min avec du TFA à 0,1 % avant une nouvelle injection. Les fractions de 0,5 mL récupérées en sortie de colonne sont mélangées à température ambiante avec 0,5 mL de réactif composé de 75 μM de DTNB dans 0,2 M de tampon phosphate de sodium à pH 8,5. La DO est mesurée au spectrophotomètre (Uvikon 942, Kontron Instruments, Allemagne) à 412 nm après 2 min. Une gamme d'étalonnage est réalisée avec des standards de phytochélatines (PC2, PC3 et PC4) fournis gracieusement par le Professeur Zenk (Université Martin Luther, Halle, Allemagne) et du glutathion. La quantité de glutathion et de phytochélatines est exprimée en nmoles de groupes thiols par g de matière fraîche (pour la quantification des phytochélatines et du glutathion) ou par min et par mg de protéines (pour l'activité phytochélatine synthase).

IV. Dosage de la proline

Une quantité de 500 mg de matière fraîche (racines ou parties aériennes) est broyée au mortier à 4 °C avec 1,5 mL d'ASS à 5 % (p/v). Les extraits sont ensuite centrifugés à 13 000 g pendant 15 min à 4 °C.

Le dosage est réalisé en mélangeant 200 μL de surnageant avec 800 μL de réactif composé de ninhydrine à 1 % (p/v) dans de l'acide acétique à 60 % (v/v). Les tubes sont incubés au bain-marie à 100 °C pendant 20 min, refroidis à 4 °C, puis le contenu est mélangé énergiquement avec 1 mL de toluène. Les tubes sont laissés au repos au moins 4 h avant de prélever la phase supérieure (contenant la proline) pour une lecture au spectrophotomètre à 520 nm. Une gamme étalon de proline est réalisée de 0 à 0,4 mM et les teneurs en proline sont exprimées en μmoles de proline par g de matière fraîche.

V. Dosage du cadmium

Les parties aériennes et les racines sont séchées à l'étuve à 60 °C pendant 72 h puis réduites en poudre au mortier. Une quantité de 100 mg de matière sèche est ensuite utilisée pour la minéralisation. La matière sèche est mélangée à 5 mL d'acide nitrique à 69 %. Après dégazage de l'acide pendant environ 15 min, les échantillons sont passés dans un minéralisateur à micro-ondes (Multiwave 3000, Anton Paar, France) selon un mode opératoire recommandé par le fabricant et optimisé pour notre étude. Le programme de température utilisé est le suivant : augmentation de la température de 0 à 200 °C pendant 20 min, maintien à 200 °C pendant 10 min puis refroidissement pendant 20 min.

Le cadmium en solution est dosé par spectrométrie d'absorption atomique à flamme (Varian SpectrAA 220, Varian, France) avec une flamme air/acétylène oxydante et une gamme d'étalonnage comprise entre 100 et 800 $\mu\text{g. L}^{-1}$. Lorsque la concentration en cadmium est inférieure à 100 $\mu\text{g. L}^{-1}$ (limite de détection de l'appareil), le métal est dosé par spectrométrie d'absorption atomique à four graphite (Varian SpectrAA 880Z, Varian, France) avec un four à tube de graphite avec plateforme, un modificateur PdNO_3 à 1g. L^{-1} et une correction « effet Zeeman ». La gamme d'étalonnage de cadmium est alors comprise entre 10 et 80 $\mu\text{g. L}^{-1}$. Pour les 2 spectromètres, l'intensité de la lampe est de 4 mA et la longueur d'onde pour le cadmium est de 228,8 nm.

VI. Utilisation des microréseaux à oligonucléotides

1. Extraction des ARN totaux

Les parties aériennes ou les racines sont réduites en poudre au mortier dans de l'azote liquide. Une quantité de 100 mg de poudre est homogénéisée avec 1 mL de TRIzol® (TRIzol® Reagent, Invitrogen Life Technologies, Etats-Unis) à température ambiante pendant 15 min. A ce mélange sont ajoutés 0,2 mL de chloroforme. Les tubes sont ensuite agités vigoureusement, incubés à 30 °C pendant 3 min puis centrifugés à 4 °C et 12 000 g pendant 15 min. La phase aqueuse supérieure (0,6 mL) contenant les ARN est mélangée avec 0,6 mL d'isopropanol. Après une incubation de 10 minutes à 30 °C, les tubes sont centrifugés à 4 °C et 12 000 g pendant 10 min. Le surnageant est éliminé puis le culot contenant les ARN est lavé deux fois avec 1 mL d'éthanol à 70 %. Entre chaque lavage, le culot est précipité par

centrifugation à 7 000 g et 4 °C pendant 5 min. Le culot est ensuite séché sous vide puis solubilisé dans 20 µL d'eau stérile contenant 0,1 % (v/v) de diéthylpyrocarbonate.

2. Visualisation des ARN totaux sur gel d'agarose

La migration des ARN totaux (2 µL par échantillon) est réalisée sur des gels de 100 mL composés de TRIS-Base (4,84 g. L⁻¹), d'acide acétique à 90 % (1,268 ml. L⁻¹), d'EDTA (744 mg. L⁻¹) et de 0,8 g d'agarose (Invitrogen Life Technologies, Etats-Unis). Le mélange est chauffé jusqu'à dissolution de l'agarose puis 2 µL de bromure d'éthydium sont ajoutés. Lorsque le gel d'électrophorèse est coulé et solidifié, les ARN totaux sont déposés dans des puits et la migration est réalisée pendant 10 min à 200 V. Les ARN ribosomiques (28S et 18S) sont visualisés sous UV et photographiés.

3. Dosage des ARN totaux par Agilent 2100 Bioanalyzer

Les ARN totaux (1,5 µL) sont traités selon le protocole fourni par le kit RNA 6000 Nano Assay (Invitrogen life technologies, Invitrogen Corporation, Californie, Etats-Unis). Les échantillons d'ARN sont marqués au fur et à mesure de leur séparation par une molécule fluorescente (cyanine 5) qui est détectée par le scanner 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Etats-Unis). La qualité et la quantité des ARN sont déterminées grâce au logiciel « 2100 Expert Software » (Agilent Technologies, Etats-Unis).

4. Présentation et préparation du microréseau à oligonucléotides

Le microréseau est constitué d'une lame de verre recouverte de SuperAmine (Corning, USA) sur laquelle sont fixés sous forme de spots, des oligonucléotides de 70-mères spécifiques des 26 090 gènes d'*Arabidopsis thaliana* (High Density DNA microarray Qiagen-Operon Arabidopsis Genome Oligo Set, Allemagne). Les microréseaux ont été achetés auprès du Docteur Galbraith (Université d'Arizona, Etats-Unis, galbraith@arizona.edu) et peuvent se conserver à l'abri de la lumière à température ambiante pendant un an. Au moment de leur utilisation, il est nécessaire de traiter les lames afin de fixer de façon covalente les oligonucléotides sur le support. Ce traitement consiste en une succession de trois cycles d'hydratation réalisés à la vapeur d'eau à 65 °C (5 sec) et 50 °C (10 sec) et en une fixation par rayonnement ultraviolet d'une énergie de 120 mJ délivrés par le « cross linker » (Stratalinker, Amersham Biosciences, Grande-Bretagne).

5. Marquage des ARN messagers et hybridation des lames

Les ARN totaux (5 µg par échantillon) sont traités selon le protocole fourni par le kit Pronto!*Plus* System 4 (Promega Corporation-corning Incorporated, Etats unis). Ce traitement consiste en la synthèse d'ADN complémentaires qui sont marqués avec des N-hydroxysuccinimidyl (NHS) esters de cyanine3 (Cy3) ou cyanine5 (Cy5) directement à partir d'ARN totaux (figure 22). L'utilisation de ces deux fluorochromes permet de marquer différemment deux populations d'ADNc, c'est-à-dire une population témoin et une autre résultant d'un traitement particulier (ici, l'exposition au cadmium).

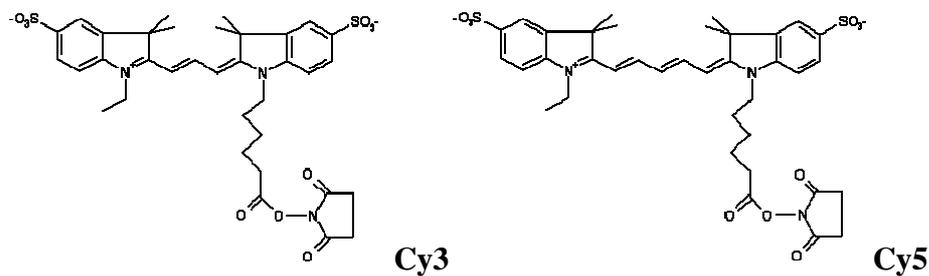


Figure 22. Formules semi développées des NHS esters de cyanines 3 et 5 (<http://www.pasteur.fr/ip/easysite/go/03b-000011-018/recherche/plates-formes-technologiques/technopole-de-l-institut-pasteur/genopole/pf/pf2-puces-a-adn/protocoles>).

Les enzymes, les amorces (oligo dT), les marqueurs fluorescents et les différentes solutions d'élution et de lavage sont fournis avec le kit. Les oligo dT s'hybrident sur les queues poly A des ARN messagers et servent d'amorces à la polymérisation par la transcriptase inverse. L'ADNc obtenu et marqué au niveau des cytosines, est purifié avec un kit de purification d'ADNc (Amersham Biosciences, Grande-Bretagne). Un contrôle de la synthèse d'ADNc et de l'incorporation des cyanines est réalisé après purification de l'ADNc marqué. Il consiste à mesurer l'absorbance ou densité optique (DO) et à calculer la quantité d'ADNc marqué (ng) et de cyanine incorporée (pmol). Ces quantités servent ensuite à calculer la fréquence d'incorporation (FI) des cyanines à l'ADNc (nombre de nucléotides marqués par 1 000 nucléotides d'ADNc). La DO de l'ADNc est mesurée à 260 nm, celle de la cyanine 3 à 550 nm et celle de la cyanine 5 à 650 nm. Les quantités requises par le fabricant pour une hybridation optimale sont indiquées dans le tableau 13. L'ADNc entrant dans la gamme des fréquences d'incorporation est ensuite mélangé à la solution d'hybridation, laquelle est réalisée selon le protocole fourni avec le kit. Le mélange d'hybridation est ensuite déposé entre lame (portant les oligonucléotides) et lamelle afin qu'il s'hybride aux sondes

oligonucléotidiques. Afin d'éliminer les liaisons non spécifiques, les lames sont lavées avec les trois solutions de lavage fournies avec le kit puis scannées.

Tableau 13. Fréquences d'incorporation de l'ADNc et quantités de cyanines requises pour un échantillon initial d'ARN totaux de 5 µg.

	Quantité d'ADNc (ng)	Quantité de cyanine incorporée (pmol)	Fréquence d'incorporation
Cyanine 3	1 200 - 2 400	100 - 170	20 - 35
Cyanine 5	900 - 2 400	45 - 120	12 - 25

Les quantités d'ADNc marqué et de cyanines incorporées sont calculées à partir des équations suivantes :

$$\text{Quantité d'ADNc marqué (ng)} = DO_{260 \text{ nm}} \times 37 \times \text{volume total } (\mu\text{L}).$$

$$\text{Quantité de Cy3 incorporée} = DO_{550 \text{ nm}} \times \text{volume total } (\mu\text{L}) / 0,15.$$

$$\text{Quantité de Cy5 incorporée} = DO_{650 \text{ nm}} \times \text{volume total } (\mu\text{L}) / 0,25.$$

La fréquence d'incorporation (FI) de chaque cyanine est calculée à partir de l'équation suivante :

$$FI = \text{quantité de cyanine incorporée} \times 324,5 / \text{quantité d'ADNc (ng)}.$$

6. Analyse des données

6.1. Obtention de l'image

Le scanner (MWG SA Biotech, France), couplé à un photomultiplicateur (PMT), contient deux lasers qui permettent d'exciter les deux cyanines à des longueurs d'onde différentes : 532 nm pour la Cy3 et 635 nm pour la Cy5. Celles-ci absorbent alors l'énergie émise par le laser et émettent des photons qui sont captés par le PMT. Les longueurs d'onde d'émission sont de 568 nm pour la Cy3 et de 668 nm pour la Cy5. Le PMT convertit les photons en signal électrique et amplifie ce dernier. Le résultat est obtenu sous forme d'une image constituée de spots dont l'intensité lumineuse est proportionnelle à l'intensité de fluorescence incorporée. Les images traitées par le logiciel GSM 418 Array Scan (MWG SA Biotech, France) sont superposées et directement visualisées : en vert pour le marquage à la Cy3, en rouge pour le marquage à la Cy5 et en jaune pour les deux marquages.

6.2. Traitement des données

Les images sont ensuite traitées à l'aide du logiciel GenePix (Molecular Devices, Etats-Unis). Elles sont superposées (cyanine 3 et cyanine 5) et le logiciel définit une grille qui prend en compte le diamètre des spots (160 μm), la distance entre les lignes et les colonnes (160 μm) et le nombre total de spots. Ainsi en comparant les deux conditions (témoin et traitement au cadmium), une image est obtenue avec des spots éclairés en 65 535 niveaux de gris et qui sont visualisés artificiellement en vert si le gène du lot marqué à la cyanine 3 est davantage exprimé, en rouge si le gène du lot marqué à la cyanine 5 est davantage exprimé ou en jaune lorsque le gène est exprimé de manière similaire dans les deux lots comparés.

Le logiciel GenePix fournit un tableau regroupant des données brutes qui comprend 57 colonnes correspondant aux différents paramètres des spots (intensités, bruits de fond, ratio d'expression, ...) et 31 240 lignes correspondant aux gènes précédés d'une annotation concernant leur fonction. Le nombre de lignes (31 240) est supérieur aux 26 090 gènes d'*Arabidopsis thaliana* car plusieurs spots servent de contrôles :

- certains oligonucléotides sont représentés en plusieurs exemplaires sur la lame,
- certaines cases sont notées comme vides car sans oligonucléotides fixés (contrôle d'hybridation non spécifique),
- certaines cases présentent des oligonucléotides ne pouvant pas s'hybrider avec des gènes d'arabette car ils sont spécifiques d'autres espèces biologiques (spots notés « alien »).

Les résultats sont normalisés par rapport à la médiane d'intensité de chaque cyanine pour l'ensemble des spots de la lame. Le logiciel GenePix permet ensuite d'éliminer les spots non exploitables en attribuant des codes (« flag ») : un code 0 indique que le spot est validé pour la suite de l'analyse et les codes 25, 75 et 100 indiquent que les données ne sont pas exploitables pour différentes raisons : case vide (code 25), spot non détecté (code 75) et spot non validé (code 100) pouvant être lié à un bruit de fond fort, une mauvaise hybridation... Après élimination des spots incorrects, ceux pour lesquels les intensités de marquage sont inférieures à 300 sont éliminés car cette valeur est considérée comme le niveau minimal de validité (Lin, 2004).

Dans la littérature, les gènes surexprimés ou surexprimés d'au moins un facteur 1,5 ou 2 sont considérés comme réellement modifiés par rapport à la condition de référence, laquelle correspond ici aux plantules non exposées au cadmium. Nous avons fixé le seuil à 1,5 pour

l'analyse (Kovalchuk *et al.*, 2005 ; Liu *et al.*, 2009). Les résultats obtenus correspondent à la moyenne de 4 expériences d'hybridation différentes pour les racines et autant pour les parties aériennes. Dans les deux cas, ces 4 expériences proviennent de deux expériences biologiques indépendantes. Pour chaque expérience biologique, deux microréseaux ont donc été utilisés : l'un après avoir marqué le lot témoin à la cyanine 3 et le lot traité au cadmium à la cyanine 5 et l'autre en réalisant le marquage inverse. Cette démarche évite ainsi d'éventuelles erreurs d'interprétation dues à une incorporation de départ plus importante d'une cyanine (Cy3) par rapport à l'autre.

VII. RT-PCR quantitative en temps réel

1. Rétro-transcription

La rétro-transcription des ARN est effectuée avec le kit High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Etats-Unis) selon le protocole du fournisseur, à partir de 1 µg d'ARN totaux (extraits de la même manière que les ARN totaux utilisés pour les microréseaux à oligonucléotides).

2. PCR quantitative en temps réel

2.1. Test d'efficacité des amorces et amplification

Les séquences d'amorces des gènes d'intérêt et des gènes constitutifs ont été sélectionnées grâce au logiciel Primer ExpressTM (Applied Biosystems, Etats-Unis) et sont présentées dans les tableaux 14 et 15. Les gènes constitutifs permettent la normalisation des résultats. Ils ont été choisis parmi ceux proposés par Remans *et al.* (2008).

Tableau 14. Gènes d'intérêts, séquences des amorces et taille des produits amplifiés (en nombre de paires de bases).

Protéine codée	Locus	Amorce sens (5'-3')	Amorce antisens (5'-3')	Taille du produit amplifié (pb)
Phytochélatine synthase 1 PCS1	At5g44070	TGCTGCTGCAAAGGCTTGT	GACCTTTGATGCATTTACGC	101
Phytochélatine synthase 2 PCS2	At1g03980	GTTGCGAGCCGCTTGAATA	TGTGCGGAAAGCTTCGACTT	101
Glutamylcystéine synthétase GSH1	At4g23100	TCAGGAAGTTTCGTGCTGGTC	CATGCTGAGAAATCCGTTTGG	101
Glutathion synthétase GSH2	At5g27380	TGGTGCTTACCTCAGGAGCAA	TCCAAAACCAGCTGCAACG	112

Tableau 15. Gènes constitutifs, séquences des amorces et taille des produits amplifiés (en nombre de paires de bases).

Protéine codée	Locus	Amorce sens (5'-3')	Amorce antisens (5'-3')	Taille du produit amplifié (pb)
Protéine à domaine F-Box	At5g15710	TTTCGGCTGAGAGGTTTCGAGT	GCACAACCGGAAATCCAAGAC	124
Protéine de mitose YLS8	At5g08290	GTTGATCAGTCGATTCTGGCC	AACAGACGCAAGCACCTCATC	105
Protéine de la famille SAND	At2g28390	CGCTCAGGCCTTTTTCAT	AGGCGTACCCTGCAATCTTTG	114

La PCR quantitative en temps réel est effectuée dans des plaques de 96 puits (Applied Biosystems, Etats-Unis). Dans chaque puits est déposé un mélange constitué de 0,7 μL de chaque amorce (sens et anti-sens) à 7,5 pmol. μL^{-1} , 8,75 μL de solution tampon contenant du SYBR Green[®] (SYBR Green[®] PCR Master Mix, Molecular Probes[®], Invitrogen Life Technologies, Etats-Unis), 2,35 μL d'eau ultra pure et 5 μL de l'échantillon d'ADNc à analyser. Le [2-[N-(3-diméthylaminopropyl)-N-propylamino]-4-[2,3-dihydro-3-méthyl-(benzo-1,3-thiazol-2-yl)-méthylidène]-1-phényl-quinolinium]⁺ ou SYBR Green[®], est un agent intercalant se liant aux acides nucléiques double brin (figure 23). L'intensité de fluorescence émise par cette molécule est proportionnelle à la quantité d'ADNc et donc au niveau d'expression des gènes étudiés.

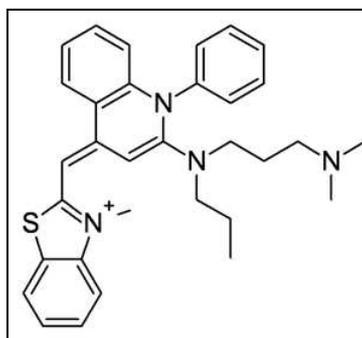


Figure 23. Formule semi développée du SYBR Green[®] (<http://www.com.univ-mrs.fr/PRECYM/spip.php?article24>).

Pour chaque couple d'amorces, 5 dilutions d'ADNc ont été testées (10^{-1} à 10^{-5} M). La plaque est scellée à l'aide d'un film plastique, le contenu de chaque puits est mélangé au vortex et le tout est centrifugé pendant quelques secondes à 10 000 g. Les ADNc sont ensuite amplifiés par PCR dans un détecteur de séquence (7900HT Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems, Etats-Unis) relié à un logiciel d'analyse (logiciel SDS 2.2.2., Applied

Biosystems). La dilution offrant une meilleure efficacité pour l'ensemble des gènes (10^{-3} M) a été retenue pour l'amplification. Les conditions de cycles d'amplification sont : 95 °C pendant 10 minutes (dénaturation initiale) puis 40 cycles comprenant chacun 15 sec à 95 °C puis 1 min à 60 °C (hybridation et élongation).

2.2. Traitement des données

Les résultats obtenus sont traités avec un second logiciel (Real-Time StatMiner, Integromics) et exprimés en Ct (Cycle Threshold) qui sont les valeurs de cycle correspondant au dépassement du signal seuil. Il existe une relation linéaire entre la quantité de molécules cibles présentes initialement dans l'échantillon et le Ct obtenu. L'analyse des résultats par le logiciel Real-Time StatMiner pour les gènes constitutifs a conclu à la sélection du gène SAND comme référence la plus stable pour la suite des calculs. Par ailleurs, les formules de calcul nécessitant un calibrateur, nous avons utilisé les valeurs fournies par les feuilles témoin pour l'exploitation des calculs sur les lots de racines et les valeurs des racines témoins pour les calculs sur les lots de feuilles.

Les formules de calculs sont les suivantes :

$$\text{Valeur du gène d'intérêt} = 2^{-(\text{Ct gène intérêt} - \text{Ct calibrateur})}$$

$$\text{Valeur du gène de référence} = 2^{-(\text{Ct référence} - \text{Ct calibrateur})}$$

$$\text{Facteur d'induction} = \text{valeur du gène d'intérêt} / \text{valeur du gène de référence.}$$

Les valeurs obtenues pour les témoins ont ensuite été ramenées à 1 (moyenne de normalisation) et celles pour les échantillons traités au cadmium ont été modifiées en conséquence (Herbette *et al.*, 2006).

VIII. Analyses statistiques

Le traitement statistique des différentes données a été effectué à partir du logiciel libre PAST (PAleontological STatistics, <http://folk.uio.no/ohammer/past>) développé au départ pour la paléontologie mais utilisé depuis dans de nombreuses disciplines.

Les résultats ont été traités par analyse de la variance à un facteur (one-way ANOVA) et par un test de Tukey (pour la comparaison de paires de moyennes) avec un seuil de confiance de 95 % ($p < 0,05$).

Pour les microréseaux à oligonucléotides et la RT-PCR quantitative en temps réel, un test t (avec un seuil de confiance de 95 %) a été effectué par rapport à la moyenne de normalisation.

Résultats

RÉSULTATS

I. Effet du cadmium sur la croissance et le développement

1. Effets sur la germination d'*Arabidopsis thaliana*

Les tests de germination réalisés sur des milieux contenant 0 à 500 μM de cadmium montrent une diminution du taux de germination en fonction des concentrations croissantes en métal (figure 24). La diminution du taux de germination est significative à partir de 100 μM de cadmium avec une germination de 47,7 % des graines contre 83,8 % pour le témoin. Avec 500 μM de cadmium, le taux de germination chute à 16,6 %.

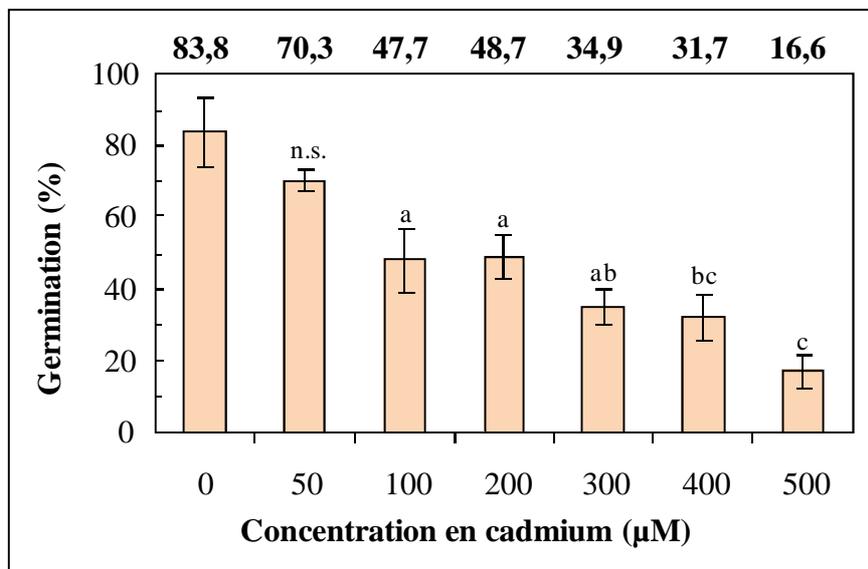


Figure 24. Taux de germination des graines en fonction de la concentration en cadmium du milieu après 5 jours d'exposition. Les moyennes (indiquées en haut de la figure) correspondent à 3 expériences indépendantes avec 3 boîtes chacune contenant environ 200 graines. L'analyse statistique a été réalisée par analyse de la variance à un facteur (one-way ANOVA) et par un test de Tukey. Les lettres différentes entre deux moyennes correspondent à une différence significative ($p < 0,05$) et n.s. correspond à une différence non significative.

Les graines ayant germé sur des milieux enrichis en cadmium ont cependant généré des plantules avec un développement ralenti lorsque les concentrations augmentent (figure 25). En effet, à partir de 100 μM la surface des feuilles est visiblement réduite et une concentration de 500 μM n'engendre plus que l'émergence d'une racicule pour les 16,6 % de graines ayant germé. Un maintien des boîtes 5 jours supplémentaires en chambre de culture ne

permet pas aux graines ayant germé sur 500 μM de cadmium de développer des organes aériens. De plus, à partir de 300 μM , les feuilles produites sont plus claires, ce qui suggère une diminution de la production de chlorophylles et / ou une altération des pigments produits.

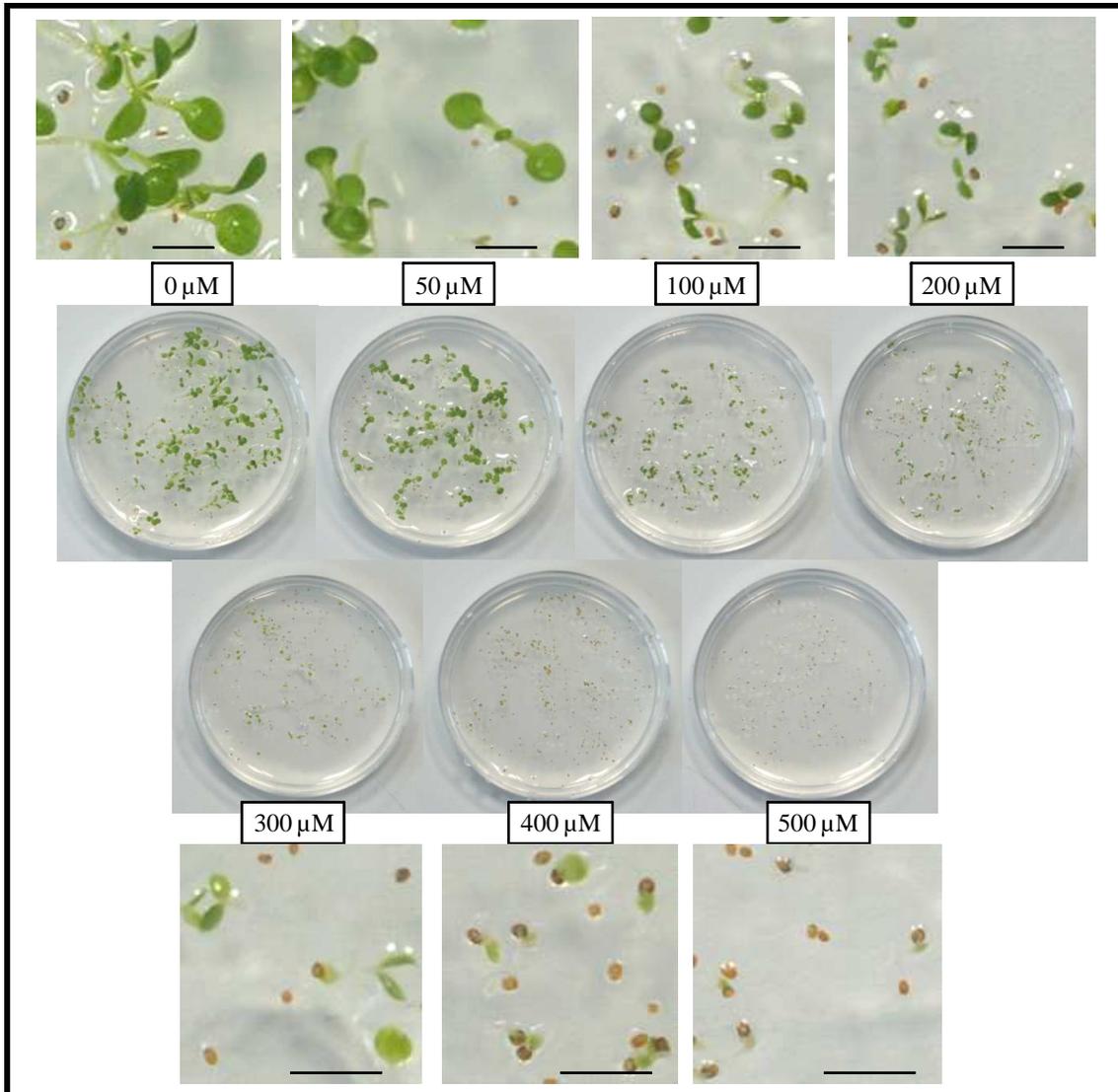


Figure 25. Germination en fonction de la concentration en cadmium (en μM) du milieu après 5 jours de traitement. Les barres d'échelle correspondent à de 2,5 mm.

La germination de graines directement sur milieu enrichi en cadmium montre que : 1) le taux de germination ainsi que la surface des feuilles diminuent de manière dose-dépendante à partir de 100 μM , 2) la teneur en chlorophylles semble réduite à partir de 300 μM , 3) les quelques plantules ayant germé avec 500 μM de cadmium ne produisent pas de parties aériennes. Pour la suite des expériences, nous avons donc transféré des plantules, et non plus

des graines, sur différents milieux enrichis en cadmium afin de voir si ces plantules étaient capables de tolérer de plus fortes concentrations en métal.

2. Effets sur la croissance et le développement d'*Arabidopsis thaliana*

2.1. Détermination de la dose létale

Dans un premier temps, quatre concentrations en cadmium (0,5, 1, 2 et 5 mM) ont été testées de manière à déterminer la dose létale sur des plantules âgées d'une semaine et transférées sur cadmium. Avec 0,5 mM de cadmium, la surface foliaire est visiblement réduite par rapport au témoin mais les feuilles restent vertes (figure 26).

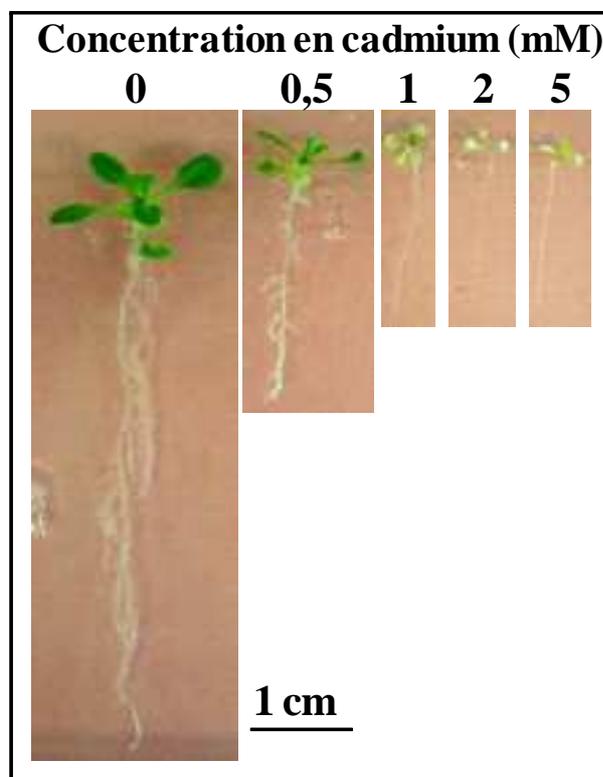


Figure 26. Effet du cadmium sur la croissance de plantules âgées d'une semaine et transférées pendant une semaine sur un milieu enrichi en cadmium (de 0 à 5 mM).

Au-delà de cette concentration, l'exposition au métal provoque une dépigmentation de plus en plus forte. Les feuilles ont en effet une coloration verdâtre à 1 mM et deviennent totalement blanches à partir de 2 mM. Le nombre de feuilles produites diminue également. En effet, au moment du transfert sur de nouveaux milieux, les plantules possèdent 2 feuilles. Après une semaine supplémentaire, le nombre de feuilles est de 8 chez les témoins mais seulement de 6 pour les plantules traitées avec 0,5 ou 1 mM de cadmium. A des doses

supérieures en métal (2 ou 5 mM), le nombre de feuilles n'est plus que de 3 ou 4, ce qui indique un fort ralentissement de croissance et de l'organogénèse foliaire.

Le système racinaire est aussi perturbé de manière visible dès le traitement avec 0,5 mM de cadmium (figures 26 et 27). En effet, la longueur de la racine principale est réduite d'un facteur 3 par rapport aux témoins et les racines secondaires sont beaucoup plus petites. Au-delà de 1 mM de cadmium, les plantules ne présentent plus qu'une racine principale visible dont la longueur n'est pas significativement différente de celle des plantules au moment du transfert. Un traitement au cadmium supérieur ou égal à 1 mM provoque donc un arrêt de croissance de la racine principale.

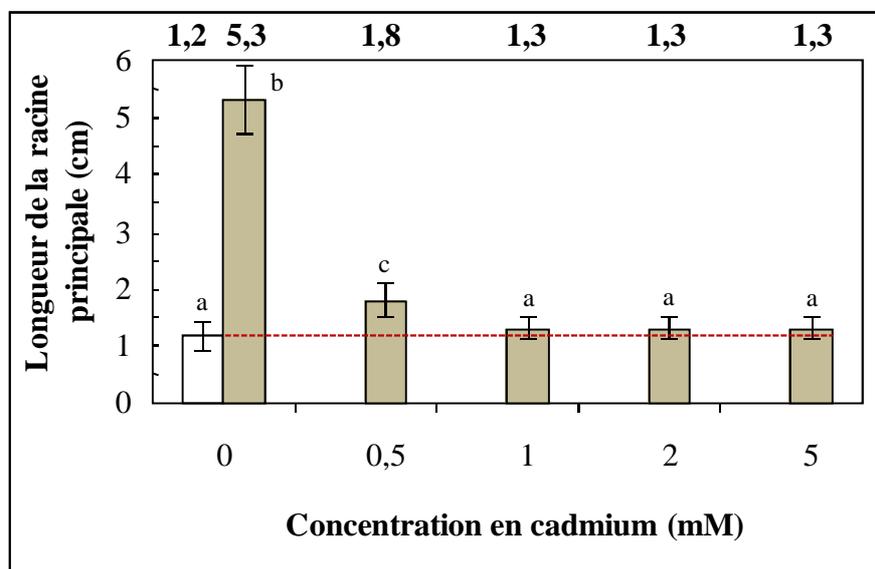


Figure 27. Effet du cadmium sur la longueur de la racine principale de plantules âgées d'une semaine (en blanc) et transférées pendant une semaine sur milieu enrichi en cadmium (en gris). Les résultats correspondent à la moyenne (indiquée en haut de la figure) de 3 expériences indépendantes réalisées chacune avec 5 plantes. L'analyse statistique a été réalisée par analyse de la variance à un facteur (one-way ANOVA) et par un test de Tukey. Les lettres différentes entre deux moyennes correspondent à une différence significative ($p < 0,05$).

Au bout d'une semaine de traitement au cadmium, la dose létale pour les plantules se situe donc vers 1 mM. En effet, à partir de cette concentration, les plantules ont une croissance stoppée au niveau de leur racine principale dont la longueur moyenne est similaire à celle des plantules au moment du transfert. De plus, les feuilles perdent leur pigmentation, ce qui traduit une altération forte du contenu en chlorophylles et par conséquent de l'activité photosynthétique.

2.2. Sélection de la concentration maximale

Les plantules présentant des dommages sévères à partir de 1 mM de cadmium, une gamme de concentrations inférieures allant de 0 à 500 μM de cadmium a donc été testée afin de déterminer la concentration maximale en métal qui permet la survie de la plante sans entraîner de fortes altérations foliaires ou une inhibition du développement des racines secondaires.

2.2.1. Croissance des parties aériennes

A 50 et 100 μM de cadmium, les feuilles ont un développement similaire à celui des plantules témoins comme le montre la figure 28. La pesée des masses fraîches confirme ces observations car les différences par rapport aux témoins ne sont pas significatives (figure 29). Par contre, la masse fraîche diminue avec des concentrations supérieures : elle est réduite d'environ 40 % avec 200 μM de cadmium et de moitié avec 500 μM . Cette diminution peut s'expliquer par la réduction de la surface foliaire ainsi que le nombre de feuilles à partir de 400 μM (figure 28).

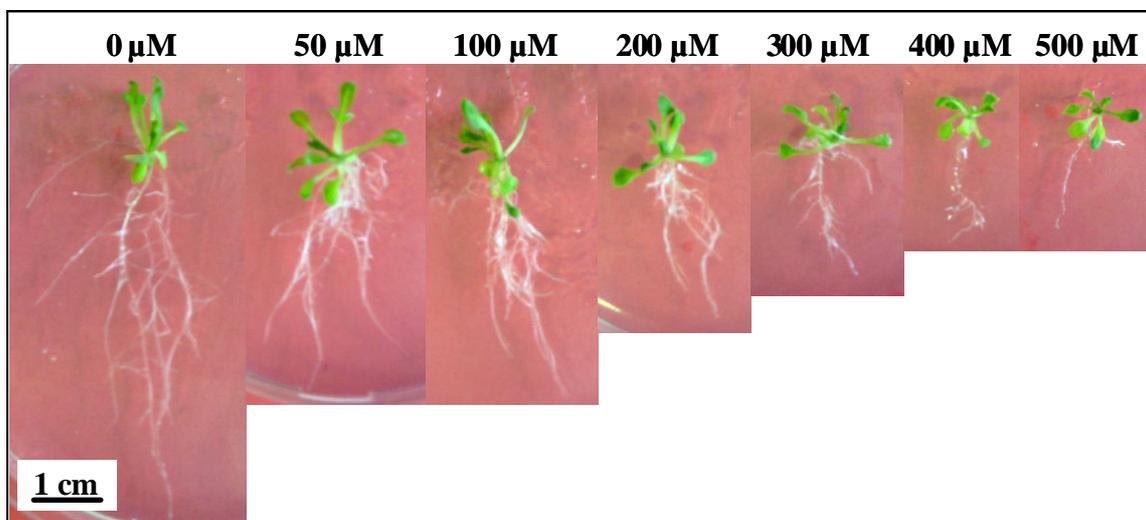


Figure 28. Croissance et développement des plantules après une semaine sur milieu contenant 0 à 500 μM de cadmium. Les graines ont été préalablement mises à germer pendant une semaine sur un milieu sans cadmium puis les plantules ont été transférées sur des milieux contenant ou non le métal.

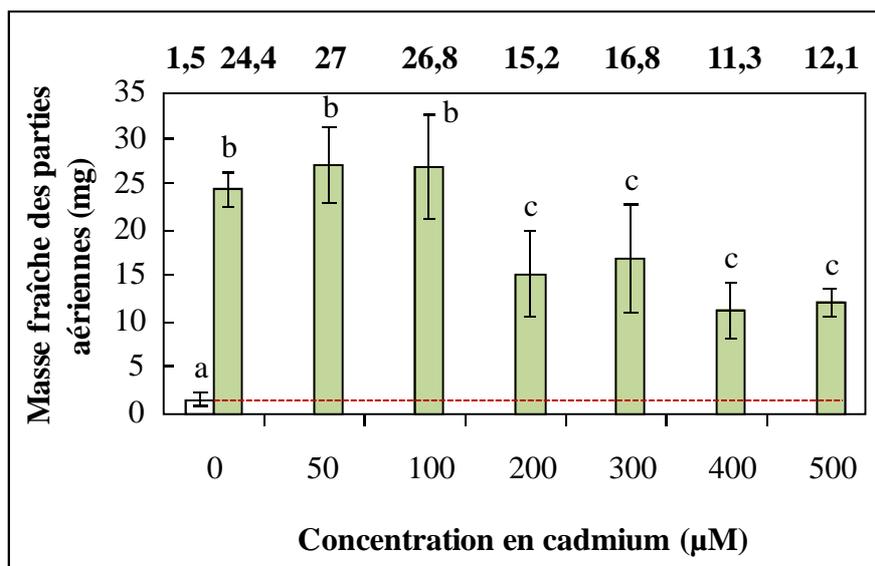


Figure 29. Effet du cadmium sur la masse fraîche des parties aériennes de plantules âgées d'une semaine (en blanc) et transférées pendant une semaine sur milieu enrichi en cadmium (en vert). Les résultats correspondent à la moyenne (indiquée en haut de la figure) de 3 expériences indépendantes réalisées chacune sur 5 plantes. L'analyse statistique a été réalisée par analyse de la variance à un facteur (one-way ANOVA) et par un test de Tukey. Les lettres différentes entre deux moyennes correspondent à une différence significative ($p < 0,05$).

2.2.2. Croissance racinaire

2.2.2.1. Biomasse

Les pesées de masse fraîche du système racinaire révèlent qu'en présence de 50 ou 100 µM de cadmium, les différences ne sont pas significatives par rapport aux témoins (figure 30). A des concentrations supérieures, la masse fraîche est significativement réduite avec une diminution d'environ 55 % en présence de 200 et 300 µM de cadmium et une diminution de 78 à 89 % pour les concentrations de 400 et 500 µM respectivement.

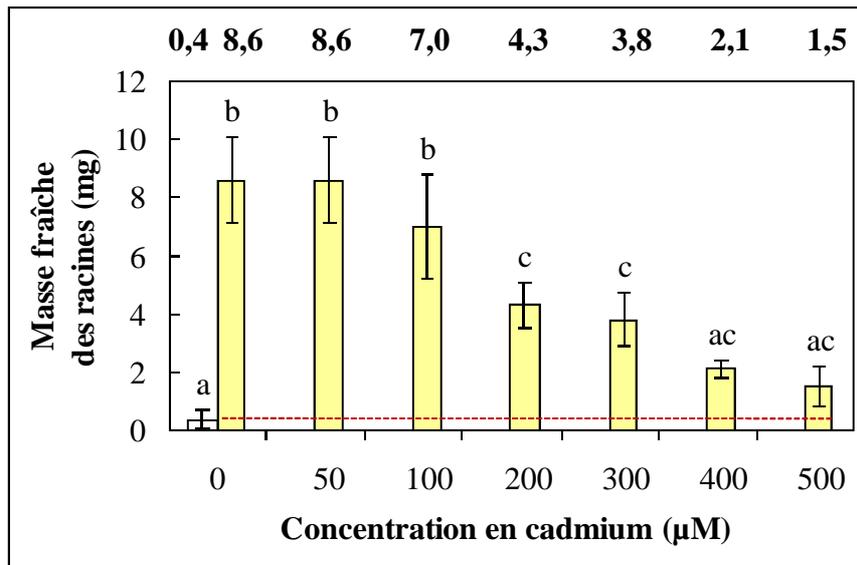


Figure 30. Effet du cadmium sur la masse fraîche de l'appareil racinaire de plantules âgées d'une semaine (en blanc) et transférées pendant une semaine sur milieu enrichi en cadmium (en jaune). Les résultats correspondent à la moyenne (indiquée en haut du tableau) de 3 expériences indépendantes réalisées chacune sur 5 plantes. L'analyse statistique a été réalisée par analyse de la variance à un facteur (one-way ANOVA) et par un test de Tukey. Les lettres différentes entre deux moyennes correspondent à une différence significative ($p < 0,05$).

2.2.2.2. Longueur de la racine principale

A 50 et 100 μM de cadmium, les racines principales et secondaires sont bien développées mais plus courtes que celles des témoins, ce qui donne un aspect plus dense au système racinaire (figure 28). La réduction de la longueur des racines devient de plus en plus forte en fonction de la dose de métal appliquée. La racine principale des plantules est significativement réduite par rapport au témoin dès une concentration de 50 μM avec une longueur qui passe de 5,3 à 4,1 cm (figures 28 et 31). La concentration de 100 μM de cadmium ne montre pas d'effet plus important par rapport à 50 μM car la longueur de la racine principale reste inchangée. En revanche, au delà de 100 μM , la longueur de la racine diminue fortement pour passer de 3,1 cm pour la concentration 200 μM à 1,8 cm en réponse à 500 μM de cadmium.

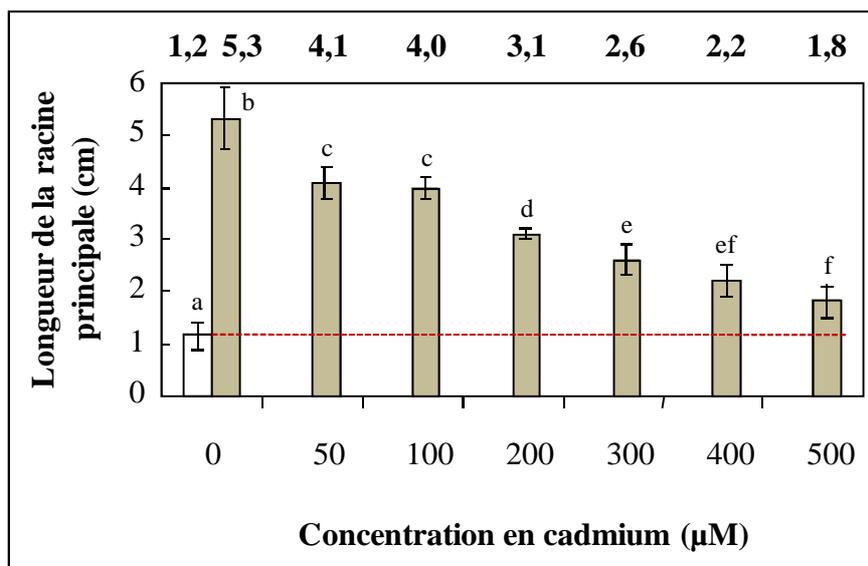


Figure 31. Effet du cadmium sur la longueur de la racine principale de plantules âgées d'une semaine (en blanc) et transférées pendant une semaine sur milieu enrichi en cadmium (en gris). Les résultats correspondent à la moyenne (indiquée en haut de la figure) de 3 expériences indépendantes réalisées chacune sur 5 plantes. L'analyse statistique a été réalisée par analyse de la variance à un facteur (one-way ANOVA) et par un test de Tukey. Les lettres différentes entre deux moyennes correspondent à une différence significative ($p < 0,05$).

2.2.2.3. Apex racinaires et racines latérales

L'exposition des plantules d'arabette à 50 et 100 µM de cadmium entraîne une modification au niveau des apex racinaires, aussi bien au niveau de la racine principale que des racines latérales (figure 32). En présence de 50 µM, la zone d'élongation cellulaire n'est plus visible. En effet, la zone de différenciation où se forment les poils absorbants est située juste après la zone de division cellulaire (figure 32 D et E). En réponse à 100 µM, la zone de formation des poils absorbants n'est pas située aussi près de l'apex qu'avec 50 µM (figure 32 G et H). Cependant les cellules ont une forme irrégulière et les poils absorbants présentent souvent des malformations. Par ailleurs, la présence de cadmium dans le milieu induit la formation d'un plus grand nombre de racines latérales secondaires et tertiaires (figure 32 F et I) bien que ces racines soient plus courtes que celles des témoins (figure 32 C).

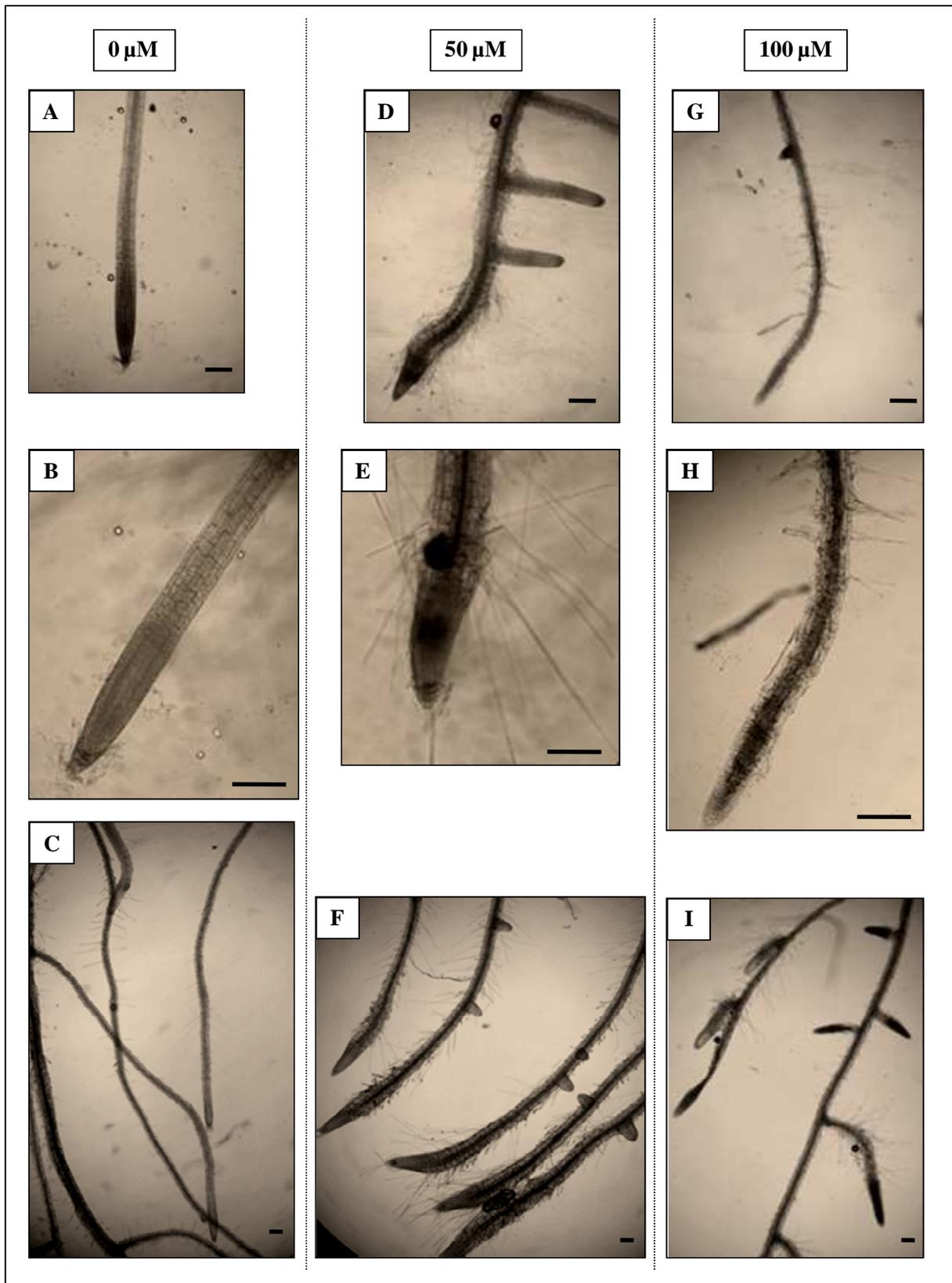


Figure 32. Morphologie des racines de plantes de 7 jours soumises pendant 7 jours à 0 μM (A, B, C), 50 μM (D, E, F) ou 100 μM (G, H, I) de cadmium. Les photos A, B, D, E, G et H correspondent à l'apex des racines principales tandis que les photos C, F et I correspondent à des racines latérales secondaires et tertiaires. Les barres d'échelle correspondent à 200 μm .

L'étude de paramètres de croissance montre que la biomasse des parties aériennes et racinaires n'est pas modifiée de manière significative en présence de 50 ou 100 μM de cadmium (en effet, la réduction de biomasse n'a été détectée qu'à partir de 200 μM de métal dans le milieu). En revanche, la racine principale et les racines latérales sont raccourcies dès l'exposition à 50 μM de cadmium et présentent une disparition (ou une déformation pour la dose de 100 μM de cadmium) de la zone d'élongation.

L'objectif étant d'utiliser la dose maximale de cadmium qui n'entraîne pas d'altération trop forte des plantules, la concentration de 100 μM a donc été sélectionnée pour la suite de l'étude.

3. Effet sur la croissance du mélèze hybride

Des plantules de mélèze âgées de 4 semaines ont été transférées pendant une semaine sur différentes concentrations en cadmium allant jusqu'à 600 μM . Cette gamme de concentration a été choisie en fonction des résultats préalablement obtenus avec l'arabette. En effet, il a été montré dans la partie précédente qu'au-delà de 500 μM , les plantules commencent à perdre leur contenu en chlorophylles. Les mélèzes ne montrant pas de phénotype différent des plants témoins jusqu'à 600 μM , deux concentrations plus fortes ont donc été testées (1 et 2 mM) et des paramètres de croissance ont été mesurés : longueur de la racine principale, masses fraîches des racines et des parties aériennes. Les résultats obtenus restent à confirmer car les expériences n'ont été réalisées qu'une seule fois.

3.1. Croissance des parties aériennes

Les résultats montrent que la masse fraîche des parties aériennes n'est pas affectée de manière significative avec 1 mM de cadmium mais diminue fortement en présence de 2 mM avec une réduction d'environ 40 % par rapport aux témoins (figure 33) et un début de jaunissement des aiguilles. En laissant les mélèzes deux semaines sur le milieu contenant 2 mM de cadmium, les aiguilles jaunissent, ce qui indique que cette concentration est létale pour les plantules.

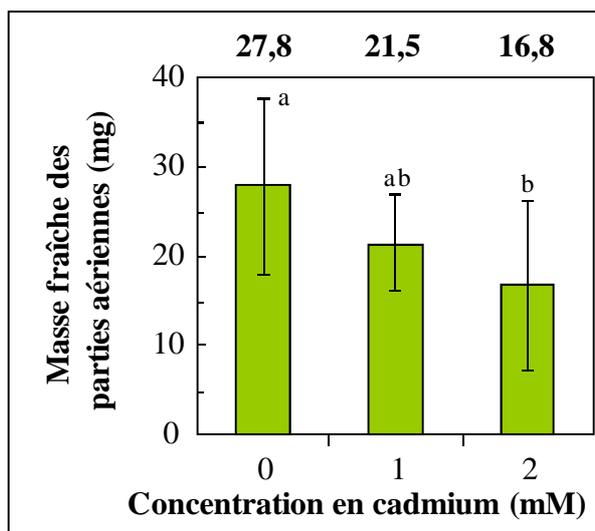


Figure 33. Effet du cadmium sur la masse fraîche des parties aériennes. Des mélèzes âgés d'un mois ont été transférés pendant 1 semaine sur des milieux contenant 0, 1 ou 2 mM de cadmium. Les résultats correspondent à la moyenne de 10 plantes par condition provenant d'une seule expérience. L'analyse statistique a été réalisée par analyse de la variance à un facteur (one-way ANOVA) et par un test de Tukey. Les lettres différentes entre deux moyennes correspondent à une différence significative ($p < 0,05$).

3.2. Croissance racinaire

Au niveau des racines, une diminution significative de la longueur des racines et de la masse fraîche racinaire est visible dès 1 mM avec des baisses respectives d'environ 60 et 30 % par rapport aux témoins (figure 34). Avec la dose de 2 mM, la longueur de la racine principale à peu près similaire à celle des racines des plantes ayant poussé sur 1 mM de cadmium. En revanche, la masse fraîche des racines continue à diminuer et ne représente plus que 6,5 mg en moyenne contre 14,7 mg pour les racines témoins.

Ces résultats préliminaires montrent que la concentration à 2 mM entraîne une forte diminution de la croissance en termes de biomasse et de longueur de la racine principale. L'objectif étant de sélectionner une dose de métal n'affectant pas de manière trop drastique les plantes (car le but est de leur faire accumuler un maximum de cadmium sans effet létal), nous avons donc utilisé une concentration intermédiaire de 1,5 mM de cadmium.

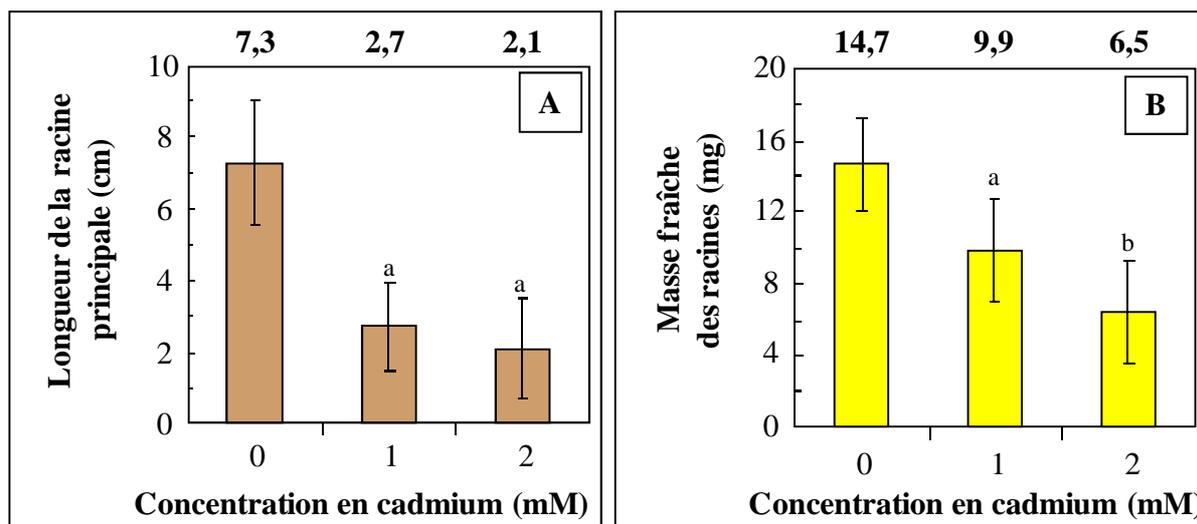


Figure 34. Effet du cadmium sur la longueur de la racine principale (A) et sur la masse fraîche des racines (B). Des mélèzes âgés d'un mois ont été transférés pendant 1 semaine sur des milieux contenant 0, 1 ou 2 mM de cadmium. Les résultats correspondent à la moyenne de 10 plantes par condition provenant d'une seule expérience. L'analyse statistique a été réalisée par analyse de la variance à un facteur (one-way ANOVA) et par un test de Tukey. Les lettres différentes entre deux moyennes correspondent à une différence significative ($p < 0,05$).

II. Effet du cadmium sur la teneur en proline et protéines solubles

1. Teneur en proline chez *Arabidopsis thaliana*

Un dosage de proline a été réalisé afin de vérifier que les plantules ne subissent pas un stress trop fort à 100 μM de Cd. En effet, la proline est un acide aminé souvent considéré comme un biomarqueur de stress (Dinakar *et al.*, 2008 ; Szabados et Saviouré, 2009). Les résultats ne montrent pas de différence significative de la teneur en proline entre les plantules témoins et les plantules cultivées sur 100 μM de cadmium (figure 35).

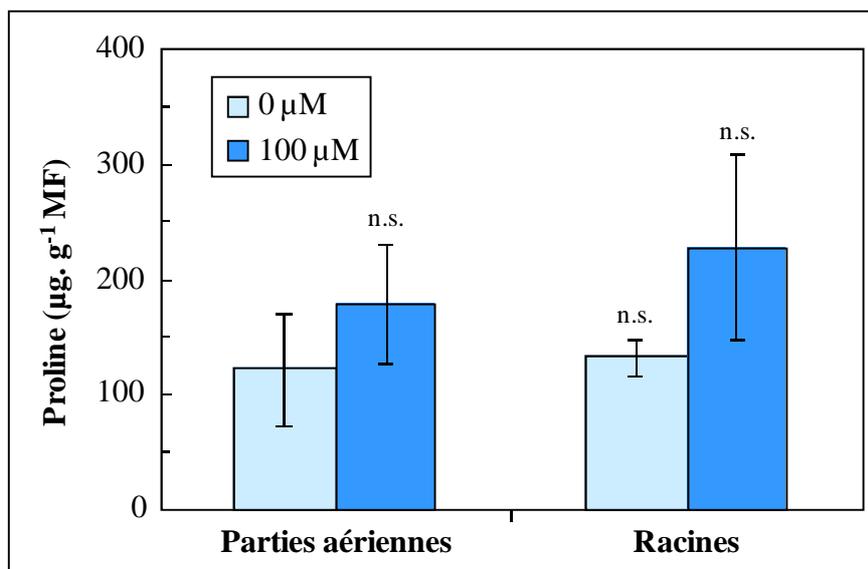


Figure 35. Effet du cadmium sur la teneur en proline (en $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ matière fraîche) des parties aériennes et des racines de plantules âgées d'une semaine et transférées pendant une semaine sur un milieu contenant $100\ \mu\text{M}$ de cadmium. Les résultats correspondent à la moyenne de 3 expériences indépendantes. L'analyse statistique a été réalisée par analyse de la variance à un facteur (one-way ANOVA) et par un test de Tukey. Les lettres différentes entre deux moyennes correspondent à une différence significative ($p < 0,05$) et n.s. correspond à une différence non significative.

Dans les conditions de culture utilisées, l'exposition au cadmium ne semble donc pas modifier de manière significative la teneur en proline. Ceci suggère que les plantules ne sont pas dans une condition de stress important et sont capables de tolérer le traitement au cadmium qui a été imposé.

2. Teneur en protéines solubles totales

2.1. Chez *Arabidopsis thaliana*

La teneur en protéines solubles totales est un test souvent utilisé pour mettre en évidence un stress chez la plante. En effet, lorsque les contraintes environnementales (stress hydrique, thermique, oxydant, exposition à une pollution, infection par des agents pathogènes...) sont fortes, la plupart des protéines subit une dénaturation (Parida *et al.*, 2004 ; Guo *et al.*, 2007 ; Mohammadkhani et Heidari, 2008 ; John *et al.*, 2009).

De la même manière que pour la teneur en proline, le traitement au cadmium n'entraîne pas de modification significative de la teneur en protéines solubles totales (figure

36). La quantité de protéines est environ deux fois plus importante dans les parties aériennes que dans les racines mais cette proportion ne varie pas en réponse à l'exposition au cadmium.

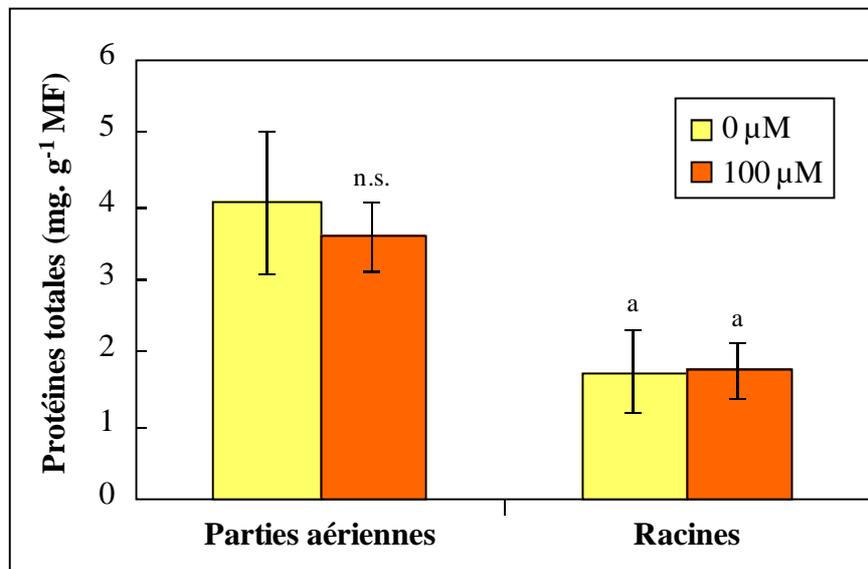


Figure 36. Effet du cadmium sur la teneur en protéines solubles totales (en mg. g^{-1} matière fraîche) des parties aériennes et des racines de plantules âgées d'une semaine et transférées pendant une semaine sur un milieu contenant $100 \mu\text{M}$ de cadmium. Les résultats correspondent à la moyenne de 3 expériences indépendantes. L'analyse statistique a été réalisée par analyse de la variance à un facteur (one-way ANOVA) et par un test de Tukey. Les lettres différentes entre deux moyennes correspondent à une différence significative ($p < 0,05$) et n.s. correspond à une différence non significative.

Dans les conditions de cultures utilisées, l'exposition au cadmium ne semble donc pas modifier de manière significative la teneur en protéines totales solubles, ce qui n'empêche pas une diminution de synthèse de certaines protéines au profit d'autres protéines de réponse au stress. Ce résultat va dans le même sens que celui obtenu pour la teneur en proline : les plantules ne sont pas dans une condition de stress important et peuvent tolérer la concentration de $100 \mu\text{M}$ de cadmium.

2.2. Chez le mélèze hybride

La concentration de 2 mM de cadmium entraînant une très forte réduction de croissance des jeunes mélèzes, une dose de $1,5 \text{ mM}$ a été testée. L'expérience n'ayant été réalisée qu'une seule fois, les résultats obtenus n'ont pas pu être traités statistiquement (figure 37).

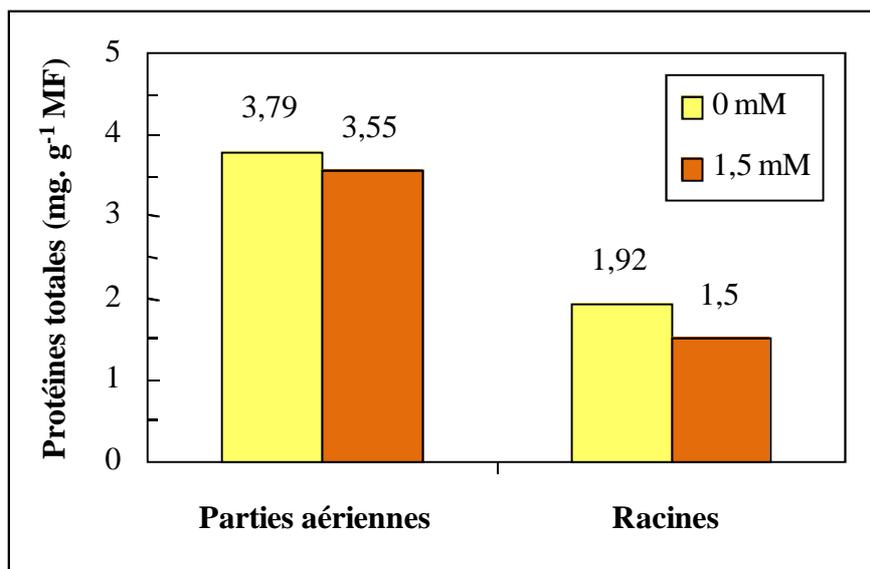


Figure 37. Effet du cadmium sur la teneur en protéines solubles totales (en $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ matière fraîche) des parties aériennes et des racines de mélèzes âgés d'un mois puis transférés pendant 1 semaine sur un milieu contenant 0 ou 1,5 mM de cadmium.

Ces résultats indiquent cependant que les teneurs en protéines sont assez proches de celles observées préalablement chez *Arabidopsis thaliana*, à la fois en termes de teneur et aussi de ratio entre parties aériennes et racines. Cependant, au niveau des racines, la teneur en protéines diminue d'environ 20 % mais ces résultats restent toutefois à confirmer.

Le traitement au cadmium ne semble donc pas avoir d'effet sur la teneur en protéines solubles totales dans les parties aériennes mais pourrait entraîner une diminution au niveau racinaire.

III. Quantité de cadmium absorbée par les plantules d'*Arabidopsis thaliana*

Pour les plantes cultivées sur 100 μM de cadmium, l'accumulation du métal est plus importante dans les racines que dans les feuilles avec des valeurs respectives de 165,5 et 113,4 μg par g de matière sèche (tableau 14). Le rapport racines / parties aériennes est de 1,46, ce qui indique que le métal reste préférentiellement stocké au niveau racinaire mais qu'il existe tout de même un transport vers les autres organes de la plante.

Tableau 16. Teneur en cadmium ($\mu\text{g. g}^{-1}$ matière sèche) présent dans des plantes âgées d'une semaine puis transférées pendant une semaine sur 0 ou 100 μM de cadmium ($11,2 \mu\text{g. g}^{-1}$ de milieu). Les résultats correspondent à la moyenne de 3 expériences indépendantes. L'analyse statistique a été réalisée par analyse de la variance à un facteur (one-way ANOVA) et par un test de Tukey. Les lettres différentes entre deux moyennes correspondent à une différence significative ($p < 0,05$).

	Concentration en cadmium dans le milieu (μM)	
	0	100 ($11,2 \mu\text{g. g}^{-1}$)
Parties aériennes	< 1	$113,4 \pm 28,4$ a
Racines	< 1	$165,7 \pm 21,0$ b

Par manque de matériel biologique, ce dosage n'a pas pu être effectué jusqu'à présent sur les mélèzes mais les analyses sont en cours et seront présentées lors de la soutenance.

IV. Effet du cadmium sur la voie de biosynthèse des phytochélatines

1. Teneurs en glutathion et en phytochélatines

1.1. Chez *Arabidopsis thaliana*

La teneur en glutathion est similaire dans les parties aériennes des plantes témoins et des plantes cultivées sur 100 μM de cadmium (figure 38). Elle est également similaire à celle retrouvée dans les racines des plantes témoins. Par contre, la teneur en glutathion dans les racines des plantes traitées au cadmium augmente considérablement car elle est multipliée par un facteur 4.

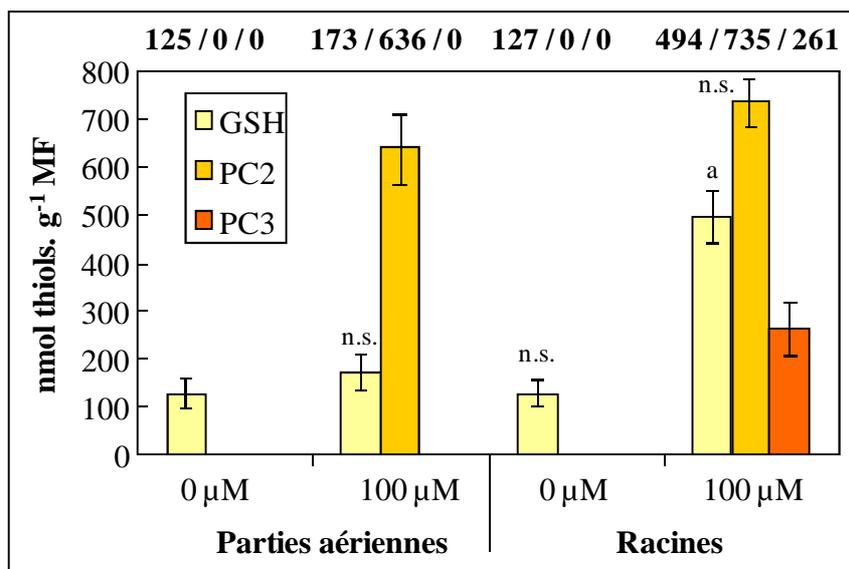


Figure 38. Teneur en glutathion (GSH) et en phytochélatines à $n = 2$ (PC2) et $n = 3$ (PC3) dans les racines et les parties aériennes en nmol de groupes thiols par g de matière fraîche (MF). Des plantes âgées d'une semaine ont été transférées pendant une semaine sur 0 ou 100 μM de cadmium. Les résultats (obtenus après passage à l'HPLC) sont exprimés en nmoles de groupes thiols par g de matière fraîche et correspondent à la moyenne (indiquée en haut de la figure) de 3 expériences indépendantes. L'analyse statistique a été réalisée par analyse de la variance à un facteur (one-way ANOVA) et par un test de Tukey. Les lettres différentes entre deux moyennes correspondent à une différence significative ($p < 0,05$) et n.s. correspond à une différence non significative.

Les phytochélatines ne sont pas détectées chez les plantes témoins alors qu'elles s'accumulent en réponse au stress métallique. En réponse au cadmium, les parties aériennes ne produisent que des phytochélatines de type 2 (PC2) à raison de 636 nmoles par g de matière fraîche. Les racines synthétisent davantage de phytochélatines que les parties aériennes, à raison de 735 nmoles de PC2 et 261 nmoles de PC3.

L'exposition au cadmium entraîne donc une production de phytochélatines qui se révèle plus importante au niveau des racines que des parties aériennes, à la fois au niveau quantitatif et au niveau qualitatif (car les parties aériennes ne contiennent que des PC2 alors que les racines synthétisent des PC2 et des PC3).

1.2. Chez le mélèze hybride

Avec 1 mM de cadmium dans le milieu, les parties aériennes sont peu affectées visuellement et ne présentent pas de jaunissement même lorsque les plantules subissent plus d'une semaine de traitement. Un dosage des thiols totaux (regroupant cystéine,

glutamylcystéine, glutathion et phytochélatines) a donc été effectué sur la concentration 1 mM de cadmium afin d'estimer si cette dose est déjà capable d'entraîner ou non une modification de la production de thiols totaux (figure 39).

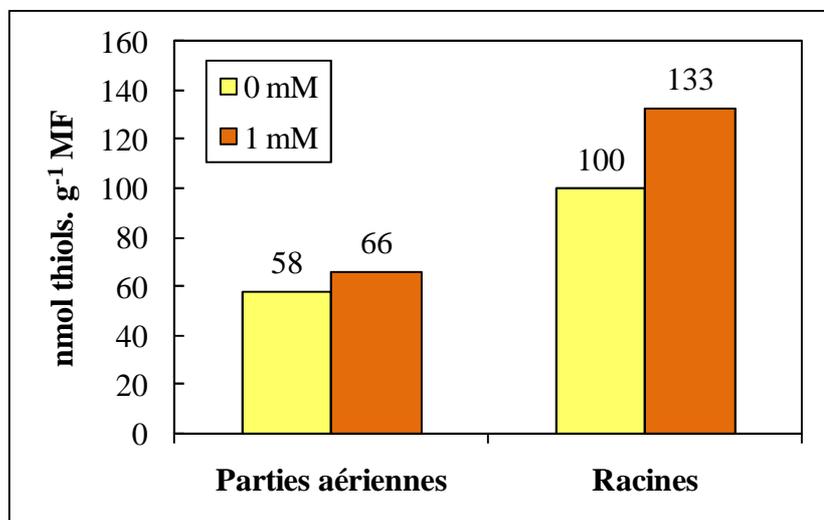


Figure 39. Effet du cadmium sur la teneur en thiols totaux (nmol. g⁻¹ matière fraîche) de mélèzes âgés d'un mois puis transférés sur 0 ou 1 mM de cadmium pendant une semaine.

Ces résultats préliminaires (réalisés une seule fois) laissent supposer que la teneur en thiols augmente légèrement mais pas de façon spectaculaire dans les racines et les parties aériennes. De plus, le rapport racines / parties aériennes reste constant avec environ 2 fois plus de groupes thiols dans les racines que dans les parties aériennes.

La concentration de 1 mM de cadmium ne provoquant pas de modification de la teneur en groupes thiols totaux, une dose de 1,5 mM a donc été testée par la suite. Les expériences réalisées avec 1,5 mM ont porté sur l'étude des activités des enzymes intervenant dans la biosynthèse des phytochélatines.

2. Régulation des enzymes de la voie de synthèse des phytochélatines

2.1 Chez *Arabidopsis thaliana*

2.1.1. La γ glutamylcystéine synthétase (GCS)

La GCS est la première enzyme de la voie de synthèse des phytochélatines. La mesure de l'activité enzymatique spécifique *in vitro* montre tout d'abord qu'il existe une activité de

base de 1,32 et de 1,91 nmoles de γ glutamylcystéine par minute et par mg de protéines dans les parties aériennes et dans les racines respectivement (figure 40). En présence de cadmium, l'activité enzymatique est stimulée dans toute la plante et plus particulièrement dans les racines où elle augmente de 125 % contre 73 % dans les parties aériennes.

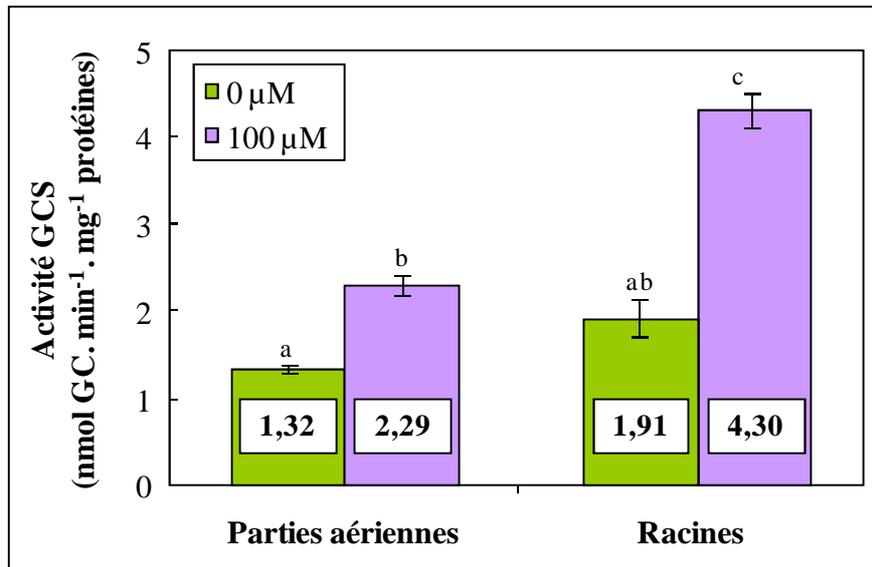


Figure 40. Activité spécifique de la GCS dans les racines et les parties aériennes en réponse au cadmium. Des plantes âgées d'une semaine ont été transférées pendant une semaine sur 0 ou 100 μ M de cadmium. Les résultats sont exprimés en nmoles de γ glutamylcystéine formée par min et par mg de protéines et correspondent à la moyenne de 3 expériences indépendantes (les moyennes sont indiquées en gras sur la figure). L'analyse statistique a été réalisée par analyse de la variance à un facteur (one-way ANOVA) et par un test de Tukey. Les lettres différentes entre deux moyennes correspondent à une différence significative ($p < 0,05$).

L'expression du gène codant la GCS (At4g23100) a été suivie afin de savoir si l'augmentation de l'activité enzymatique est corrélée à une augmentation de la transcription du gène. Deux approches ont été testées en parallèle, les microréseaux à oligonucléotides d'une part et la RT-PCR quantitative en temps réel d'autre part (voir les parties VI et VII du chapitre « Matériels et méthodes »). L'expression du gène n'est pas modifiée de manière significative chez les plantules en réponse au traitement (tableau 17). La seule différence notable a été détectée au niveau des parties aériennes après analyse avec les microréseaux à oligonucléotides ; le gène étant en effet surexprimé d'un facteur 2,2. Les deux techniques utilisées ne montrant pas le même niveau d'expression, il est difficile de conclure à une réelle surexpression du gène dans les parties aériennes. Les résultats du tableau 21 suggèrent donc que le gène codant la GCS serait exprimé de manière constitutive.

Tableau 17. Ratio de surexpression du gène codant la GCS. Des plantes âgées d'une semaine ont été transférées pendant une semaine sur 0 ou 100 μM de cadmium. La valeur entre parenthèses correspond au seuil de confiance (une différence significative doit avoir un seuil inférieur à 0,05). L'analyse statistique a été réalisée par un test t avec $p < 0,05$.

	RT-PCR quantitative	Microréseaux
Parties aériennes	1,4 (0,236)	2,2 (0,028)
Racines	1,1 (0,290)	2,3 (0,340)

2.1.2. La glutathion synthétase (GS)

La GS est la seconde enzyme de la voie de synthèse des phytochélatines. La mesure de son activité spécifique dans les jeunes plantes montre également une activité plus importante dans les racines des témoins que dans les parties aériennes avec des valeurs de 1,81 et de 0,77 nmoles de glutathion par min et par mg de protéines, respectivement (figure 41). En présence de cadmium, l'activité ne varie pas significativement au niveau des parties aériennes. En revanche, elle est stimulée d'un facteur 1,8 dans les racines par rapport aux racines des témoins.

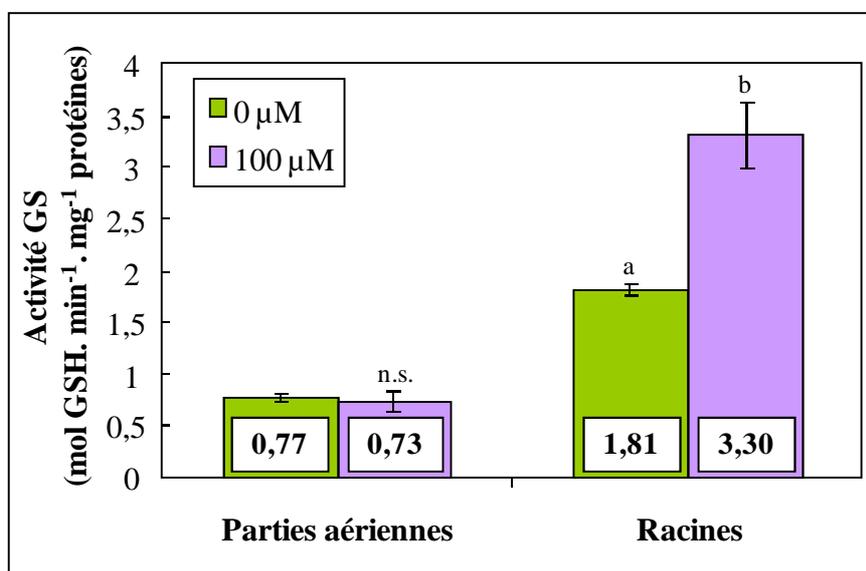


Figure 41. Activité spécifique de la GS dans les racines et les parties aériennes en réponse au cadmium. Des plantes âgées d'une semaine ont été transférées pendant une semaine sur 0 ou 100 μM de cadmium. Les résultats sont exprimés en nmoles de glutathion formé par min et par mg de protéines et correspondent à la moyenne de 3 expériences indépendantes (les moyennes sont indiquées en gras sur la figure). L'analyse statistique a été réalisée par analyse de la variance à un facteur (one-way ANOVA) et par un test de Tukey. Les lettres différentes entre deux moyennes correspondent à une différence significative ($p < 0,05$) et n.s. correspond à une différence non significative.

Les résultats de la RT-PCR quantitative en temps réel indiquent que le gène codant la GS (At5g27380) est surexprimé de manière significative dans les parties aériennes et les racines (tableau 18). Cependant cette augmentation reste très faible (entre 1,2 et 1,3 selon les organes) et n'est pas confirmée par les microréseaux à oligonucléotides. Ceci indique que le gène codant la GS serait exprimé de manière constitutive.

Tableau 18. Ratio de surexpression du gène codant la GS. Des plantes âgées d'une semaine ont été transférées pendant une semaine sur 0 ou 100 μM de cadmium. La valeur entre parenthèses correspond au seuil de confiance (une différence significative doit avoir un seuil inférieur à 0,05). L'analyse statistique a été réalisée par un test t avec $p < 0,05$.

	RT-PCR quantitative	Microréseaux
Parties aériennes	1,3 (0,012)	2,07 (0,076)
Racines	1,2 (0,004)	1,3 (0,114)

2.1.3. La phytochélatine synthase (PCS)

L'activité spécifique de la PCS, troisième enzyme de la voie de synthèse des phytochélatines, ne varie pas de manière significative entre les parties aériennes et les racines des plantes témoins (figure 42). En effet, elle représente respectivement 2,45 et 1,67 nmoles de groupes thiols par min et par mg de protéines. L'activité PCS est stimulée dans les plantules cultivées sur 100 μM par rapport aux témoins. Dans les parties aériennes et les racines, l'activité augmente d'un facteur 1,7 et 3,3 respectivement, par rapport aux témoins. Cependant, les valeurs ne sont pas significativement différentes entre les racines et les parties aériennes des plantules cultivées sur milieu enrichi en cadmium. Les plants cultivés en absence de cadmium présentent une activité basale de PCS. Ceci s'explique par le fait que cette enzyme est présente de façon constitutive et est activée en présence d'ion métallique tel que le cadmium. Le protocole expérimental (voir « matériel et méthodes ») nécessite l'ajout de glutathion et de Cd qui induisent l'activité de l'enzyme.

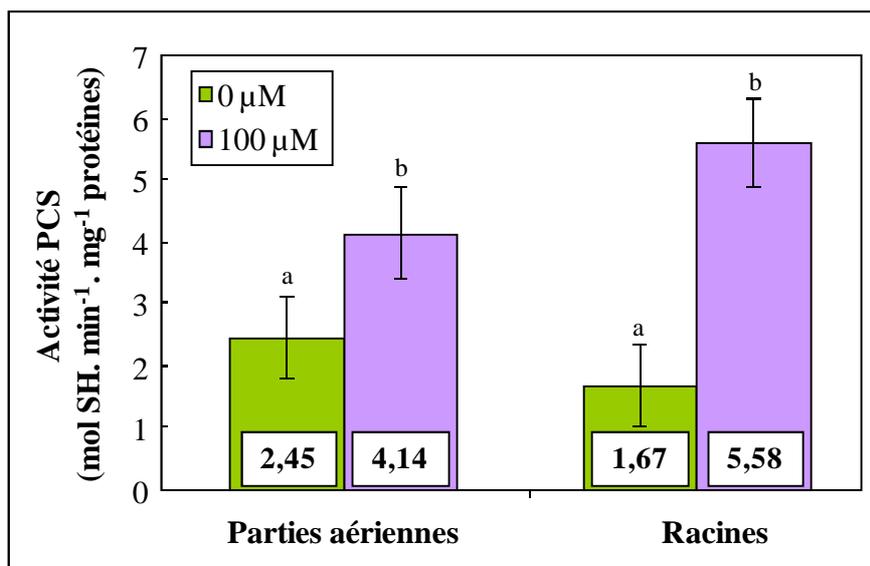


Figure 42. Activité spécifique de la PCS dans les racines et les parties aériennes en réponse au cadmium. Des plantes âgées d'une semaine ont été transférées pendant une semaine sur 0 ou 100 μM de cadmium. Les résultats sont exprimés en nmoles de groupes thiols formés par min et par mg de protéines et correspondent à la moyenne de 3 expériences indépendantes (les moyennes sont indiquées en gras sur la figure). L'analyse statistique a été réalisée par analyse de la variance à un facteur (one-way ANOVA) et par un test de Tukey. Les lettres différentes entre deux moyennes correspondent à une différence significative ($p < 0,05$).

Chez *Arabidopsis thaliana*, deux gènes codent une phytochélatine synthase. Les résultats montrent que le gène *PCS1* (At5g44070) est surexprimé au niveau des parties aériennes par un facteur de 2,4 en RT-PCR et de 3,7 avec les microréseaux (tableau 19). En revanche, l'expression de *PCS2* (At1g03980) n'est pas modifiée de manière significative. Au niveau des racines, *PCS1* n'est pas surexprimé de manière significative contrairement à *PCS2* dont le facteur d'induction est de 3,5 en RT-PCR quantitative et de 4,8 avec les microréseaux.

Tableau 19. Ratio de surexpression des deux gènes codant les PCS. Des plantes âgées d'une semaine ont été transférées pendant une semaine sur 0 ou 100 μM de cadmium. La valeur entre parenthèses correspond au seuil de confiance (une différence significative doit avoir un seuil inférieur à 0,05). L'analyse statistique a été réalisée par un test t avec $p < 0,05$.

	<i>PCS1</i> (At5g44070)		<i>PCS2</i> (At1g03980)	
	RT-PCR quantitative	Microréseaux	RT-PCR quantitative	Microréseaux
Parties aériennes	2,4 (0,001)	3,7 (0,035)	3,7 (0,053)	1,3 (0,084)
Racines	1,1 (0,676)	2,0 (0,124)	3,5 (0,033)	4,8 (0,012)

Les résultats indiquent globalement que le traitement au cadmium stimule l'activité des enzymes intervenant dans la synthèse des phytochélatines, à l'exception de la GS dans les parties aériennes. Dans tous les cas, les activités enzymatiques sont davantage stimulées dans les racines que dans les parties aériennes en réponse au cadmium. De plus, l'étude de l'expression des gènes codant ces enzymes suggère que la GCS et la GS ne seraient pas régulées au niveau transcriptionnel alors que les gènes *PCSI* et *PCS2* sont surexprimés respectivement dans les parties aériennes et dans les racines.

2.2. Chez le mélèze hybride

L'activité spécifique des enzymes impliquées dans la voie de synthèse des PC a été mesurée chez des plants de mélèze âgés de 4 semaines et cultivés pendant 1 semaine sur un milieu enrichi avec 1,5 mM de cadmium (tableau 20). Ces activités ont été mesurées une seule fois et nécessitent d'être confirmées. Cependant, les premiers résultats indiquent une augmentation de l'activité des trois enzymes à la fois dans les racines et dans les parties aériennes. Les activités sont plus fortement stimulées au niveau racinaire si l'on se réfère au facteur d'induction, surtout pour la GCS (2,5 dans les racines contre 1,4 dans les parties aériennes) et la PCS (1,7 dans les racines contre 1,3 dans les parties aériennes). Cette induction plus forte dans les racines avait déjà été observée sur l'arabette dans la partie précédente. Cependant, si l'on se réfère cette fois à l'activité spécifique, celle-ci est plus faible dans les racines pour la GS et surtout pour la GCS avec une activité de 4,12 nmol de produit formé. min⁻¹. mg⁻¹ protéines contre 10,62 dans les feuilles, ceci étant dû à une activité de base plus forte (observée aussi chez l'arabette d'après la figure 40).

Tableau 20. Effet du cadmium sur l'activité des enzymes de la voie de synthèse des PC en nmol de produit formé. min⁻¹. mg⁻¹ protéines. Des mélèzes âgés d'un mois ont été transférés sur 0 ou 1,5 mM de cadmium pendant une semaine avant récolte. GCS : glutamylcystéine synthase ; GS : glutathion synthase ; PCS : phytochélatine synthase.

Enzyme	Organes	Cadmium (mM)		Facteur d'induction cadmium / témoin
		0	1,5	
GCS	Parties aériennes	7,54	10,62	1,4
	Racines	1,66	4,12	2,5
GS	Parties aériennes	3,65	5,72	1,6
	Racines	3,15	5,46	1,7
PCS	Parties aériennes	0,76	1,01	1,3
	Racines	2,57	4,26	1,7

Les expériences préliminaires indiquent que la dose de 1,5 mM semble stimuler l'activité des enzymes de la voie de synthèse des phytochélatines. De plus, cette activité se révèle globalement plus importante dans les racines que dans les parties aériennes, ce qui a été également observé chez *A. thaliana*.

V. Effet du cadmium sur le transcriptome d'*Arabidopsis thaliana*

Des microréseaux à oligonucléotides ont été utilisés non seulement pour suivre l'expression des gènes codant les enzymes de synthèse des phytochélatines mais surtout pour avoir une vision globale de la modulation de l'expression des gènes chez l'arabette en réponse au traitement métallique. En effet, la présence de cadmium dans le milieu peut induire plusieurs effets donc réguler plusieurs voies de biosynthèse (voir l'introduction bibliographique, troisième partie, paragraphe IV). Le premier séquençage d'*A. thaliana* indiquait un total de 25 498 gènes (The Arabidopsis Genome Initiative, disponible sur le site TAIR) mais depuis, le nombre de gènes codant des protéines a été régulièrement revu à la hausse. Nos microréseaux correspondent à un total de 26 090 gènes et la dernière mise à jour disponible sur le site TAIR fait état de 27 379 gènes (version n° 9 datant du 25 janvier 2010).

1. Validation de l'analyse globale du transcriptome

Le traitement des données des microréseaux à oligonucléotides a mis en évidence des gènes surexprimés ou sous-exprimés de manière significative entre les plantules témoins et les plantules traitées avec 100 μM de cadmium (tableau 21).

Au niveau des parties aériennes, l'analyse des données a mis en évidence la surexpression de 695 gènes et la sous-expression de 78 gènes, soit une modification de 773 gènes, ce qui correspond à environ 3 % du génome d'*A. thaliana* par rapport aux microréseaux que nous avons utilisés (tableau 21). Le détail des gènes sur- et sous- exprimés (fonction, locus, niveau d'expression par rapport au témoin et valeur seuil) en réponse au cadmium est présenté respectivement dans les tableaux 25 et 26 reportés à la fin de la partie « Résultats ».

Tableau 21. Nombre de gènes sur- et sous-exprimés en réponse au cadmium dans les parties aériennes et les racines par la technique des microréseaux à oligonucléotides. Des plantes âgées d'une semaine ont été transférées pendant une semaine sur 0 ou 100 μM de cadmium. Les gènes sur- ou sous-exprimés par un facteur égal ou supérieur à 1,5 par rapport au témoin ont été sélectionnés. Les résultats correspondent à la moyenne de 4 expériences (voir la partie VI du chapitre « Matériels et Méthodes » pour le détail) et le traitement statistique a été réalisé à l'aide d'un test t avec $p < 0,05$.

	Surexprimés	Sous-exprimés	Total
Parties aériennes	695	78	773
Racines	479	140	619

Au niveau des racines, le nombre de gènes dont l'expression est modifiée suite à l'exposition au cadmium est moins important avec 479 gènes surexprimés et 140 gènes sous-exprimés de manière significative. Le total de 619 gènes correspond à une variation d'environ 2,4 % du génome. Le détail de ces gènes est reporté dans les tableaux 27 et 28 à la fin de la partie « Résultats ».

Nous avons comparé ces pourcentages avec des données de la littérature liées à une réponse au cadmium ou à d'autres types de stress (tableau 22). Cette comparaison a pour but de vérifier que nos résultats sont conformes à ce que l'on peut obtenir avec la technique des microréseaux à oligonucléotides et donc exploitables pour une analyse plus détaillée. Les données du tableau 22 montrent que nos résultats sont dans le même ordre de grandeur en ce qui concerne le pourcentage total de gènes présentant une expression modifiée. Cependant, tous les microréseaux ne comportent pas le même nombre de gènes et les ARN ne sont pas

extraits de la même manière, ni des mêmes organes. L'âge et le stade de développement des plantes peuvent également être une source de variabilité dans la comparaison des résultats. De plus, les hybridations sont difficilement reproductibles, même pour un même manipulateur, tant les étapes sont nombreuses et sensibles. Il peut donc exister des variations telles que celles que l'on observe entre les résultats de Kovalchuk *et al.* (2005) et de Liu *et al.* (2009b) qui ont étudié le même stress (exposition au plomb) chez l'arabette et qui obtiennent des pourcentages assez différents.

Les quelques travaux réalisés à la fois sur les feuilles ou parties aériennes et sur les racines indiquent un pourcentage de gènes à expression modifiée plus fort dans les racines que dans les organes aériens contrairement à ce que nous obtenons (Wang *et al.*, 2003a ; Herbette *et al.*, 2006). Cependant dans ces deux conditions le stress appliqué était de durée beaucoup plus courte. Il est donc possible que les racines, qui sont les premières à percevoir le stress, induisent davantage de réponses précoces (pour pallier le stress) que de réponses tardives.

Tableau 22. Pourcentage de gènes dont l'expression est modulée par rapport au nombre total de gènes en réponse à différents stress par la technique des microréseaux à oligonucléotides.

Espèce (écotype)	Traitement	Variations du transcriptome (%)	Auteurs, microréseau utilisé (nombre de gènes et type)
<i>A. thaliana</i> (Ws)	Cd 100 µM - 7 jours sur plantes de 7 jours	3 (parties aériennes) 2,4 (racines)	Nos résultats 26 090 / Qiagen
<i>A. thaliana</i> (Col)	Cd 50 µM - 30 h sur plantes de 3-4 semaines	3 (feuilles) 7,8 (racines)	Herbette <i>et al.</i> (2006) 24 576 / CATMA
<i>A. thaliana</i> (Col)	Cd 50 µM sur graines - analyse après 3 semaines	1,8	Kovalchuk <i>et al.</i> (2005) 22 000 / non précisé
<i>A. thaliana</i> (Col)	Pb 50 µM sur graines - analyse après 3 semaines	0,4	Kovalchuk <i>et al.</i> (2005) 22 000 / non précisé
<i>A. thaliana</i> (Col)	Plomb 100 µM - 24 h sur plantes de 10 jours	16,4	Liu <i>et al.</i> (2009b) 6 102 EST / Université de Yale
<i>A. thaliana</i> (Col)	Nitrate 250 µM - 20 min sur plantes de 15 jours	0,8 (feuilles) 5,2 (racines)	Wang <i>et al.</i> (2003a) 22 626 / Affymetrix ATH1
<i>A. thaliana</i> (Col)	Oxyde nitrique 0,1 et 1 mM - 3 h sur plantes de 4 semaines	0,7 et 0,8 (feuilles)	Parani <i>et al.</i> (2004) 24 000 / Affymetrix ATH1
<i>A. thaliana</i> (Col)	Méthanol (10 % en spray) - 72 h sur plantes de 5 semaines	1,9 (feuilles)	Downie <i>et al.</i> (2004) 26 090 / Qiagen
Maïs	NaCl (150 mM) - 3 h	11	Wang <i>et al.</i> (2003b) 7 943 EST / non précisé
Maïs	UV-B - 8 h sur feuilles adultes	6,1	Casati et Walbot (2004) 5 664 / Unigene I

Les gènes ont ensuite été regroupés en 5 familles (figure 43) :

- gènes de fonction inconnue,
- gènes liés à différents métabolismes (glucidique, azoté, lipidique / énergétique, pariétal et autres métabolismes).
- gènes liés à la régulation de la transcription et traduction,
- gènes impliqués dans la transduction des signaux et dans différents modes de transports (transports ioniques, transports d'acides aminés ou oligopeptides...),
- gènes de défenses (interactions plantes / pathogènes, anti-oxydants, protéines de choc thermique, cytochrome P450,...).

Le regroupement des gènes par fonction n'est pas standardisé dans la littérature même si quelques grandes fonctions ressortent fréquemment dans les publications comme les gènes de fonction inconnue, les gènes de signalisation ou les gènes liés à la transcription. Selon les auteurs, les autres catégories sont parfois plus détaillées comme par exemple les différentes voies métaboliques, la localisation intracellulaire (gènes chloroplastiques, mitochondriaux, nucléaires), les gènes impliqués dans les interactions plantes / pathogènes ou dans la régulation de la paroi, etc. La présentation des gènes par fonction semble dépendre davantage de la thématique de recherche et par conséquent des centres d'intérêt des auteurs.

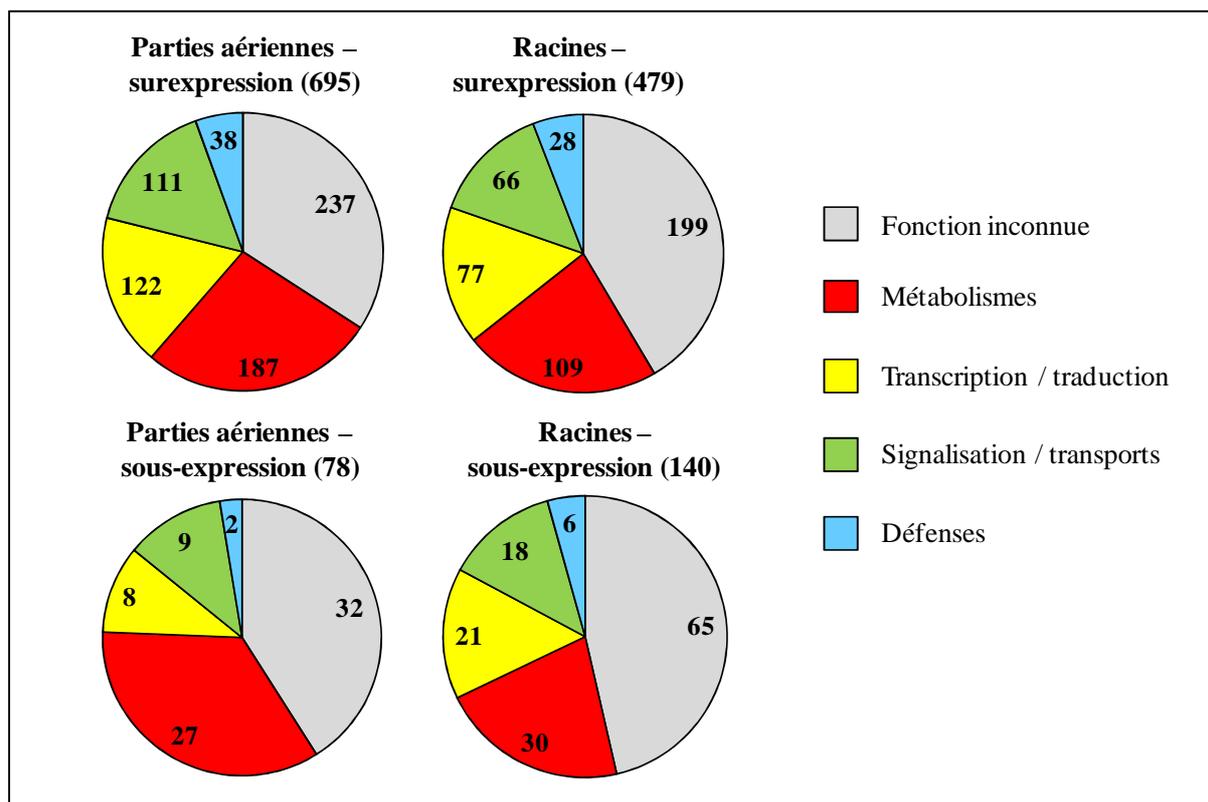


Figure 43. Répartition par fonction des gènes sur- et sous- exprimés en réponse au cadmium dans les parties aériennes et dans les racines. Des plantes âgées d'une semaine ont été transférées pendant une semaine sur 0 ou 100 μM de cadmium. Le nombre de gènes indiqués pour chaque fonction correspond à la moyenne de 4 expériences (voir la partie VI du chapitre « Matériels et Méthodes » pour le détail) et le traitement statistique a été réalisé à l'aide d'un test t avec $p < 0,05$.

La figure 43 indique qu'il existe encore de nombreux gènes dont la fonction est inconnue chez *A. thaliana*. Quelle que soit la condition (sur- ou sous-exprimés, parties aériennes ou racinaires), le pourcentage de gènes de fonction inconnue est compris entre 35 et 45 % et celui des gènes liés à différents métabolismes (azoté, glucidique, etc...) correspond approximativement à 20 à 30 % des gènes régulés de manière significative. Les gènes liés à la régulation de la transcription ou traduction et les gènes impliqués dans la signalisation et le transport correspondent à environ 15 % chacun des gènes dont l'expression est modifiée en réponse au cadmium. Quant aux gènes liés aux défenses, ils ne représentent qu'un faible pourcentage du total des gènes modifiés.

2. Analyse des gènes surexprimés

2.1. Parties aériennes

Sur les 695 gènes surexprimés, 34 % codent des protéines dont la fonction n'est pas connue ou des protéines répertoriées comme hypothétiques d'après les bases de données. Environ 18 % des gènes sont liés à des fonctions de régulation de la transcription ou de la traduction et 9 % codent des protéines intervenant dans la transduction de signaux avec notamment de nombreuses protéines kinases, lesquelles correspondent à plus de la moitié des gènes répertoriés dans cette catégorie. Le métabolisme azoté est également modifié suite à l'exposition au cadmium (12 % des gènes surexprimés) avec plus de la moitié des gènes liés à la reconnaissance et à la modification de protéines à travers le système ubiquitine-protéasome et diverses protéases.

De manière plus spécifique, la présence du cadmium a régulé positivement l'expression de transporteurs de cations pouvant prendre en charge le cadmium (voir l'introduction bibliographique, troisième partie, paragraphe III). On trouve par exemple 4 gènes NRAMP, un CDF (cation diffusion facilitator) et deux gènes de la famille ABC. Par ailleurs, d'autres transporteurs potentiels de cadmium ont également été mis en évidence comme un antiport cation / hydrogène, un antiport de différents xénobiotiques (organiques ou ioniques), un transporteur d'ions métalliques ou des transporteurs de la famille MATE. Leur localisation est précisée dans le tableau 23. Les gènes identifiés sont des gènes présents au niveau de différentes membranes, permettant ainsi le transport du cadmium d'une cellule à l'autre et son stockage au niveau des vacuoles.

Tableau 23. Expression et localisation de gènes codant des transporteurs potentiels de cadmium dans les parties aériennes en réponse au traitement appliqué. Des plantes âgées d'une semaine ont été transférées pendant une semaine sur 0 ou 100 μ M de cadmium. Le facteur d'induction correspond à la moyenne de 4 expériences (voir la partie VI du chapitre « Matériels et Méthodes » pour le détail) et le traitement statistique a été réalisé à l'aide d'un test t avec $p < 0,05$ (les valeurs sont indiquées entre parenthèses). M : membrane (type non spécifié) ; EM : endomembrane ; MP : membrane plasmique ; T : tonoplaste ; C : chloroplaste.

Localisation	Fonction	Locus	Facteur d'induction
M	potassium channel tetramerisation protein	At2g24240	3,08 (0,045)
	magnesium transporter (M + C)	At5g22830	3,01 (0,009)
	potassium transporter	At4g13420	2,59 (0,011)
	NRAMP metal ion transporter 2 (NRAMP2)	At1g47240	2,55 (0,015)
	MATE family (multidrug transport)	At2g04090	2,30 (0,017)
	cation diffusion facilitator (CDF)	At3g58060	2,24 (0,018)
	multidrug antiporter	At5g10420	2,02 (0,021)
	cation / hydrogen exchanger	At3g52080	1,92 (0,013)
	NRAMP metal ion transporter 1 (NRAMP1)	At1g80830	1,80 (0,026)
EM	copper ion binding	At2g15780	3,55 (0,025)
MP	ABC transporter	At5g60790	3,12 (0,009)
	MATE family (multidrug transport)	At3g08040	3,04 (0,023)
	mechanosensitive ion channel protein	At5g12080	1,69 (0,039)
T	NRAMP metal ion transporter 4 (NRAMP4)	At5g67330	2,64 (0,019)
	NRAMP metal ion transporter 3 (NRAMP3)	At2g23150	2,06 (0,011)
C	ABC transporter	At1g79600	2,78 (0,024)
Inconnue	metal ion transporter	At1g49420	2,52 (0,033)
	calcium-binding protein	At4g38810	2,33 (0,012)

La paroi cellulaire semble aussi modifiée par la présence du cadmium (tableau 25, page 123). Ainsi, la surexpression de gènes codant des protéines de type extensine ou protéines arabinogalactanes suggère un renforcement de la structure pariétale. Le métabolisme des polysaccharides pariétaux est également modifié avec notamment des enzymes impliquées dans la synthèse de lignine (cinnamyl-alcool déshydrogénase), cellulose, callose et xyloglucanes et dans la réorganisation des pectines (polygalacturonases, pectine estérases). De nombreuses glycosyl transférases liées aux polysaccharides sont également surexprimées (xyloglucane fucosyl ou xyloglucosyl transférases, galacturonsyl transférase, mannosyl tansférase).

Le traitement au cadmium entraîne par ailleurs une surexpression d'une quarantaine de gènes liés au stress mais de manière aspécifique au stress métallique. En effet, les résultats

montrent une augmentation de l'expression de gènes de défense liés à l'attaque par des pathogènes (chitinase, thaumatine...), aux variations de température (protéines de choc thermique, protéine de réponse au froid) ou à différents stress biotiques et abiotiques (phytochrome P 450, protéines universelles de stress, déhydrine...). Par ailleurs, quelques gènes surexprimés sont liés à des défenses anti-oxydantes comme des thioredoxines, des glutaredoxines et une monodéhydroascorbate réductase (il a été reporté dans l'introduction bibliographique que le cadmium peut générer un stress oxydant chez les plantes).

2.2. Racines

Sur les 479 gènes surexprimés, 42 % correspondent à des protéines de fonction inconnue et 16 % des gènes sont impliqués dans des processus de régulation de la transcription et de la traduction, ce qui est très proche des pourcentages observés pour les parties aériennes. De la même manière, de nombreux gènes codant des protéines kinases sont induits ainsi que des gènes codant des protéines du système d'ubiquitination. Des gènes de défenses non spécifiques sont également surexprimés (protéines de choc thermique, thioredoxines, cytochrome P450, protéines de résistance aux maladies...) à hauteur de 6 % des gènes surexprimés.

Le nombre de gènes impliqués dans le transport de cations, et notamment de cations métalliques, est proche de celui des parties aériennes (tableau 24). Ces gènes codent des transporteurs qui ont globalement les mêmes fonctions que dans les parties aériennes : ABC, NRAMP, MATE, transporteurs d'ions métalliques, protéines de liaison au calcium (qui peuvent aussi prendre en charge les ions cadmium). Le nombre de gènes de chaque catégorie n'est cependant pas le même. Par exemple, un seul gène NRAMP est surexprimé dans les racines contre 4 dans les parties aériennes.

Tableau 24. Expression et localisation de gènes codant des transporteurs potentiels de cadmium dans les racines en réponse au traitement appliqué. Des plantes âgées d'une semaine ont été transférées pendant une semaine sur 0 ou 100 μ M de cadmium. Le facteur d'induction correspond à la moyenne de 4 expériences (voir la partie VI du chapitre « Matériels et Méthodes » pour le détail) et le traitement statistique a été réalisé à l'aide d'un test t avec $p < 0,05$ (les valeurs sont indiquées entre parenthèses). M : membrane (type non spécifié) ; EM : endomembranaire ; MP : membrane plasmique ; T : tonoplaste.

Localisation	Fonction	Locus	Facteur d'expression
M	ABC transporter	At4g28630	2,71 (0,034)
	NRAMP metal ion transporter 5 (NRAMP5)	At4g18790	2,49 (0,016)
	MATE family	At1g66760	2,19 (0,026)
	mechanosensitive ion channel	At5g10490	2,19 (0,013)
	K ⁺ outward rectifier / potassium channel	At3g02850	2,01 (0,021)
EM	cyclic nucleotide-regulated cation channel	At5g15410	4,54 (0,037)
EM + apoplaste	germin-like protein (manganese ion binding)	At3g04180	1,83 (0,020)
	germin-like protein (manganese ion binding)	At3g04170	1,62 (0,017)
MP	metal-phytosiderophore / metal-nicotianamine transporter	At5g24380	3,01 (0,008)
MP + T	germin-like protein (manganese ion binding)	At4g14630	1,83 (0,020)
	two-pore calcium channel	At4g03560	1,53 (0,031)
Racines	calcium-binding protein	At2g34020	1,74 (0,006)
Inconnue	calcium-binding protein	At2g46600	2,05 (0,016)
	K-Cl Co-transporter type 1 protein-related	At3g58370	1,89 (0,021)
	metal ion transporter	At5g52670	1,81 (0,017)
	acireductone dioxygenase / metal ion binding	At4g14716	1,69 (0,017)
	metal ion transporter	At5g23760	1,64 (0,006)

La quantité de gènes surexprimés liés à la modification de la paroi est plus faible que dans les parties aériennes, notamment au niveau du métabolisme des pectines (tableau 27). Comme pour les parties aériennes, une callose synthase est surexprimée. En revanche la cellulose synthase n'apparaît pas dans les gènes dont l'expression est modifiée de manière significative. Quant aux protéines de structure, en plus de protéines arabinogalactanes et extensines, des gènes codant des protéines riches en hydroxyproline sont également surexprimés.

3. Analyse des gènes sous-exprimés

3.1. Parties aériennes

Sur les 78 gènes sous-exprimés dans les parties aériennes, plus de 40 % codent des protéines de fonction inconnue, 10 % interviennent dans la régulation de la transcription et 9 % codent des kinases liées aux processus de signalisation (tableau 26). Très peu de gènes sont sous-exprimés en ce qui concerne l'évolution de la paroi (2 gènes pour des protéines pariétales et une pectate lyase), les protéines de défenses (2) ou encore les transporteurs de cations (et potentiellement de cadmium) donc aucun n'est sous-exprimé de manière significative.

3.2. Racines

Le traitement au cadmium a entraîné la sous-expression de 140 gènes dans les racines. Les proportions entre les différentes familles restent proches par rapport aux résultats observés pour les parties aériennes en termes de gènes codant des protéines de fonction inconnue ou liés à la régulation de la transcription. On trouve également très peu de sous-expression de gènes de défense contre différents stress (6), de gènes impliqués dans des modifications pariétales (4) ou de transporteurs d'ions métalliques (un seul antiport cation / hydrogène) (tableau 28).

Tableau 25. Gènes surexprimés de manière significative dans les parties aériennes en réponse au cadmium. Des plantules d'une semaine ont été transférées pendant une semaine sur un milieu contenant 0 ou 100 μM de cadmium. Le ratio d'induction (traité / témoin) correspond à la moyenne de 4 expériences. L'analyse statistique a été réalisée au moyen d'un test t avec un seuil de confiance supérieur à 95 % ($p < 0,05$).

Description	Locus	Ratio d'induction	Test t
TRANSPORTEURS (48)			
Transporteurs ioniques (20)			
ABC transporter	At5g60790	3,12	0,009
ABC transporter	At1g79600	2,78	0,024
cation diffusion facilitator (CDF)	At3g58060	2,24	0,018
NRAMP metal ion transporter 1 (NRAMP1)	At1g80830	1,80	0,026
NRAMP metal ion transporter 2 (NRAMP2)	At1g47240	2,55	0,015
NRAMP metal ion transporter 3 (NRAMP3)	At2g23150	2,06	0,011
NRAMP metal ion transporter 4 (NRAMP4)	At5g67330	2,64	0,019
metal ion transporter	At1g49420	2,52	0,033
cation / hydrogen exchanger	At3g52080	1,92	0,013
MATE family (multidrug transport)	At3g08040	3,04	0,023
MATE family (multidrug transport)	At2g04090	2,30	0,017
multidrug antiporter	At5g10420	2,02	0,021
mechanosensitive ion channel protein	At5g12080	1,69	0,039
copper ion binding	At2g15780	3,55	0,025
potassium channel tetramerisation protein	At2g24240	3,08	0,045
magnesium transporter	At5g22830	3,01	0,009
potassium transporter	At4g13420	2,59	0,011
calcium-binding protein	At4g38810	2,33	0,012
vacuolar ammonium transporter	At5g47450	1,92	0,030
high-affinity nitrate transporter	At5g60770	1,83	0,029
Pompes ATPases (6)			
AAA-type ATPase	At5g40010	2,97	0,013
AAA-type ATPase	At5g17760	2,48	0,018
AAA-type ATPase	At5g57480	2,04	0,017
ATPase coupled to transmembrane movement of ions	At1g17500	2,35	0,020
ATPase - plasma membrane-type	At2g07560	2,33	0,021
calcium-transporting ATPase - plasma membrane-type	At5g57110	1,58	0,040

Description	Locus	Ratio	Test t
Transporteurs d'acides aminés / oligopeptides (9)			
amino acid transporter	At5g38820	3,02	0,029
amino acid transporter	At5g41800	2,43	0,021
amino acid permease	At5g01240	2,77	0,018
amino acid permease	At5g04770	2,62	0,033
tryptophan / tyrosine permease	At2g33260	1,94	0,019
proline transporter	At3g55740	2,60	0,017
proton-dependent oligopeptide transporter	At1g69870	2,37	0,049
proton-dependent oligopeptide transporter	At1g62200	3,75	0,013
proton-dependent oligopeptide transporter	At5g19640	2,32	0,009
Autres transporteurs (11)			
Got1-like family (vesicle-mediated transport)	At1g05785	1,96	0,031
SNF7 family (vesicle-mediated transport)	At4g29160	2,42	0,028
vacuolar protein sorting-associated protein	At3g11530	2,94	0,008
vacuolar protein sorting-associated protein	At4g21560	4,50	0,036
synaptobrevin (vesicle-associated membrane protein)	At1g04760	2,32	0,009
emp24/gp25L/p24 (transmembrane transporter)	At2g03290	3,11	0,015
mitochondrial ADP / ATP carrier protein	At5g13490	3,06	0,022
endomembrane protein - Golgi transport	At1g14670	1,85	0,012
importin alpha-1 subunit (nuclear import)	At3g06720	2,06	0,006
mitochondrial substrate carrier	At4g24570	2,35	0,020
Aquaporin	At2g34390	1,59	0,014
Voie des phytochlélamines (2)			
glutamylcysteine synthetase	At4g23100	2,24	0,028
phytochelatin synthase 1 (PCS1)	At5g44070	3,66	0,035

Description	Locus	Ratio d'induction	Test t
DEFENSES (38)			
Interaction plantes / pathogènes (15)			
defensin-like	At2g43510	6,88	0,030
defensin-like	At2g43530	2,62	0,027
Thionin	At5g36910	3,24	0,016
disease resistance family protein (LRR family)	At2g32660	3,00	0,020
disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class)	At4g08450	2,79	0,023
disease resistance protein (NBS-LRR class)	At4g27190	2,74	0,024
disease resistance protein (TIR class)	At5g45070	2,23	0,034
disease resistance protein (CC-NBS-LRR class)	At1g61180	2,02	0,019
turnip crinkle virus-interacting protein	At5g24590	2,67	0,009
Laccase	At5g01050	2,52	0,016
acidic endochitinase (CHIB1)	At5g24090	2,48	0,026
chitinase-like protein 1 (CTL1)	At1g05850	2,03	0,021
thaumatin-like	At5g02140	2,48	0,044
pathogenesis-related thaumatin	At4g38670	1,99	0,011
polygalacturonase inhibiting protein 2	At5g06870	2,06	0,020
Anti-oxydants (7)			
glutaredoxin	At4g15670	3,23	0,008
glutaredoxin	At5g39865	2,82	0,016
glutaredoxin	At2g41330	2,12	0,025
monodehydroascorbate reductase	At5g03630	2,41	0,032
thioredoxin	At1g04980	2,36	0,020
thioredoxin	At5g60640	1,80	0,009
thioredoxin	At1g19730	1,76	0,042
Métabolites secondaires (3)			
shikimate kinase	At3g26900	2,19	0,008
quinone reductase	At5g54500	2,07	0,013
1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase (isoprenoid synthesis)	At5g62790	2,87	0,032

Description	Locus	Ratio	Test t
Autres protéines de stress (13)			
heat shock protein	At3g57340	3,87	0,029
heat shock protein	At4g36040	3,82	0,012
heat shock protein	At5g37670	2,68	0,018
heat shock protein	At1g16030	2,20	0,027
heat shock protein	At5g47600	1,83	0,037
cytochrome P450 family	At5g67310	2,80	0,016
cytochrome P450 family	At3g20080	2,71	0,013
cytochrome P450 family	At5g63450	2,21	0,025
cytochrome P450 family	At2g27010	2,16	0,012
dehydrin	At3g50980	2,16	0,034
universal stress protein	At3g03270	2,19	0,012
universal stress protein	At1g11360	2,09	0,007
cold-responsive protein	At2g42540	2,03	0,017
PAROI (28)			
Protéines (11)			
extensin family	At2g19780	2,92	0,029
proline-rich extensin	At1g64450	2,72	0,016
proline-rich extensin	At3g28550	2,58	0,035
proline-rich extensin	At5g62640	2,53	0,025
extensin family	At5g54855	1,67	0,016
proline-rich extensin	At2g27390	1,66	0,011
arabinogalactan-protein	At3g20865	2,33	0,030
arabinogalactan-protein	At4g37450	2,32	0,014
arabinogalactan-protein	At5g10430	2,10	0,021
arabinogalactan-protein	At3g61640	1,77	0,024
arabinogalactan-protein glucuronidase (glycosyl hydrolase family 79)	At5g61250	2,40	0,006

Description	Locus	Ratio	Test t
Polysaccharides et glycosylation (16)			
		d'induction	
callose synthase	At4g04970	1,95	0,023
cellulose synthase	At4g24000	2,03	0,024
polygalacturonase	At5g44830	2,13	0,021
polygalacturonase	At1g80140	1,98	0,010
polygalacturonase	At1g65570	1,84	0,014
pectate lyase (pectate clivage)	At3g55140	2,76	0,009
pectinesterase	At2g45220	2,79	0,037
pectinacetylterase	At1g09550	2,57	0,017
pectinacetylterase	At5g45280	2,16	0,024
xyloglucan fucosyl transferase	At2g03210	2,15	0,027
xyloglucan / xyloglucosyl transferase	At5g57550	1,98	0,030
xyloglucan fucosyl transferase	At1g74420	1,82	0,017
xyloglucan / xyloglucosyl transferase	At5g57560	1,80	0,011
mannosyl transferase	At5g14850	2,00	0,028
glycosyl transferase family 8 (galacturonosyltransferase - Golgi)	At3g02350	2,45	0,021
glycosyl hydrolase family 17 (cation binding - carbohydrate pathway)	At5g64790	3,24	0,005
Autres (1)			
cinnamyl-alcohol dehydrogenase	At1g09510	3,79	0,037
METABOLISME GLUCIDIQUE (14)			
Néoglucogenèse (2)			
sucrose synthase / sucrose-UDP glucosyltransferase	At3g43190	3,12	0,006
glucose-1-phosphate adenylyltransferase small subunit 1	At5g48300	2,79	0,036
Glycolyse (4)			
Phosphofruktokinase	At1g12000	2,82	0,016
D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	At1g17745	2,36	0,017
glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	At3g26650	2,25	0,006
2,3-biphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase	At3g08590	2,04	0,011
Photosynthèse (5)			
phototropic-responsive NPH3	At3g44820	3,41	0,023
plastocyanin-like	At3g53330	3,34	0,019
RuBisCO small subunit 2B (RBCS-2B)	At5g38420	2,64	0,005
carbonic anhydrase	At3g52720	2,05	0,028
Subunit of light-harvesting complex II (LHCII)	At1g29930	2,01	0,031
Autres (3)			
fructan exohydrolase	At1g55120	2,89	0,017
fructose-bisphosphate aldolase	At3g52930	2,15	0,022
UDP-glucose/galactose epimerase	At5g44480	2,22	0,018

Description	Locus	Ratio	Test t
METABOLISME LIPIDIQUE (20)		d'induction	
2C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase	At1g63970	3,55	0,005
phospholipid/glycerol acyltransferase	At3g05510	3,55	0,008
allene oxide synthase	At5g42650	3,00	0,024
lipid transfer protein	At5g01870	2,94	0,034
lipid transfer protein / protease inhibitor	At1g62790	2,13	0,017
lipid transfer protein / protease inhibitor	At1g05450	2,01	0,023
lipid transfer protein / protease inhibitor	At5g13900	2,00	0,030
fatty acid desaturase	At3g15870	2,80	0,018
sterol 4-alpha-methyl-oxidase 2	At1g07420	2,78	0,022
oxysterol-binding protein	At4g22540	2,74	0,016
lipase	At2g30550	2,71	0,014
calcium-dependent lipid-binding protein	At3g61050	2,58	0,016
lecithin:cholesterol acyltransferase	At5g13640	2,54	0,010
lipid-binding glycoprotein	At1g04970	2,45	0,024
beta-ketoacyl-CoA synthase	At3g52160	2,26	0,013
patatin (lipase function)	At4g37050	2,25	0,035
fatty acid elongase 3-ketoacyl-CoA synthase	At2g46720	2,25	0,010
short-chain dehydrogenase/reductase	At5g61830	2,09	0,009
short-chain dehydrogenase/reductase	At1g62610	1,74	0,008
enoyl-CoA hydratase (degradation of cis-unsaturated fatty acids)	At1g76150	1,66	0,017

Description	Locus	Ratio d'induction	Test t
METABOLISME AZOTE (80)			
Ubiquitine-protéasome-protéases (41)			
20S proteasome alpha subunit D	At3g51260	3,40	0,030
26S proteasome regulatory subunit	At5g09900	3,59	0,041
ubiquitin protease	At2g22310	5,63	0,033
ubiquitin protease	At1g69660	2,42	0,013
ubiquitin protease	At4g39370	2,09	0,013
ubiquitin hydrolase	At1g52450	3,38	0,005
ubiquitin hydrolase	At1g65120	2,76	0,021
ubiquitin hydrolase	At4g10590	2,13	0,023
ubiquitin ligase	At5g57740	2,45	0,016
ubiquitin ligase	At5g65200	2,44	0,011
ubiquitin ligase	At4g38600	1,87	0,034
ubiquitin family protein	At5g57860	1,98	0,039
ubiquitin-conjugating enzyme	At5g41340	1,72	0,030
polyubiquitin (UBQ3)	At5g03240	1,63	0,026
F-box family (interaction with ubiquitin ligases)	At2g02250	3,43	0,006
F-box family (interaction with ubiquitin ligases)	At3g03360	3,14	0,030
F-box family (interaction with ubiquitin ligases)	At1g66490	2,79	0,035
F-box family (interaction with ubiquitin ligases)	At5g62660	2,71	0,009
F-box family (interaction with ubiquitin ligases)	At5g01720	2,67	0,016
F-box family (interaction with ubiquitin ligases)	At5g63520	2,66	0,011
F-box family (interaction with ubiquitin ligases)	At5g56370	2,57	0,006
F-box family (interaction with ubiquitin ligases)	At1g10110	2,49	0,020
F-box family (interaction with ubiquitin ligases)	At5g38565	2,35	0,021
F-box family (interaction with ubiquitin ligases)	At3g44120	2,09	0,032
F-box family (interaction with ubiquitin ligases)	At3g58900	1,96	0,007
F-box family (interaction with ubiquitin ligases)	At2g03560	1,94	0,026
F-box family (interaction with ubiquitin ligases)	At4g39750	1,53	0,021
U-box family	At5g37490	2,45	0,026
ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit ClpX	At1g33360	2,22	0,009
aspartyl protease	At5g24820	1,69	0,030
aspartyl protease	At3g42550	2,59	0,039
membrane-associated zinc metalloprotease	At2g32480	3,08	0,014
cysteine protease	At5g67170	2,56	0,019
Ulp1 protease	At3g42690	2,91	0,008
Ulp1 protease	At5g28235	2,04	0,012
proline iminopeptidase	At2g14260	2,19	0,027
serine carboxypeptidase	At3g45010	2,26	0,008
serine carboxypeptidase	At5g23210	2,50	0,029
endopeptidase	At3g46850	3,38	0,027
endopeptidase	At5g64240	2,56	0,016
rhomboïd family (protease)	At2g29050	4,83	0,027

Description	Locus	Ratio	Test t
Synthèses et modifications (18)			
diphthamide synthesis	At3g59630	4,79	0,008
cysteine synthase	At3g59760	3,95	0,008
3-isopropylmalate dehydrogenase (leucine biosynthesis)	At1g31180	3,64	0,022
2-isopropylmalate synthase (leucine biosynthesis)	At1g18500	2,78	0,014
delta 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase	At2g39800	2,89	0,013
glycine hydroxymethyltransferase	At5g26780	2,81	0,015
alanine-glyoxylate aminotransferase	At3g08860	2,71	0,027
methionine adenosyltransferase	At4g00560	2,63	0,023
diphthine synthase	At4g31790	2,26	0,018
glycosyl transferase family 17 (protein glycosylation)	At2g13290	2,60	0,032
glycosyl transferase family 43 (protein glycosylation)	At1g27600	2,13	0,026
arogenate dehydratase (phenylalanine biosynthesis)	At5g22630	2,24	0,016
aminotransferase	At5g57590	2,05	0,039
nitrate reductase	At1g77760	1,67	0,019
coronatine-responsive tyrosine aminotransferase	At4g23600	1,66	0,018
histidinol-phosphate aminotransferase (histidine biosynthesis)	At5g10330	1,54	0,010
anthranilate phosphoribosyltransferase (tryptophan synthesis)	At1g70570	2,14	0,028
anthranilate synthase beta subunit (glutamine metabolic process)	At1g25155	1,52	0,029
Cytosquelette (21)			
molybdopterin biosynthesis protein	At5g20990	3,51	0,006
myristoyl-CoA:protein N-myristoyltransferase	At5g57020	3,50	0,012
tropomyosin	At1g78430	3,36	0,010
tropomyosin	At1g17140	3,00	0,009
microtubule associated protein	At3g60840	3,23	0,008
chromosome-associated kinesin	At5g33300	3,17	0,015
microfibrillar-associated protein	At4g08580	3,03	0,020
harpin-induced protein	At3g52470	3,01	0,001
ankyrin repeat family protein	At5g40160	2,90	0,028
wave-dampened 2 (microtubule associated protein)	At5g28646	2,64	0,017
ARP2/3 complex	At1g60430	2,47	0,012
kinesin motor family protein	At3g43210	2,47	0,025
kinesin-like protein	At4g27180	1,75	0,014
tubulin-specific chaperone	At3g57890	2,40	0,045
formin 2	At5g67470	2,21	0,029
formin 2	At5g58160	2,12	0,025
dynein light chain 2	At4g15930	2,11	0,014
kinectin-related	At5g66250	1,98	0,030
myosin	At3g13190	1,88	0,008
myosin	At4g33200	1,50	0,008
actin 2	At3g18780	1,68	0,033

Description	Locus	Ratio d'induction	Test t
AUTRES METABOLISMES (45)			
Régulation hormonale (13)			
auxin-responsive GH3 family	At4g03400	3,71	0,026
auxin/aluminum-responsive protein	At5g19140	3,19	0,012
auxin-binding protein 1 (ABP1)	At4g02980	2,88	0,028
auxin efflux carrier	At5g01990	2,57	0,042
auxin-responsive protein	At2g33310	2,55	0,026
auxin-responsive protein	At5g25890	2,16	0,039
auxin response factor	At4g34300	2,07	0,017
auxin-responsive protein	At5g18010	1,70	0,007
ethylene-induced esterase	At2g23600	3,17	0,025
ethylene receptor	At3g23150	2,95	0,009
gibberellin 3 beta-hydroxylase	At4g21690	2,78	0,018
cytokinin oxidase	At5g21482	2,40	0,016
salicylic acid glucosyl transferase	At2g43820	2,45	0,033
Cyclines (4)			
cylicin-related	At5g10950	3,42	0,029
cyclin family	At5g10440	2,55	0,022
cyclin family	At1g47230	2,55	0,007
cyclin family	At4g19600	2,46	0,018
Glycosylation - substrats inconnus (4)			
UDP-glucuronosyl/UDP-glucosyl transferase	At5g49690	2,62	0,025
glycosyl transferase	At2g22590	2,49	0,010
glycosyl hydrolase family 17	At5g53600	2,30	0,017
glycosyl transferase family 64	At1g80290	2,19	0,029
Processus respiratoires (3)			
electron carrier and oxidoreductase activity	At1g56000	2,43	0,007
NADH-ubiquinone dehydrogenase (respiratory chain complex)	At5g37510	2,03	0,013
formyltetrahydrofolate deformylase / photorespiration	At5g47435	1,60	0,015

Description	Locus	Ratio	Test t
Autres métabolismes (21)		d'induction	
ovate family protein	At4g04030	2,63	0,014
oxidoreductase, 2OG-Fe(II) oxygenase (flavonol synthase)	At3g19010	2,54	0,005
acyl groups transferase	At1g24420	2,44	0,025
autophagosome formation during nutrient deprivation and senescence	At3g62770	2,43	0,027
acyl groups transferase	At5g63560	2,36	0,016
thioesterase	At5g48950	2,34	0,021
chaperonin (unfolded protein binding)	At3g03960	2,34	0,013
phosphoglucosamine mutase / phosphotransferase	At5g17530	2,33	0,013
sulfur starvation induced protein	At5g48850	2,30	0,017
nodulin	At5g07050	2,29	0,009
nodulin	At4g08290	2,24	0,046
nodulin	At4g01450	1,90	0,032
target of rapamycin protein (cell growth regulator)	At1g50030	2,28	0,017
acyl groups transferase	At5g07850	2,19	0,008
aldo-keto reductase / oxidoreductase	At1g06690	2,15	0,017
glucose-methanol-choline oxidoreductase / FAD binding	At1g14185	2,14	0,024
aconitate hydratase (cycle de Krebs)	At4g35830	2,11	0,026
phytoene dehydrogenase (carotenoid biosynthesis)	At4g14210	2,00	0,029
vegetative storage protein 2 (VSP2)	At5g24770	1,99	0,037
hydroxymethylglutaryl-CoA lyase	At2g26800	1,92	0,026
oxidoreductase	At5g53100	1,76	0,007

Description	Locus	Ratio	Test t
SIGNALISATION (63)		d'induction	
Kinases (37)			
leucine-rich transmembrane kinase	At4g31250	5,21	0,034
leucine-rich transmembrane kinase	At2g45340	2,92	0,016
leucine-rich transmembrane kinase	At4g34220	2,75	0,021
leucine-rich kinase	At1g51820	4,08	0,022
leucine-rich kinase	At5g39390	2,15	0,015
protein kinase	At2g20300	3,94	0,034
protein kinase	At2g42960	3,84	0,026
protein kinase	At5g16500	3,44	0,008
protein kinase	At1g77280	3,29	0,010
protein kinase	At3g04810	3,21	0,007
protein kinase	At4g04510	2,89	0,027
protein kinase	At5g13160	2,80	0,009
protein kinase	At5g57610	2,61	0,028
protein kinase	At5g18190	2,59	0,021
protein kinase	At5g50000	2,56	0,018
protein kinase	At5g13530	2,54	0,022
protein kinase	At4g32000	2,51	0,009
protein kinase	At3g61960	2,37	0,017
protein kinase	At5g28290	2,34	0,013
protein kinase	At3g57740	2,28	0,005
protein kinase	At4g00330	2,26	0,030
protein kinase	At5g01850	2,26	0,027
protein kinase	At3g52890	1,88	0,014
receptor-like protein kinase	At5g41290	3,70	0,009
serine/threonine kinase	At5g03640	3,32	0,013
serine/threonine kinase	At1g48220	2,85	0,008
serine/threonine kinase	At5g63650	2,37	0,029
serine/threonine kinase	At5g03320	1,88	0,021
serine/threonine kinase	At2g47060	1,64	0,024
serine/threonine kinase	At1g10940	1,52	0,008
serine/threonine kinase	At1g61590	2,03	0,028
serine/threonine kinase receptor	At4g18250	2,16	0,010
phosphatidylinositol 3- and 4-kinase	At1g27570	3,21	0,009
light repressible receptor protein kinase	At4g29990	2,99	0,037
lectin kinase	At4g28350	2,97	0,023
IKI3 family	At5g13680	2,81	0,016
calmodulin-domain kinase	At5g12480	1,88	0,028

Description	Locus	Ratio	Test t
Phosphatases (10)			
protein tyrosine phosphatase 1	At1g71860	4,08	0,033
protein phosphatase 2C	At1g78200	2,73	0,007
serine/threonine protein phosphatase	At1g17720	2,59	0,011
serine/threonine protein phosphatase	At5g59160	2,04	0,017
serine/threonine protein phosphatase	At3g07130	1,92	0,039
calcineurin (calcium/calmodulin-dependent phosphatase)	At4g33000	2,42	0,010
calcineurin (calcium/calmodulin-dependent phosphatase)	At4g31770	2,23	0,030
calcineurin (calcium/calmodulin-dependent phosphatase)	At5g10900	1,84	0,016
phosphatidic acid phosphatase	At2g01180	2,38	0,016
phosphoinositide phosphatase	At3g14205	1,81	0,007
Autres signaux (16)			
CLE16 (signal transduction)	At2g01505	4,22	0,013
ER lumen protein retaining receptor	At3g25160	3,48	0,019
transducin family protein	At5g23430	2,98	0,016
transducin family protein	At2g16405	2,96	0,023
Ras-related GTP-binding protein	At2g22290	2,91	0,009
Ras-related GTP-binding protein	At5g55190	2,50	0,023
Ras-related GTP-binding protein	At3g09900	2,09	0,019
calmodulin-related protein	At3g01830	2,81	0,012
calmodulin-7 (CAM7)	At3g43810	2,01	0,008
GTP-binding protein	At1g72660	2,64	0,025
GTP-binding protein	At5g09910	2,55	0,021
GTP-binding protein	At5g08650	2,22	0,036
RabGAP/TBC domain-containing protein	At5g53570	2,51	0,020
RabGAP/TBC domain-containing protein	At4g13730	2,20	0,035
AMP-binding protein	At5g16340	2,45	0,006
Ran-binding protein	At5g06120	1,99	0,007
TRANSCRIPTION / TRADUCTION (122)			
Liaison à l'ADN (64)			
ABA-responsive element binding protein	At1g19950	3,41	0,011
ABA-responsive element binding protein	At2g17770	3,24	0,026
ABA-responsive element binding protein	At1g69700	2,10	0,007
AP2 domain-containing transcription factor	At5g25390	2,74	0,012
auxin-responsive factor	At5g57420	1,79	0,011
auxin-responsive factor (ARF7)	At5g20730	2,11	0,028
basic helix-loop-helix (bHLH) family	At5g67060	2,39	0,025
basic helix-loop-helix (bHLH) family	At5g57150	2,35	0,022
basic helix-loop-helix (bHLH) family	At5g50915	2,23	0,016
basic transcription factor 2	At1g05055	3,06	0,013
BolA-like family (transcription regulator)	At5g09830	2,12	0,022

Description	Locus	Ratio d'induction	Test t
bZIP family transcription factor	At4g02640	3,76	0,008
bZIP family transcription factor	At5g06960	2,62	0,017
bZIP family transcription factor	At3g51960	1,99	0,027
DNA-binding family	At3g04590	2,84	0,021
DNA-binding family	At3g51880	2,82	0,006
DNA-binding family	At5g23405	2,58	0,022
DNA-binding family	At4g12050	2,07	0,010
DNA-binding family	At5g47660	1,81	0,043
Dof-type zinc finger domain-containing protein	At1g69570	3,76	0,029
Dof-type zinc finger domain-containing protein	At5g60850	1,90	0,015
DP-2 transcription factor	At5g02470	2,42	0,009
ethylene-responsive element-binding family	At1g80580	4,65	0,024
far-red impaired response / transcription activator activity	At4g15090	2,80	0,009
homeobox-leucine zipper family protein	At3g61150	2,03	0,007
KH domain-containing protein / zinc finger (CCCH type) family	At3g12130	2,00	0,032
KOW domain-containing transcription factor	At4g08350	3,39	0,015
MADS-box family	At3g66656	2,33	0,009
MADS-box protein	At5g51870	3,49	0,013
MADS-box protein	At5g27960	3,13	0,047
myb family transcription factor	At5g52660	3,67	0,029
myb family transcription factor	At4g00540	3,54	0,013
myb family transcription factor	At3g16350	2,72	0,031
myb family transcription factor	At5g61420	2,62	0,013
myb family transcription factor	At4g34990	2,58	0,028
myb family transcription factor	At5g49620	2,55	0,024
myb family transcription factor	At2g01060	2,06	0,023
myb family transcription factor	At5g55020	1,82	0,048
SSXT protein-related / transcriptional co-activator	At5g28640	2,72	0,017
TCP family transcription factor	At3g02150	2,58	0,029
transcription factor / no apical meristem	At5g18270	1,65	0,031
transcription factor-related	At5g24450	2,18	0,028
transcriptional adaptor (ADA2a)	At3g07740	3,15	0,026
transcriptional factor B3 family	At5g62000	2,74	0,008
transcriptional factor B3 family	At2g46530	2,36	0,006
two-component responsive regulator	At5g62920	2,15	0,010
WD-40 repeat family	At3g15880	2,06	0,021
WD-40 repeat family	At5g07590	1,91	0,030
WRKY family transcription factor	At5g43290	2,64	0,013
WRKY family transcription factor	At4g31550	2,52	0,014
XH/XS domain-containing protein	At1g80790	2,02	0,023
zinc finger (B-box type) family	At3g07650	3,35	0,012

Description	Locus	Ratio d'induction	Test t
zinc finger (C2H2 type) family	At1g13400	3,79	0,014
zinc finger (C2H2 type) family	At4g35700	2,91	0,005
zinc finger (C2H2 type) family	At3g57670	2,81	0,018
zinc finger (C2H2 type) family	At5g16470	2,67	0,018
zinc finger (C2H2 type) family	At5g59820	2,35	0,007
zinc finger (CCCH-type) family	At5g58620	2,29	0,006
zinc finger protein-related	At1g49920	2,79	0,015
zinc finger protein-related	At5g61190	2,57	0,009
zinc finger protein-related	At5g63740	2,12	0,015
zinc knuckle (CCHC-type) family	At5g32482	3,11	0,018
zinc knuckle (CCHC-type) family	At2g12880	2,20	0,025
squamosa promoter-binding protein-like 11	At1g27360	2,44	0,021
Liaison à l'ARN (21)			
glycine-rich RNA-binding protein 8	At4g39260	2,15	0,023
mRNA capping enzyme family	At3g09100	2,14	0,018
pentatricopeptide repeat-containing protein (RNA binding)	At4g21190	4,48	0,015
pentatricopeptide repeat-containing protein (RNA binding)	At1g63400	3,94	0,012
pentatricopeptide repeat-containing protein (RNA binding)	At5g43790	3,09	0,010
pentatricopeptide repeat-containing protein (RNA binding)	At5g50990	3,01	0,017
pentatricopeptide repeat-containing protein (RNA binding)	At1g13040	2,83	0,019
pentatricopeptide repeat-containing protein (RNA binding)	At3g53700	2,63	0,009
pentatricopeptide repeat-containing protein (RNA binding)	At3g46790	2,53	0,033
pentatricopeptide repeat-containing protein (RNA binding)	At1g80550	2,49	0,007
pentatricopeptide repeat-containing protein (RNA binding)	At4g14050	2,28	0,023
pentatricopeptide repeat-containing protein (RNA binding)	At3g22670	1,98	0,029
RNA recognition motif (RRM)-containing protein	At5g16260	3,90	0,018
RNA recognition motif (RRM)-containing protein	At2g43410	3,86	0,013
RNA recognition motif (RRM)-containing protein	At1g67950	3,11	0,011
RNA recognition motif (RRM)-containing protein	At5g61960	2,43	0,037
RNA recognition motif (RRM)-containing protein	At5g55670	3,00	0,028
RNA-binding protein 45	At5g54900	3,19	0,028
RNA binding	At1g68580	3,01	0,011
RNA binding	At1g09660	2,46	0,015
RNA-binding protein	At5g06210	2,09	0,008

Description	Locus	Ratio	Test t
Autres (37)		d'induction	
3'(2'),5'-bisphosphate nucleotidase	At5g63980	2,83	0,046
40S ribosomal protein S17 (RPS17B)	At2g05220	1,88	0,017
40S ribosomal protein S2 (RPS2D)	At3g57490	3,02	0,021
40S ribosomal protein S20 (RPS20A)	At3g45030	2,20	0,033
50S ribosomal protein L18 family	At3g20230	1,74	0,029
50S ribosomal protein L24, chloroplast	At5g54600	1,98	0,027
60S acidic ribosomal protein	At4g00810	1,90	0,023
adenine phosphoribosyltransferase	At5g11160	1,86	0,022
cytidine deaminase	At4g29620	2,21	0,008
DEAD/DEAH box helicase	At1g71280	2,58	0,028
DNA (cytosine-5-)-methyltransferase (ATHIM)	At5g49160	2,14	0,007
DNA gyrase subunit A	At3g10690	3,15	0,022
DNA-directed DNA polymerase alpha catalytic subunit	At5g67100	1,69	0,014
elongation initiation factor / argonaute family	At5g43810	4,10	0,019
endonuclease/exonuclease/phosphatase	At1g05630	2,89	0,007
endonuclease/exonuclease/phosphatase	At1g11800	2,32	0,020
endoribonuclease	At2g04270	2,91	0,045
eukaryotic translation initiation factor 1A	At5g35680	3,06	0,014
eukaryotic translation initiation factor 4A-1	At3g13920	2,26	0,015
exonuclease	At1g74390	2,10	0,027
FtsJ-like methyltransferase	At5g01230	2,99	0,011
histone acetyl transferase	At5g50320	1,88	0,033
minichromosome maintenance protein	At5g44635	2,60	0,019
nucleic acid binding	At5g08535	2,09	0,039
nucleotide-sugar transporter	At5g65000	2,29	0,017
phosphoribosylamidoimidazole-succinocarboxamide synthase	At3g21110	3,39	0,006
pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase	At5g22140	2,23	0,017
pyrimidine 5'-nucleotidase	At2g38680	2,47	0,007
ribonuclease	At5g02250	1,96	0,010
ribosomal protein L2	At2g07715	3,18	0,027
ribosomal protein S16	At5g56940	2,48	0,029
small nuclear ribonucleoprotein D2	At2g47640	2,25	0,010
spliceosome protein	At2g42510	2,29	0,028
splicing factor	At3g45950	2,89	0,007
UMUC-like DNA repair family protein	At5g44740	2,29	0,019
uridylyate kinase / uridine monophosphate kinase	At5g26667	2,19	0,023
YT521-B-like (ribosome maturation factor)	At4g11970	1,69	0,023

**FONCTION
INCONNUE (237)**

DC1 domain-containing protein	At3g11390	11,57	0,031
expressed protein	At1g67700	5,21	0,014
expressed protein	At3g43160	5,13	0,014
expressed protein	At5g62580	5,12	0,023
expressed protein	At2g31740	5,00	0,032
expressed protein	At1g73885	4,76	0,010
expressed protein	At2g01260	4,63	0,012
expressed protein	At4g16410	4,31	0,011
expressed protein	At4g37090	4,20	0,011
expressed protein	At5g08240	4,18	0,014
expressed protein	At3g18380	4,10	0,025
octicosapeptide domain-containing protein	At1g62390	4,10	0,013
hypothetical protein	At3g51760	4,04	0,035
expressed protein	At4g24310	3,74	0,007
exostosin	At4g32790	3,74	0,014
expressed protein	At4g27450	3,73	0,017
hypothetical protein	At5g32620	3,72	0,014
expressed protein	At1g72480	3,64	0,045
expressed protein	At5g02150	3,60	0,010
expressed protein	At1g23970	3,57	0,044
hypothetical protein	At4g05616	3,56	0,014
leucine-rich protein	At4g23840	3,54	0,015
expressed protein	At5g43500	3,44	0,031
expressed protein	At3g04860	3,43	0,011
expressed protein	At2g44010	3,40	0,007
expressed protein	At2g32320	3,40	0,020
expressed protein	At5g44710	3,38	0,026
expressed protein	At4g28005	3,37	0,029
expressed protein	At2g14635	3,35	0,025
expressed protein	At1g62520	3,32	0,025
expressed protein	At3g55720	3,30	0,021
hypothetical protein	At5g40620	3,28	0,014
hypothetical protein	At5g44470	3,27	0,009
expressed protein	At3g12570	3,22	0,031
expressed protein	At4g35070	3,21	0,025
expressed protein	At3g11000	3,20	0,023
expressed protein	At2g30200	3,19	0,017
kelch repeat family	At1g54040	3,18	0,006
expressed protein	At1g23510	3,17	0,019
expressed protein	At3g48185	3,17	0,023
expressed protein	At3g12210	3,16	0,020
expressed protein	At1g71850	3,16	0,010

expressed protein	At1g42960	3,14	0,028
hypothetical protein	At3g27130	3,11	0,018
major latex protein-related	At1g70890	3,09	0,006
expressed protein	At3g59490	3,08	0,009
expressed protein	At5g24000	3,08	0,004
hypothetical protein	At2g02280	3,07	0,011
octicosapeptide domain-containing protein	At1g25300	3,07	0,019
expressed protein	At1g64650	3,04	0,013
expressed protein	At1g74770	3,03	0,016
expressed protein	At1g28100	3,03	0,022
peroxisomal membrane protein	At4g03410	3,02	0,030
hypothetical protein	At5g50290	3,01	0,025
expressed protein	At3g62390	3,00	0,005
hypothetical protein	At4g07690	3,00	0,033
expressed protein	At2g38820	2,99	0,020
expressed protein	At5g62650	2,98	0,005
expressed protein	At3g12320	2,98	0,014
expressed protein	At1g19010	2,97	0,024
expressed protein	At4g31875	2,97	0,018
reticulon family protein	At2g15280	2,96	0,022
peptidoglycan-binding LysM domain	At4g25433	2,95	0,029
glycine-rich protein	At2g05440	2,94	0,036
hypothetical protein	At2g07707	2,94	0,014
glycine-rich protein	At3g04640	2,89	0,025
expressed protein	At3g51100	2,88	0,014
expressed protein	At4g39040	2,87	0,021
hypothetical protein	At5g35280	2,87	0,016
expressed protein	At2g32130	2,87	0,007
glyoxal oxidase-related	At3g57620	2,86	0,011
expressed protein	At3g43540	2,85	0,027
expressed protein	At3g59910	2,85	0,017
expressed protein	At4g26240	2,84	0,009
expressed protein	At5g15600	2,84	0,018
expressed protein	At5g24840	2,84	0,009
expressed protein	At4g08810	2,83	0,030
hypothetical protein	At3g32120	2,83	0,020
expressed protein	At5g10710	2,81	0,018
expressed protein	At4g03600	2,81	0,021
expressed protein	At1g30860	2,80	0,011
expressed protein	At3g06150	2,80	0,006
hypothetical protein	At4g07521	2,79	0,025
expressed protein	At1g53870	2,78	0,011

expressed protein	At3g53440	2,77	0,015
hypothetical protein	At2g16410	2,77	0,024
hypothetical protein	At3g44140	2,77	0,009
expressed protein	At5g66810	2,76	0,009
expressed protein	At5g55610	2,75	0,022
integral membrane family	At1g10030	2,75	0,030
expressed protein	At1g79280	2,74	0,008
hypothetical protein	At4g05370	2,73	0,025
kelch repeat family	At5g03020	2,72	0,017
hypothetical protein	At5g57570	2,72	0,025
expressed protein	At1g66480	2,72	0,020
hypothetical protein	At3g32904	2,72	0,012
expressed protein	At1g17940	2,70	0,010
expressed protein	At1g30130	2,70	0,034
methyl-CpG-binding domain-containing protein	At5g35330	2,70	0,006
expressed protein	At1g50020	2,69	0,021
expressed protein	At1g77145	2,68	0,011
expressed protein	At1g43130	2,67	0,044
expressed protein	At3g44510	2,67	0,023
complex 1 family protein / LVR (LYR family)	At1g76060	2,66	0,006
plant adhesion molecule	At3g02460	2,65	0,037
Per1-like	At1g16560	2,64	0,030
myosinase-binding protein-like	At3g16440	2,61	0,017
expressed protein	At5g05940	2,61	0,028
expressed protein	At1g79760	2,60	0,016
hypothetical protein	At5g50620	2,60	0,041
expressed protein	At2g29525	2,60	0,032
expressed protein	At3g19780	2,60	0,010
hypothetical protein	At1g41860	2,60	0,013
expressed protein	At4g01915	2,60	0,017
expressed protein	At1g80890	2,59	0,012
expressed protein	At2g45860	2,58	0,020
integral membrane family	At5g06200	2,58	0,021
hypothetical protein	At4g07452	2,57	0,019
hypothetical protein	At5g40855	2,57	0,009
expressed protein	At3g61690	2,56	0,009
expressed protein	At3g12960	2,56	0,033
expressed protein	At3g56730	2,55	0,018
expressed protein	At5g48790	2,54	0,007
hypothetical protein	At3g59620	2,53	0,024
expressed protein	At5g13470	2,51	0,013
expressed protein	At5g05950	2,51	0,020
protein binding leucine rich protein	At1g25570	2,50	0,027
expressed protein	At5g12050	2,50	0,029

expressed protein	At2g01480	2,50	0,010
expressed protein	At5g05360	2,49	0,036
C2 domain-containing protein	At2g22125	2,49	0,016
expressed protein	At4g04190	2,48	0,017
hypothetical protein	At1g44010	2,48	0,017
expressed protein	At5g28220	2,47	0,012
hypothetical protein	At5g26692	2,45	0,022
hypothetical protein	At3g29750	2,45	0,025
expressed protein	At5g52975	2,44	0,006
expressed protein	At1g49890	2,43	0,009
expressed protein	At1g80540	2,43	0,011
hypothetical protein	At2g10090	2,43	0,019
expressed protein	At4g01650	2,42	0,010
hypothetical protein	At3g24630	2,42	0,008
expressed protein	At2g01100	2,42	0,006
hAT dimerisation domain	At3g13030	2,42	0,019
glycine-rich protein	At1g04660	2,42	0,019
hypothetical protein	At1g44870	2,40	0,011
expressed protein	At5g09460	2,39	0,030
expressed protein	At3g53670	2,38	0,012
hypothetical protein	At5g35020	2,38	0,017
expressed protein	At1g10660	2,36	0,005
zinc finger (C3HC4-type RING finger) family (protein binding)	At1g57820	2,36	0,008
expressed protein	At5g18200	2,36	0,016
hypothetical protein	At3g43850	2,36	0,009
guanylyl cyclase-related	At5g05930	2,35	0,032
expressed protein	At5g65610	2,35	0,011
expressed protein	At1g20070	2,35	0,007
expressed protein	At3g57320	2,32	0,024
expressed protein	At5g39410	2,32	0,008
expressed protein	At5g06220	2,31	0,013
expressed protein	At5g45480	2,31	0,023
expressed protein	At5g49830	2,31	0,032
expressed protein	At3g08030	2,30	0,047
prenylated rab acceptor	At5g02040	2,29	0,015
expressed protein	At5g59360	2,29	0,025
VQ motif-containing protein	At5g08480	2,28	0,007
expressed protein	At4g11860	2,28	0,025
expressed protein	At5g12170	2,28	0,025
expressed protein	At2g33220	2,28	0,026
expressed protein	At1g79140	2,28	0,032
exostosin	At5g33290	2,27	0,008
hypothetical protein	At3g45380	2,27	0,020
expressed protein	At5g66820	2,27	0,038

expressed protein	At3g07760	2,26	0,011
hypothetical protein	At5g39170	2,26	0,010
expressed protein	At1g10990	2,24	0,048
hypothetical protein	At3g42760	2,24	0,025
hypothetical protein	At5g46320	2,23	0,018
expressed protein	At5g10320	2,22	0,016
zinc finger (C3HC4-type RING finger) family (protein binding)	At1g26800	2,21	0,017
expressed protein	At2g05590	2,21	0,020
expressed protein	At2g15270	2,21	0,023
peptidase M16 inactive domain	At3g19170	2,20	0,007
expressed protein	At5g01470	2,19	0,020
expressed protein	At5g26600	2,18	0,023
kelch repeat family	At4g39756	2,17	0,035
expressed protein	At1g54680	2,15	0,022
integral membrane family	At5g15290	2,14	0,014
expressed protein	At5g02740	2,14	0,019
hypothetical protein	At5g63720	2,14	0,008
hypothetical protein	At2g18320	2,13	0,019
expressed protein	At3g04630	2,13	0,019
expressed protein	At4g35510	2,12	0,009
expressed protein	At1g62190	2,10	0,032
expressed protein	At2g02730	2,10	0,015
hypothetical protein	At2g07290	2,09	0,040
expressed protein	At5g04080	2,09	0,011
expressed protein	At5g48080	2,09	0,012
expressed protein	At5g17910	2,09	0,034
hypothetical protein	At5g55010	2,08	0,006
unknown protein	At3g44150	2,08	0,024
expressed protein	At5g37360	2,07	0,017
expressed protein	At5g54850	2,05	0,026
hypothetical protein	At4g22510	2,05	0,007
expressed protein	At4g14746	2,05	0,023
expressed protein	At1g69230	2,04	0,031

expressed protein	At5g08660	2,04	0,009
expressed protein	At3g02180	2,03	0,013
glycine/proline-rich protein	At5g17650	2,02	0,007
hypothetical protein	At2g10390	2,00	0,011
expressed protein	At3g26710	1,99	0,022
hypothetical protein	At5g48270	1,99	0,018
longevity-assurance family	At1g13580	1,98	0,039
expressed protein	At1g50450	1,97	0,027
expressed protein	At3g47250	1,96	0,023
expressed protein	At5g42570	1,94	0,025
expressed protein	At5g25460	1,92	0,025
expressed protein	At4g32460	1,90	0,019
expressed protein	At3g51040	1,90	0,007
expressed protein	At3g46310	1,87	0,015
hypothetical protein	At1g42740	1,87	0,010
expressed protein	At5g47455	1,86	0,018
expressed protein	At5g47830	1,86	0,030
expressed protein	At4g24590	1,86	0,015
expressed protein	At1g68330	1,84	0,018
expressed protein	At5g01450	1,83	0,007
hypothetical protein	At3g29660	1,83	0,038
expressed protein	At2g20120	1,80	0,028
expressed protein	At5g54067	1,78	0,028
expressed protein	At5g44150	1,77	0,029
plasma membrane intrinsic protein	At4g00430	1,73	0,032
hypothetical protein	At1g47700	1,70	0,023
expressed protein	At3g13175	1,67	0,009
Synbindin	At5g02280	1,63	0,046
hypothetical protein	At5g20460	1,62	0,020
expressed protein	At5g24860	1,61	0,027
expressed protein	At1g76185	1,58	0,040
yrdC protein-related	At5g60590	1,55	0,013

Tableau 26. Gènes sous-exprimés de manière significative dans les parties aériennes en réponse au cadmium. Des plantules d'une semaine ont été transférées pendant une semaine sur un milieu contenant 0 ou 100 μM de cadmium. Le ratio d'induction (traité / témoin) correspond à la moyenne de 4 expériences. L'analyse statistique a été réalisée au moyen d'un test t avec un seuil de confiance supérieur à 95 % ($p < 0,05$).

Description	Locus	Ratio d'induction	Test t
TRANSPORTEURS (2)			
high-affinity nitrate transporter	At1g12940	-2,34	0,012
calcium-transporting ATPase 8, plasma membrane-type	At5g57110	-1,54	0,028
DEFENSES (2)			
disease resistance family	At3g11080	-2,90	0,016
Thioredoxin	At5g06430	-2,17	0,004
PAROI (5)			
Protéines (2)			
proline-rich extensin	At4g16140	-2,88	0,047
hydroxyproline-rich glycoprotein	At4g01050	-2,05	0,020
Polysaccharides et glycosylation (3)			
pectate lyase	At5g09280	-2,68	0,020
glycoside hydrolase family 28 (pectinase)	At1g56710	-1,84	0,021
glycosyl hydrolase family 9 (carbohydrate metabolism)	At4g39010	-1,76	0,020
METABOLISME GLUCIDIQUE (2)			
phosphofructokinase (glycolysis)	At5g56630	-2,12	0,003
RuBisCO activase	At2g39730	-1,97	0,019
METABOLISME LIPIDIQUE (5)			
lipid transfer protein / protéase inhibitor	At5g09370	-2,48	0,026
lipid transfer protein / protéase inhibitor	At2g13820	-2,32	0,043
lipid transfer protein	At2g15050	-2,29	0,007
calcium-dependent phospholipid binding protein	At5g07300	-2,45	0,032
fatty acid elongase	At2g15090	-2,41	0,006
METABOLISME AZOTE (10)			
Ubiquitine - protéasome - protéases (4)			
ubiquitin-conjugating enzyme	At5g25760	-2,33	0,019
ubiquitin-protein ligase	At5g07270	-2,28	0,035
ubiquitin fusion degradation family	At4g38930	-1,85	0,007
rhomboid family (protease)	At5g07250	-2,49	0,014
Synthèses et modifications (5)			
L-asparaginase	At5g08100	-2,47	0,016
Aminotransferase	At2g13810	-2,38	0,004
peptidyl-arginine deiminase	At5g08170	-2,34	0,015
citrate synthase	At3g58750	-2,18	0,029
histidinol-phosphate aminotransferase	At5g10330	-1,66	0,008
Cytosquelette (1)			
Myosin	At4g33200	-1,75	0,007

Description	Locus	Ratio d'induction	Test t
AUTRES METABOLISMES (5)			
NADH-ubiquinone oxidoreductase	At2g07689	-2,79	0,035
NADH-ubiquinone oxidoreductase	At5g52840	-2,71	0,017
Sulfotransferase	At2g14920	-2,35	0,009
senescence-associated protein	At4g35770	-2,34	0,006
cytochrome c oxidase subunit II	At2g07695	-2,23	0,003
SIGNALISATION (7)			
GHMP kinase - ATP-binding domain	At4g16130	-2,67	0,009
phosphatidylinositol 4-kinase	At5g09350	-2,41	0,019
leucine-rich repeat kinase	At5g07280	-2,38	0,009
protein kinase	At4g23220	-2,28	0,006
riboflavin kinase	At4g21470	-2,20	0,013
leucine-rich repeat kinase	At2g13800	-2,06	0,005
serine/threonine kinase	At1g10940	-1,70	0,006
TRANSCRIPTION / TRADUCTION (8)			
transcription initiation protein	At5g63670	-2,90	0,003
TCP family transcription factor	At5g08070	-2,60	0,039
ribosomal protein S7	At2g07696	-2,38	0,017
basic leucine zipper transcription factor	At2g41070	-2,16	0,005
homeobox protein-related	At5g07260	-2,13	0,004
heat shock transcription factor	At5g03720	-2,12	0,007
transcriptional coactivator p15 (PC4)	At4g10920	-2,07	0,018
RNA recognition motif (RRM)	At2g33435	-2,06	0,018

FONCTION INCONNUE (32)

expressed protein	At2g07674	-2,97	0,039
glycine-rich protein	At2g11005	-2,87	0,029
major latex protein-related	At1g23120	-2,86	0,002
expressed protein	At2g15000	-2,79	0,016
expressed protein	At2g10980	-2,79	0,041
hypothetical protein	At2g07691	-2,76	0,008
hypothetical protein	At2g13980	-2,61	0,022
expressed protein	At2g14910	-2,56	0,019
hypothetical protein	At2g11360	-2,55	0,016
hypothetical protein	At2g14000	-2,44	0,015
hypothetical protein	At2g14010	-2,42	0,009
expressed protein	At2g07676	-2,39	0,007
SNF7-related nuclear protein	At5g09260	-2,32	0,031
expressed protein	At2g22790	-2,32	0,012
zinc finger (CCCH-type/C3HC4-type RING finger) (protein binding)	At5g06420	-2,28	0,006
expressed protein	At3g11100	-2,25	0,014

hypothetical protein	At2g11370	-2,25	0,002
expressed protein	At5g06440	-2,23	0,002
expressed protein	At4g15830	-2,23	0,042
hypothetical protein	At5g08090	-2,17	0,006
hypothetical protein	At2g07692	-2,16	0,002
expressed protein	At2g14045	-2,16	0,030
kelch repeat-containing F-box	At4g19330	-2,16	0,006
expressed protein	At1g44740	-2,12	0,014
peroxisomal protein	At5g62810	-2,11	0,010
hypothetical protein	At2g11405	-2,11	0,011
expressed protein	At5g12260	-2,11	0,015
hypothetical protein	At4g31440	-2,07	0,037
hypothetical protein	At1g44674	-2,06	0,014
expressed protein	At5g63350	-2,05	0,011
acetyltransferase (non fonctionnelle)	At2g11000	-2,01	0,015
yrdC protein-related	At5g60590	-1,66	0,011

Tableau 27. Gènes surexprimés de manière significative dans les racines en réponse au cadmium. Des plantules d'une semaine ont été transférées pendant une semaine sur un milieu contenant 0 ou 100 μM de cadmium. Le ratio d'induction (traité / témoin) correspond à la moyenne de 4 expériences. L'analyse statistique a été réalisée au moyen d'un test t avec un seuil de confiance supérieur à 95 % ($p < 0,05$).

Description	Locus	Facteur d'induction	Test t
TRANSPORTEURS (32)			
Transporteurs ioniques (17)			
ABC transporter	At4g28630	2,71	0,0342
NRAMP metal ion transporter 5 (NRAMP5)	At4g18790	2,49	0,0157
cyclic nucleotide-regulated cation channel	At5g15410	4,54	0,0374
mechanosensitive ion channel	At5g10490	2,19	0,0131
MATE family	At1g66760	2,19	0,0261
metal ion transporter	At5g52670	1,81	0,0169
metal ion transporter	At5g23760	1,64	0,0062
acireductone dioxygenase / metal ion binding	At4g14716	1,69	0,0174
germin-like protein (manganese ion binding)	At3g04180	1,83	0,0199
germin-like protein (manganese ion binding)	At4g14630	1,83	0,0196
germin-like protein (manganese ion binding)	At3g04170	1,62	0,0175
metal-phytosiderophore/metal-nicotianamine transporter	At5g24380	3,01	0,0083
K ⁺ outward rectifier / potassium channel	At3g02850	2,01	0,0212
calcium-binding protein	At2g46600	2,05	0,0161
calcium-binding protein	At2g34020	1,74	0,0060
two-pore calcium channel	At4g03560	1,53	0,0308
K-Cl Co-transporter type 1 protein-related	At3g58370	1,89	0,0206
ATPases (4)			
AAA-type ATPase	At4g28000	2,27	0,0241
peroxisomal AAA-ATPase	At5g08470	2,27	0,0172
vacuolar (V-type) ATPase	At1g19910	4,71	0,0295
mitochondrial ATPase beta chain	At5g08680	1,99	0,0073
Transporteurs d'acides aminés / oligopeptides (2)			
proton-dependent oligopeptide transport	At3g54450	1,74	0,0155
proton-dependent oligopeptide transport	At3g45650	1,53	0,0233
Autres transporteurs (8)			
sugar transporter	At3g19940	5,66	0,0260
mitochondrial substrate carrier	At1g74240	3,08	0,0132
secretory carrier membrane protein	At1g11180	2,60	0,0088
synaptobrevin (vesicle-associated membrane protein)	At1g04760	2,23	0,0549
mitochondrial membrane translocase (protein transport)	At3g62880	2,14	0,0176
Got1-like family	At1g05785	2,11	0,0257
importin alpha-1 subunit	At1g09270	2,07	0,0138
GDP-mannose transporter	At2g13650	1,72	0,0156
Voie des phytochélatines (1)			
Phytochélatine synthase 2 (PCS2)	At1g03980	4,80	0,0118

Description	Locus	Facteur d'induction	Test t
DEFENSES (28)			
Interaction plantes / pathogènes (9)			
polygalacturonase inhibitor	At3g12145	3,04	0,0271
disease resistance protein (TIR class)	At2g20145	2,47	0,0355
disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class)	At5g17970	2,19	0,0327
disease resistance-responsive protein	At4g23690	2,17	0,0548
disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class)	At5g51630	2,10	0,0147
disease resistance protein (TIR class)	At1g65390	1,59	0,0234
thaumatin	At4g36010	2,52	0,0148
pathogenesis-related protein	At3g09590	1,84	0,0266
avirulence-responsive family protein	At4g09930	1,70	0,0110
Anti-oxydants (6)			
thioredoxin	At1g04980	2,58	0,0069
thioredoxin	At1g15020	1,78	0,0347
thioredoxin H-type 5	At1g45145	1,72	0,0122
2-cys peroxiredoxin (control cytokine-induced peroxide levels)	At5g06290	2,79	0,0467
type 2 peroxiredoxin-related / thiol specific antioxidant	At1g65990	1,81	0,0268
peroxidase	At5g06730	1,68	0,0181
Autres protéines de stress (13)			
heat shock protein	At1g74250	3,08	0,0153
heat shock protein	At2g22360	2,53	0,0264
heat shock protein	At1g09260	2,34	0,0057
heat shock protein	At5g06410	1,83	0,0062
heat shock protein	At5g21430	1,66	0,0194
heat shock protein binding protein	At1g75690	1,61	0,0231
cytochrome P450-related	At4g15396	2,15	0,0250
cytochrome P450	At5g52400	1,59	0,0266
cytochrome P450	At3g26180	1,88	0,0162
NADPH-cytochrome p450 reductase	At4g30210	1,82	0,0260
macrophage migration inhibitory factor	At5g57170	1,99	0,0171
defensin	At2g43530	1,83	0,0181
drought-responsive protein	At4g02200	1,51	0,0235
PAROI (19)			
Protéines pariétales (7)			
extensin family	At4g18596	2,39	0,0461
proline-rich extensin	At4g08400	1,73	0,0151
proline-rich extensin	At1g76930	1,64	0,0152
hydroxyproline-rich glycoprotein	At5g51680	2,62	0,0138
hydroxyproline-rich glycoprotein	At1g15825	1,85	0,0150
hydroxyproline-rich glycoprotein	At1g56530	1,84	0,0114
arabinogalactan-protein	At3g61640	1,50	0,0293

Description	Locus	Facteur d'induction	Test t
Polysaccharides et glycosylation (12)			
pectinesterase inhibitor	At2g10970	2,46	0,0068
pectinesterase	At3g10720	1,57	0,0264
pectate lyase	At3g55140	1,79	0,0210
callose synthase	At4g04970	2,81	0,0196
UDP-glucose transferase (from sucrose to callose synthase)	At1g05560	1,94	0,0316
xyloglucan fucosyltransferase	At2g15390	2,19	0,0216
xyloglucan fucosyltransferase	At2g03210	1,79	0,0300
1,2-diacylglycerol 3-beta-galactosyltransferase	At4g31780	1,86	0,0405
1,4-alpha-glucan branching enzyme	At5g03650	2,18	0,0084
beta-galactosidase	At2g32810	2,31	0,0187
beta-galactosidase	At4g36360	1,70	0,0269
glycosyl hydrolase 14 (cation binding - cellulose biosynthetic process)	At5g45300	1,97	0,0281
METABOLISME GLUCIDIQUE (7)			
Glycosylation (2)			
glycosyl hydrolase 17 (cation binding - carbohydrate metabolic process)	At2g27500	2,23	0,0389
glycosyl hydrolase 17 (cation binding - carbohydrate metabolic process)	At3g61810	2,14	0,0075
Autres (5)			
mannosyltransferase	At5g14850	1,71	0,0173
sucrose synthase	At1g73370	3,09	0,0155
glucose-1-phosphate adenylyltransferase subunit (néoglucogénèse)	At5g48300	1,77	0,0292
D-3-phosphoglycerate dehydrogenase (glycolyse)	At1g17745	1,57	0,0172
phosphoglucomutase, cytoplasmic	At1g70730	1,54	0,0220
METABOLISME LIPIDIQUE (17)			
acyl-CoA oxidase	At1g06290	2,52	0,0222
lipase class 3	At1g05790	2,51	0,0071
phospholipase A2	At4g29470	2,37	0,0288
GDSL-motif lipase	At5g15720	2,03	0,0177
lipase-related	At2g44970	1,90	0,0076
lipase class 3	At4g16070	1,89	0,0248
lipase class 3	At3g49050	1,61	0,0278
nonspecific phospholipase C	At3g03540	1,77	0,0320
lipid-binding glycoprotein	At1g04970	2,23	0,0033
glycerophosphoryl diester phosphodiesterase	At5g41080	2,17	0,0124
lipid transfer protein/protease inhibitor	At4g00165	1,90	0,0250
lipid transfer protein/protease inhibitor	At2g14846	1,78	0,0181
short-chain dehydrogenase/reductase	At1g62610	1,80	0,0093
phospholipid/glycerol acyltransferase	At3g05510	1,77	0,0389
phosphoinositide-specific phospholipase C	At3g47290	1,72	0,0158
oleosin / glycine-rich protein (lipid storage)	At5g07600	1,71	0,0084
enoyl-CoA hydratase	At3g60510	1,64	0,0306

Description	Locus	Facteur d'induction	Test t
METABOLISME AZOTE (44)			
Ubiquitine-protéasome-protéases (27)			
26S proteasome regulatory subunit	At5g45620	2,50	0,0169
ubiquitin ligase	At5g57740	2,11	0,0147
polyubiquitin (UBQ3)	At5g03240	1,99	0,0469
ubiquitin family	At4g24990	1,69	0,0202
ubiquitin system component	At1g27750	1,67	0,0105
U-box domain-containing protein	At1g66160	3,34	0,0194
F-box (interaction avec ubiquitin ligases)	At1g11810	2,73	0,0067
F-box (interaction avec ubiquitin ligases)	At1g46984	2,51	0,0054
F-box (interaction avec ubiquitin ligases)	At5g47300	2,20	0,0257
F-box (interaction avec ubiquitin ligases)	At4g13965	2,11	0,0249
F-box (interaction avec ubiquitin ligases)	At2g14500	2,11	0,0254
F-box (interaction avec ubiquitin ligases)	At5g38270	2,04	0,0193
F-box (interaction avec ubiquitin ligases)	At1g66490	1,92	0,0214
F-box (interaction avec ubiquitin ligases)	At5g41500	1,92	0,0136
F-box (interaction avec ubiquitin ligases)	At3g17710	1,90	0,0167
F-box (interaction avec ubiquitin ligases)	At5g38565	1,69	0,0175
E3 ligase activity	At3g55530	2,28	0,0161
armadillo/beta-catenin / U-box domain-containing protein	At5g65200	1,99	0,0283
SKP1 (ubiquitin ligase) interacting partner	At2g02350	1,75	0,0354
ubiquitin-specific protease	At2g22310	2,55	0,0088
serine carboxypeptidase	At5g22860	2,64	0,0324
ATP-dependent Clp protease	At1g33360	2,58	0,0146
Ulp1 protease	At5g20750	2,40	0,0307
vacuolar peptidase	At5g20660	2,24	0,0098
serine-type endopeptidase	At4g26330	1,94	0,0235
Ulp1 protease	At2g14770	1,79	0,0499
aspartyl protease	At3g18490	1,76	0,0164
Synthèses et modifications (8)			
dehydroquininate déhydratase (aromatic amino acids biosynthesis)	At3g06350	3,71	0,0183
lysine decarboxylase	At5g06300	2,28	0,0041
aminométhyltransferase	At1g11860	2,28	0,0065
aminotransferase	At2g22250	1,92	0,0242
cysteine synthase	At3g22460	1,88	0,0229
branched-chain amino acid aminotransferase	At1g10060	1,83	0,0115
serine O-acetyltransferase	At4g35640	1,78	0,0302
arginine biosynthesis protein	At2g37500	1,71	0,0417

Description	Locus	Facteur d'induction	Test t
Cytosquelette (9)			
microfibrillar-associated protein	At4g08580	2,35	0,0263
kinesin-like protein	At5g47820	2,27	0,0396
formin 2	At5g67470	2,24	0,0136
formin 2	At5g58160	2,14	0,0132
kinectin-related	At5g66250	2,21	0,0251
tubulin alpha-1 chain	At1g64740	1,71	0,0245
tubulin alpha-6 chain	At4g14960	1,68	0,0058
myosin heavy chain-related	At3g13190	1,57	0,0243
myosin heavy chain-related	At5g59210	1,74	0,0110
SIGNALISATION (34)			
Kinases (24)			
protein kinase	At1g63600	3,72	0,0250
leucine-rich protein kinase	At1g66150	3,60	0,0164
leucine-rich protein kinase	At5g07180	2,94	0,0081
protein kinase	At2g16620	2,78	0,0186
Snf1-related protein kinase	At3g01090	2,74	0,0079
protein kinase	At2g23450	2,60	0,0092
serine/threonine kinase	At5g03640	2,59	0,0189
receptor serine/threonine kinase	At4g18250	2,53	0,0153
serine/threonine kinase	At2g47060	2,49	0,0063
protein kinase	At5g57035	2,44	0,0221
protein kinase	At5g07140	2,34	0,0107
protein kinase	At3g57740	2,23	0,0364
protein kinase	At5g35980	2,14	0,0180
protein kinase	At2g25760	1,94	0,0197
protein kinase	At5g28290	1,89	0,0284
serine/threonine kinase	At1g48220	1,83	0,0139
leucine-rich protein kinase	At1g53440	1,82	0,0183
3-phosphoinositide-dependent kinase	At5g04510	1,81	0,0213
light repressible receptor protein kinase	At4g29990	1,75	0,0271
bifunctional aspartate kinase/homoserine dehydrogenase	At4g19710	1,73	0,0377
protein kinase	At4g35500	1,63	0,0399
calcium-dependent protein kinase	At3g10660	1,62	0,0128
protein kinase	At5g49470	1,61	0,0395
protein kinase	At3g52890	1,52	0,0078

Description	Locus	Facteur d'induction	Test t
Autres signaux (10)			
transducin family	At4g01860	2,93	0,0265
transducin family	At5g45760	2,71	0,0171
glutamate receptor family	At2g32400	2,54	0,0159
RabGAP/TBC domain-containing protein	At2g30710	2,21	0,0135
Ras-related protein / small GTP-binding protein	At3g46830	2,07	0,0089
transducin family	At4g21520	2,04	0,0232
pirin (calmodulin binding)	At3g59260	1,98	0,0207
GTP-binding protein	At2g27200	1,93	0,0225
GTP-binding protein	At5g08650	1,67	0,0244
calmodulin-7	At3g43810	1,50	0,0266
AUTRES METABOLISMES (22)			
Régulation hormonale (3)			
hydrolase (salicylic acid metabolic process)	At2g23600	1,76	0,0295
auxin-responsive GH3 (red light-specific hypocotyl elongation)	At4g03400	1,75	0,0224
auxin-binding protein 1 (cell elongation and division)	At4g02980	1,63	0,0251
Chaîne respiratoire (4)			
NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 3 (respiration)	At2g07751	2,89	0,0061
ubiquinol-cytochrome C reductase subunit (respiration)	At5g13440	1,95	0,0084
NADH-ubiquinone dehydrogenase, mitochondrial	At5g37510	1,84	0,0204
cytochrome b5 domain-containing protein (transfert d'électrons)	At1g60660	1,83	0,0336
Autres métabolismes (15)			
UDP-glucose:sterol glucosyltransferase (flavonoid biosynthetic process)	At1g43620	2,03	0,0247
autophagy protein (nutrient recycling)	At5g17290	2,78	0,0141
bis(5'-adenosyl)-pentaphosphatase	At5g06340	2,53	0,0127
S-adenosylmethionine synthetase	At2g36880	2,40	0,0088
flavin-containing monooxygenase	At2g33230	2,27	0,0265
acyl groups transferase	At5g07850	2,02	0,0216
phosphoglucosamine mutase	At5g17530	2,00	0,0129
phosphoribosylaminoimidazole carboxylase	At2g37690	1,99	0,0328
acyl groups transferase	At3g23840	1,96	0,0165
dihydroneopterin aldolase (folic acid and derivative metabolic process)	At3g21730	1,95	0,0300
cyclin	At4g19600	1,88	0,0210
exocyst subunit EXO70 (exocytosis)	At1g07725	1,83	0,0338
NAD-dependent epimerase/dehydratase	At2g28760	1,57	0,0075
self-incompatibility protein-related	At5g06040	1,51	0,0121
G2/mitotic-specific cyclin	At4g37490	1,50	0,0277

Description	Locus	Facteur d'induction	Test t
TRANSCRIPTION et TRADUCTION (77)			
Liaison à l'ADN (34)			
myb family transcription factor	At5g17300	4,60	0,0168
CCAAT-box binding transcription factor	At5g47670	2,91	0,0108
mitochondrial transcription termination factor	At1g56380	2,76	0,0312
interact with BZR1 transcription factor	At1g22300	2,74	0,0088
golden2-like transcription factor	At2g20570	2,64	0,0187
MADS-box protein agamous-like	At3g57390	2,63	0,0125
DNA-binding protein	At5g35970	2,54	0,0152
myb family transcription factor	At4g00540	2,35	0,0399
pseudo-response regulator (transcription)	At2g46790	2,30	0,0183
auxin-responsive factor-related	At5g57420	2,27	0,0269
zinc finger (C2H2 type)	At3g45260	2,12	0,0261
myb family transcription factor	At3g29020	2,11	0,0159
bZIP transcription factor	At2g40950	2,10	0,0064
ABA-responsive element-binding protein 2 (bZIP family)	At3g19290	1,99	0,0239
bZIP transcription factor	At5g06960	1,94	0,0192
basic helix-loop-helix (DNA binding)	At5g67060	1,92	0,0079
transcriptional factor B3 family	At2g46530	1,91	0,0275
two-component responsive regulator	At3g56380	1,90	0,0192
transcriptional coactivator p15	At5g09250	1,90	0,0167
homeobox-leucine zipper protein	At3g01470	1,83	0,0360
BolA-like family (transcription regulator)	At5g17560	1,82	0,0242
AT hook motif-containing protein (DNA binding)	At1g48610	1,82	0,0165
basic helix-loop-helix (DNA binding)	At4g36540	1,80	0,0260
basic helix-loop-helix (DNA binding)	At5g61270	1,77	0,0244
basic helix-loop-helix (DNA binding)	At5g57150	1,72	0,0292
TATA box-binding protein-associated factor	At1g04950	1,70	0,0256
remorin family (DNA binding)	At5g61280	1,66	0,0350
myb family transcription factor	At1g68320	1,66	0,0092
transcriptional factor B3 family	At3g53310	1,64	0,0378
zinc finger (GATA type)	At4g32890	1,63	0,0197
DNA-binding protein	At5g47660	1,62	0,0149
bZIP transcription factor	At2g21230	1,59	0,0185
homeobox-leucine zipper protein	At5g06710	1,56	0,0326
bZIP transcription factor	At4g02640	1,51	0,0165

Description	Locus	Facteur d'induction	Test t
Liaison à l'ARN (13)			
RNA recognition protein	At2g43410	3,38	0,0187
pentatricopeptide protein (RNA binding)	At1g63400	3,12	0,0297
pentatricopeptide protein (RNA binding)	At1g71460	3,07	0,0214
pentatricopeptide protein (RNA binding)	At1g13040	2,93	0,0264
RNA recognition protein	At5g16260	2,87	0,0176
pentatricopeptide protein (RNA binding)	At5g50990	2,36	0,0132
agenet domain-containing protein (RNA binding)	At1g68580	2,28	0,0169
pumilio/Puf RNA-binding domain	At4g08840	2,14	0,0029
pentatricopeptide protein (RNA binding)	At3g09040	1,99	0,0193
Gar1 RNA-binding region family protein	At5g18180	1,81	0,0129
pentatricopeptide protein (RNA binding)	At1g13630	1,71	0,0279
LUC7 containing protein (RNA binding)	At5g51410	1,70	0,0240
RNA recognition protein	At1g67950	1,53	0,0246
Autres (30)			
40S ribosomal protein S10	At4g25740	2,97	0,0284
40S ribosomal protein SA	At3g04770	2,73	0,0178
bifunctional nuclease	At1g11190	2,67	0,0171
spliceosome protein	At2g42510	2,60	0,0275
40S ribosomal protein S5	At2g37270	2,53	0,0054
D111/G-patch containing protein (nucleic acid binding)	At5g08535	2,49	0,0150
ribosomal protein	At4g01790	2,46	0,0245
threonyl-tRNA synthetase	At1g17960	2,42	0,0201
FtsJ-like methyltransferase	At5g01230	2,30	0,0217
telomere-binding protein	At3g53790	2,26	0,0203
ribosomal protein L2	At2g07715	2,19	0,0105
histone H1/H5 family	At5g08780	2,19	0,0151
DNA replication licensing factor	At2g16440	2,12	0,0138
eukaryotic translation initiation factor 1A	At5g35680	2,08	0,0119
heterogeneous nuclear ribonucleoprotein	At5g47620	2,04	0,0379
replication protein	At5g61000	2,03	0,0119
replication factor C	At1g21690	2,00	0,0275

Description	Locus	Facteur d'induction	Test t
60S ribosomal protein L35	At3g09500	1,99	0,0171
minichromosome maintenance	At5g44635	1,91	0,0212
DEAD/DEAH box helicase	At4g00660	1,89	0,0212
SOH1 protein (RNA polymerase transcription mediator)	At5g19910	1,84	0,0142
arginine/serine-rich splicing factor	At5g64200	1,82	0,0244
DNA (cytosine-5-)-methyltransferase	At5g49160	1,80	0,0080
60S ribosomal protein L41	At3g56020	1,78	0,0144
40S ribosomal protein S7	At5g16130	1,75	0,0138
60S acidic ribosomal protein P1	At4g00810	1,74	0,0189
seryl-tRNA synthetase	At1g11870	1,72	0,0086
3'(2'),5'-bisphosphate nucleotidase	At5g63990	1,67	0,0068
pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase	At5g22140	1,58	0,0324
RNA helicase	At5g47010	1,57	0,0332

FONCTION INCONNUE (199)

expressed protein	At5g58370	4,71	0,0068
expressed protein	At5g13620	3,89	0,0224
expressed protein	At2g01260	3,33	0,0175
expressed protein	At5g63480	3,21	0,0375
zinc finger (C3HC4-type RING finger) (protein binding)	At2g38185	3,15	0,0417
expressed protein	At5g62580	3,03	0,0324
expressed protein	At2g44000	3,03	0,0237
glycine-rich protein	At2g11005	3,02	0,0311
expressed protein	At5g66540	2,98	0,0294
expressed protein	At5g41810	2,92	0,0167
expressed protein	At4g37090	2,90	0,0234
expressed protein	At4g18400	2,86	0,0141
expressed protein	At5g06310	2,85	0,0219
LOB domain protein 13	At2g30340	2,85	0,0127
hypothetical protein	At1g38950	2,80	0,0173
immunophilin	At5g48580	2,80	0,0108
hypothetical protein	At2g31700	2,78	0,0159
defective chloroplasts and leaves protein-related	At2g40040	2,75	0,0146
expressed protein	At2g10980	2,75	0,0174
LOB domain family protein	At3g50510	2,73	0,0112
expressed protein	At3g13000	2,68	0,0221
hypothetical protein	At1g54470	2,68	0,0189
reversibly glycosylated polypeptide-2	At5g15650	2,67	0,0123
expressed protein	At5g10580	2,66	0,0182

BTB/POZ domain-containing protein	At3g61600	2,66	0,0128
expressed protein	At1g67040	2,63	0,0346
hypothetical protein	At2g07672	2,63	0,0468
expressed protein	At1g67440	2,62	0,0105
expressed protein	At5g01620	2,60	0,0241
expressed protein	At1g17780	2,60	0,0165
leucine-rich protein	At3g20820	2,60	0,0158
expressed protein	At2g31740	2,60	0,0109
expressed protein	At5g08540	2,51	0,0155
no apical meristem	At1g79580	2,50	0,0229
hypothetical protein	At2g10975	2,50	0,0066
phosphate-responsive protein	At4g08950	2,49	0,0196
expressed protein	At1g71850	2,48	0,0075
expressed protein	At2g07702	2,48	0,0087
expressed protein	At1g08800	2,47	0,0143
expressed protein	At1g21390	2,47	0,0165
XH domain-containing protein	At3g29375	2,45	0,0217
expressed protein	At3g06080	2,45	0,0202
expressed protein	At5g06980	2,42	0,0215
XH/XS domain-containing protein	At1g80790	2,40	0,0236
expressed protein	At4g35510	2,39	0,0271
expressed protein	At2g07674	2,37	0,0262
expressed protein	At4g20020	2,36	0,0193
expressed protein	At1g14620	2,33	0,0137
expressed protein	At5g07950	2,33	0,0278

armadillo/beta-catenin repeat family	At4g12710	2,33	0,0179
hypothetical protein	At4g03170	2,32	0,0110
jacalin lectin	At2g39330	2,30	0,0205
expressed protein	At1g10040	2,30	0,0168
zinc finger (HIT type)	At5g37055	2,29	0,0155
expressed protein	At1g22460	2,28	0,0274
expressed protein	At1g43130	2,27	0,0119
peroxisomal membrane protein	At2g14860	2,26	0,0144
expressed protein	At1g07490	2,26	0,0190
hypothetical protein	At4g07430	2,25	0,0200
expressed protein	At2g43540	2,25	0,0068
expressed protein	At3g18295	2,24	0,0176
hypothetical protein	At3g59620	2,24	0,0066
expressed protein	At4g08810	2,23	0,0157
hypothetical protein	At3g06280	2,22	0,0240
expressed protein	At5g56780	2,22	0,0198
zinc finger (DNL type)	At3g54826	2,21	0,0147
expressed protein	At2g43340	2,21	0,0413
LOB domain family protein	At1g06280	2,20	0,0140
expressed protein	At2g34310	2,20	0,0104
hydrolase, alpha/beta fold family protein	At1g52750	2,19	0,0088
zinc finger (C3HC4-type RING finger) (protein binding)	At4g26400	2,19	0,0126
hypothetical protein	At2g14630	2,19	0,0270
expressed protein	At1g27640	2,18	0,0105
expressed protein	At5g06830	2,18	0,0262
expressed protein	At1g53870	2,17	0,0204
expressed protein	At1g26740	2,16	0,0264
hypothetical protein	At2g11010	2,13	0,0183
C2 domain-containing protein	At1g70790	2,13	0,0478
expressed protein	At5g37360	2,13	0,0109
zinc finger (C3HC4-type RING finger) (protein binding)	At4g01023	2,11	0,0126
zinc finger (C3HC4-type RING finger) (protein binding)	At1g57820	2,11	0,0132
leucine-rich protein	At3g06000	2,09	0,0219
kelch repeat-containing protein	At3g07720	2,09	0,0237
expressed protein	At1g27330	2,08	0,0339
expressed protein	At2g41390	2,08	0,0063
expressed protein	At3g02240	2,08	0,0129
expressed protein	At5g48080	2,08	0,0463
hypothetical protein	At4g16040	2,07	0,0209
expressed protein	At3g18560	2,07	0,0115
protein binding	At3g03960	2,07	0,0268
expressed protein	At4g39420	2,07	0,0099
hypothetical protein	At5g20760	2,06	0,0209
CBS domain-containing protein	At4g33700	2,06	0,0311

hypothetical protein	At5g37650	2,05	0,0287
expressed protein	At3g55760	2,05	0,0241
hypothetical protein	At5g39170	2,04	0,0053
expressed protein	At5g13660	2,04	0,0137
expressed protein	At4g30500	2,03	0,0169
endomembrane protein	At1g14670	2,02	0,0118
expressed protein	At3g44280	2,02	0,0168
DDT domain-containing protein	At5g08630	2,02	0,0226
hypothetical protein	At2g10370	2,01	0,0224
expressed protein	At5g04830	2,01	0,0124
expressed protein	At4g27120	2,00	0,0228
hypothetical protein	At4g07452	2,00	0,0052
hypothetical protein	At3g63020	1,99	0,0322
expressed protein	At1g24265	1,99	0,0242
hypothetical protein	At2g10360	1,98	0,0183
expressed protein	At3g56730	1,98	0,0312
senescence-associated protein	At4g30430	1,98	0,0298
zinc finger (C3HC4-type RING finger) (protein binding)	At2g14835	1,98	0,0196
expressed protein	At5g05940	1,97	0,0290
expressed protein	At4g29550	1,97	0,0261
expressed protein	At3g59680	1,95	0,0065
expressed protein	At2g10070	1,94	0,0146
hypothetical protein	At3g43850	1,94	0,0235
expressed protein	At5g32440	1,94	0,0059
expressed protein	At2g02730	1,94	0,0478
expressed protein	At1g76480	1,94	0,0235
expressed protein	At2g40020	1,93	0,0286
expressed protein	At1g67650	1,92	0,0198
expressed protein	At4g39040	1,92	0,0197
expressed protein	At5g47830	1,92	0,0270
expressed protein	At1g10660	1,91	0,0123
ovule development protein	At1g16060	1,91	0,0242
VQ motif-containing protein	At5g08480	1,89	0,0192
hypothetical protein	At4g08820	1,89	0,0252
expressed protein	At1g09290	1,89	0,0279
expressed protein	At2g45860	1,88	0,0122
expressed protein	At3g59910	1,88	0,0159
expressed protein	At1g57540	1,87	0,0113
hypothetical protein	At2g07310	1,87	0,0075
expressed protein	At5g54067	1,86	0,0288
expressed protein	At3g19780	1,86	0,0138
expressed protein	At3g51040	1,86	0,0463
expressed protein	At5g47940	1,86	0,0139
expressed protein	At1g53890	1,85	0,0496

hypothetical protein	At1g15600	1,85	0,0176
expressed protein	At1g67050	1,85	0,0182
hypothetical protein	At4g07521	1,84	0,0359
expressed protein	At1g10990	1,84	0,0252
hypothetical protein	At2g13126	1,84	0,0201
expressed protein	At2g20760	1,84	0,0177
expressed protein	At5g56850	1,83	0,0090
glycine-rich protein	At2g05440	1,82	0,0340
expressed protein	At2g14850	1,81	0,0075
expressed protein	At4g03600	1,80	0,0246
expressed protein	At5g13220	1,80	0,0310
protein binding	At5g06130	1,79	0,0131
hypothetical protein	At2g10390	1,79	0,0177
ethylene-responsive protein paired amphipathic helix repeat- containing protein	At1g09740	1,78	0,0134
	At1g27270	1,78	0,0166
expressed protein	At1g11400	1,76	0,0297
hypothetical protein	At4g05370	1,76	0,0321
expressed protein	At3g50150	1,76	0,0484
leucine-rich repeat (LRR) domains	At1g25570	1,75	0,0300
hypothetical protein	At4g22510	1,74	0,0158
expressed protein	At3g47250	1,74	0,0072
integral membrane family zinc finger protein (protein binding)	At5g19980	1,74	0,0144
	At3g27710	1,74	0,0343
integral membrane family	At5g06200	1,73	0,0207
hypothetical protein	At4g04730	1,73	0,0269
expressed protein	At1g11200	1,72	0,0203
C2 domain-containing protein	At5g06850	1,72	0,0066
expressed protein	At4g19360	1,72	0,0084
expressed protein	At5g57790	1,71	0,0163
expressed protein	At5g65610	1,71	0,0147
expressed protein	At5g51040	1,69	0,0254

hypothetical protein	At5g64720	1,69	0,0177
expressed protein	At5g06220	1,68	0,0231
expressed protein	At5g45480	1,68	0,0185
hypothetical protein	At2g12685	1,67	0,0086
hypothetical protein	At4g07460	1,66	0,0289
hypothetical protein	At2g07290	1,65	0,0115
expressed protein	At5g56530	1,65	0,0125
expressed protein	At2g14830	1,65	0,0259
hypothetical protein	At3g42786	1,65	0,0182
expressed protein	At1g05860	1,64	0,0155
hypothetical protein	At3g30560	1,64	0,0121
expressed protein	At1g11170	1,63	0,0071
hypothetical protein	At5g50710	1,63	0,0143
expressed protein	At1g23510	1,62	0,0401
dentin sialophosphoprotein- related	At5g07980	1,61	0,0142
hypothetical protein	At3g55670	1,60	0,0199
expressed protein	At4g28005	1,60	0,0366
expressed protein	At2g01100	1,59	0,0325
expressed protein	At5g03440	1,59	0,0455
expressed protein	At1g19010	1,59	0,0174
expressed protein	At5g43500	1,58	0,0111
expressed protein	At5g18410	1,57	0,0103
hypothetical protein	At5g61920	1,57	0,0214
zinc finger (C3HC4-type RING finger) (protein binding)	At3g14320	1,54	0,0282
hypothetical protein	At5g32620	1,53	0,0287
hypothetical protein	At5g21130	1,52	0,0318
auxin-responsive protein	At5g66260	1,52	0,0195
guanylyl cyclase-related	At5g05930	1,52	0,0307
hypothetical protein	At3g29560	1,51	0,0211
expressed protein	At3g12320	1,50	0,0144
hypothetical protein	At5g07380	1,50	0,0175

Tableau 28. Gènes sous-exprimés de manière significative dans les racines en réponse au cadmium. Des plantules d'une semaine ont été transférées pendant une semaine sur un milieu contenant 0 ou 100 μM de cadmium. Le ratio d'induction (traité / témoin) correspond à la moyenne de 4 expériences. L'analyse statistique a été réalisée au moyen d'un test t avec un seuil de confiance supérieur à 95 % ($p < 0,05$).

Description	Locus	Facteur d'induction	Test t
TRANSPORTEURS (8)			
Transporteurs ioniques (3)			
cation/hydrogen exchanger	At3g52080	-2,03	0,016
chloride channel protein	At5g49890	-2,13	0,009
iron-responsive transporter	At4g19690	-2,03	0,026
Pompes ATPases (1)			
AAA-type ATPase	At3g29800	-2,68	0,017
Autres transporteurs (4)			
mannitol transporter	At2g16120	-2,21	0,013
importin alpha-1 subunit	At3g06720	-2,20	0,005
importin alpha-1 subunit	At1g32880	-2,02	0,012
vacuolar protein sorting 55 family	At3g11530	-2,08	0,037
DEFENSES (6)			
Interaction plantes / pathogènes (1)			
disease resistance protein (CC-NBS-LRR class)	At1g61180	-2,70	0,040
Anti-oxydants (3)			
peroxidase	At2g18980	-3,83	0,010
glutaredoxin	At4g33040	-3,56	0,039
thioredoxin	At2g40790	-2,44	0,007
Autres protéines de stress (2)			
dehydrin	At3g50980	-2,94	0,025
cytochrome P450 family	At3g20080	-2,29	0,003
PAROI (4)			
Protéines (1)			
proline-rich extensin	At3g28550	-1,676	0,043
Polysaccharides et glycosylation (3)			
pectate lyase	At5g09280	-2,20	0,019
glycosyl hydrolase family 9 (carbohydrate metabolism)	At2g44540	-2,12	0,030
cellulose synthase-like	At4g13410	-2,10	0,043
METABOLISME GLUCIDIQUE (0)			
METABOLISME LIPIDIQUE (2)			
short-chain dehydrogenase/reductase	At2g37540	-2,19	0,006
short-chain dehydrogenase/reductase	At2g47120	-2,01	0,017

Description	Locus	Facteur d'induction	Test t
METABOLISME AZOTE (12)			
Ubiquitine-protéasome-protéases (12)			
F-box family (interaction with ubiquitin ligase)	At4g00755	-2,39	0,050
F-box family (interaction with ubiquitin ligase)	At5g46170	-2,27	0,009
F-box family (interaction with ubiquitin ligase)	At3g10990	-2,21	0,016
F-box family (interaction with ubiquitin ligase)	At1g67190	-2,09	0,006
F-box family (interaction with ubiquitin ligase)	At5g63520	-2,02	0,009
ubiquitin-specific protease	At4g39370	-2,57	0,009
ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase	At1g52450	-2,48	0,005
protease-associated zinc finger (C3HC4-type RING finger)	At1g35630	-2,38	0,038
ubiquitin family	At3g45180	-2,12	0,006
ubiquitin-specific protease	At3g14400	-2,04	0,022
cysteine protease	At5g67170	-2,34	0,007
prolyl oligopeptidase	At5g66960	-2,16	0,007
SIGNALISATION (10)			
Kinases (5)			
protein kinase	At4g00330	-2,57	0,024
protein kinase	At1g79640	-2,26	0,010
phytochrome kinase	At5g04190	-2,17	0,039
phosphatidylinositol 3- and 4-kinase	At1g27570	-2,15	0,009
protein kinase	At2g28590	-2,10	0,007
Phosphatases (4)			
acid phosphatase	At1g25230	-2,70	0,015
phosphatidic acid phosphatase	At2g01180	-2,16	0,011
acid phosphatase	At3g52820	-2,07	0,005
phosphatase 2C	At4g31750	-1,69	0,023
Autres signaux (1)			
signal recognition particle	At1g15310	-2,34	0,011

Description	Locus	Facteur d'induction	Test t
AUTRES METABOLISMES (12)			
Cycle cellulaire (3)			
cylicin-related	At5g10950	-2,57	0,037
cyclin	At5g65420	-2,25	0,017
mitotic spindle checkpoint protein	At1g16590	-2,23	0,016
Autres métabolismes (9)			
plastocyanin-like domain-containing protein	At3g53330	-3,33	0,010
aldo/keto reductase	At5g62420	-2,61	0,004
cytochrome b6f complex subunit	At2g26500	-2,56	0,002
aconitate hydratase, cytoplasmic	At4g35830	-2,42	0,044
pleckstrin homology	At1g77730	-2,33	0,008
isoflavone reductase	At1g75280	-2,33	0,012
S-adenosyl-L-methionine:carboxyl methyltransferase	At4g36470	-2,29	0,021
peptidyl-prolyl cis-trans isomerase cyclophilin-type family	At4g33060	-2,22	0,009
UDP-glucosyl transferase (unknown substrate)	At3g53150	-2,09	0,019
TRANSCRIPTION et TRADUCTION (21)			
SNF2 domain-containing protein	At5g22750	-3,06	0,049
ethylene-responsive DEAD box RNA helicase	At5g63120	-2,70	0,005
endonuclease V	At4g31150	-2,52	0,026
PHD finger family	At3g20280	-2,36	0,022
telomere-binding protein	At1g07540	-2,33	0,024
pentatricopeptide repeat-containing protein	At2g06000	-2,32	0,008
DC1 domain-containing protein	At3g46800	-2,31	0,009
nuclear transport factor 2 family protein	At5g48650	-2,27	0,007
60S acidic ribosomal protein P2 (RPP2B)	At2g27710	-2,26	0,008
pentatricopeptide repeat-containing protein	At1g80550	-2,17	0,006
nucleosidase-related	At4g28940	-2,16	0,022
WRKY family transcription factor	At4g31550	-2,16	0,007
DC1 domain-containing protein	At4g13130	-2,13	0,027
basic helix-loop-helix (bHLH) family	At3g25710	-2,13	0,011
eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 5	At2g39990	-2,12	0,040
DC1 domain-containing protein	At1g55420	-2,12	0,043
wave-dampened2	At5g28646	-2,09	0,017
zinc knuckle (CCHC-type) family	At5g32482	-2,04	0,024
exonuclease family	At1g74390	-2,03	0,002
adenine phosphoribosyltransferase	At5g11160	-2,03	0,012
zinc finger (DHHC type) family	At5g20350	-1,72	0,007

**FONCTION
INCONNUE (65)**

meprin and TRAF domain-containing protein	At1g58270	-3,60	0,020
expressed protein	At2g42310	-3,50	0,013
expressed protein	At5g18200	-3,45	0,017
expressed protein	At2g42950	-3,23	0,045
expressed protein	At4g28290	-3,10	0,031
zinc finger (C3HC4-type RING finger) family (protein binding)	At1g47570	-3,06	0,009
expressed protein	At2g04790	-3,02	0,025
expressed protein	At5g10710	-3,00	0,020
BRICK1	At2g22640	-2,93	0,025
zinc finger (C3HC4-type RING finger) family (protein binding)	At2g02160	-2,92	0,014
expressed protein	At5g48090	-2,84	0,001
leucine-rich repeat family protein	At3g26500	-2,78	0,030
expressed protein	At2g06845	-2,73	0,034
Mo25 family	At5g47540	-2,70	0,042
LOB domain family protein	At3g11090	-2,64	0,020
expressed protein	At3g21710	-2,64	0,006
expressed protein	At5g46795	-2,60	0,018
hypothetical protein	At3g29750	-2,60	0,007
expressed protein	At2g46150	-2,58	0,007
hypothetical protein	At5g34820	-2,56	0,031
zinc finger (C3HC4-type RING finger) family (protein binding)	At4g33940	-2,50	0,010
UNC-50 family protein	At2g15240	-2,43	0,002
hypothetical protein	At1g33070	-2,42	0,011
60 kDa inner membrane family protein	At1g24490	-2,42	0,005
membrane protein	At2g19340	-2,41	0,008
expressed protein	At3g01810	-2,41	0,004
expressed protein	At3g60810	-2,39	0,012
expressed protein	At3g59490	-2,38	0,008
expressed protein	At5g45690	-2,37	0,038
expressed protein	At5g25770	-2,35	0,007
hypothetical protein	At4g18680	-2,24	0,032
expressed protein	At2g06030	-2,22	0,019
hypothetical protein	At4g02465	-2,18	0,015
expressed protein	At2g01480	-2,17	0,041
expressed protein	At5g36710	-2,16	0,014
hypothetical protein	At5g25000	-2,16	0,016
hypothetical protein	At5g33806	-2,13	0,002
expressed protein	At5g57340	-2,12	0,018

hypothetical protein	At5g40855	-2,12	0,011
expressed protein	At3g50380	-2,11	0,010
expressed protein	At5g62900	-2,11	0,008
ripening-responsive protein	At5g10420	-2,11	0,007
hypothetical protein	At2g22320	-2,10	0,019
expressed protein	At5g55610	-2,09	0,006
hypothetical protein	At4g03690	-2,08	0,005
expressed protein	At5g50150	-2,07	0,015
expressed protein	At1g15980	-2,06	0,027
expressed protein	At2g44850	-2,06	0,020
expressed protein	At2g20620	-2,05	0,026
expressed protein	At5g12170	-2,04	0,002
leucine-rich repeat family protein	At4g26050	-2,03	0,008
expressed protein	At4g38225	-2,02	0,030
expressed protein	At1g47820	-2,02	0,023
auxin-responsive protein	At5g65670	-2,02	0,021
immunophilin	At3g55520	-2,01	0,010
expressed protein	At1g55675	-2,01	0,017
expressed protein	At4g38320	-2,00	0,030
expressed protein	At3g04630	-2,00	0,012
hypothetical protein	At5g57730	-1,74	0,016
ankyrin repeat family	At2g24600	-1,73	0,002
expressed protein	At5g05040	-1,72	0,044
expressed protein	At5g12050	-1,67	0,013
expressed protein	At5g03900	-1,66	0,034
hypothetical protein	At1g14630	-1,66	0,012
expressed protein	At1g69360	-1,64	0,016

Discussion

DISCUSSION

Les objectifs de ce travail étaient :

1) d'établir si l'écotype Ws d'*A. thaliana* utilisé lors de ce travail présentait des différences de sensibilité au cadmium par rapport à d'autres écotypes tels que Col ou Ler à croissance moins rapide.

2) d'avoir une idée complète de la régulation de la voie de synthèse des phytochélatines (expression des gènes, activités enzymatiques, produits synthétisés). En effet, les données de la littérature liées aux réponses d'*A. thaliana* au cadmium, outre le fait qu'elles aient été réalisées majoritairement avec l'écotype Col, sont partielles et souvent focalisées sur une seule protéine et/ou un seul gène (glutamylcystéine ou glutathion synthétase, phytochélatine synthases ou gènes spécifiques, la plupart du temps *PCS1*). Les conditions de culture et d'exposition au métal étant variables d'une publication à l'autre, il est donc difficile d'obtenir des informations claires sur la régulation de cette voie de synthèse chez *A. thaliana*.

3) d'avoir une vue globale de la régulation du transcriptome d'*A. thaliana* en réponse au cadmium. Les quelques études réalisées jusqu'à présent ne portaient que sur une partie du génome. De plus, les rares expériences réalisées sur la totalité ou la quasi-totalité du transcriptome ont été effectuées dans des temps d'exposition au métal plus courts ou plus longs, avec des concentrations en cadmium plus faibles et sur des plantes plus âgées (Kovalchuk *et al.*, 2005; Herbette *et al.*, 2006).

4) d'initier une étude des mécanismes de phytoaccumulation du cadmium chez un mélèze hybride car les espèces ligneuses présentent des avantages potentiels pour la phytoremédiation par rapport à des herbacées (système racinaire plus développé et biomasse plus importante). De plus, la littérature donne essentiellement des quantifications du métal dans les organes de quelques arbres mais sans explication précise des réponses mises en place. L'étude sur le mélèze apporte donc des informations nouvelles dans le domaine de la phytoremédiation.

I. Le cadmium inhibe le pouvoir germinatif des graines d'*Arabidopsis thaliana* (écotype Ws)

Parmi les concentrations testées, seule la dose de 50 μM permet d'obtenir un taux de germination proche de celui du témoin et des plantules ne montrant pas de signe visible d'altération de croissance. A partir d'une concentration égale ou supérieure à 100 μM , le métal limite le taux de germination ainsi que la taille des plantules. En effet, avec 100 μM de cadmium, le taux de germination ne correspond plus qu'à 57 % de celui du témoin. De plus, à partir de 500 μM , seules des racines se forment alors que les parties aériennes ne se développent pas, même en laissant les graines plus longtemps sur le milieu de culture. Il existe assez peu de références dans la littérature concernant l'effet du cadmium sur la germination de l'arabette et d'autres espèces car la plupart des auteurs débutent les traitements sur des plantules et non pas directement sur des graines.

Sharma et Kumar (2002) ont tout de même mis en évidence une diminution de germination à des concentrations en cadmium similaires aux nôtres (tableau 29). Les taux de germination sont cependant plus élevés : 85 et 75 % par rapport au témoin pour 100 et 200 μM de cadmium. De même, Cho et Seo (2005) ont utilisé des concentrations en cadmium de 300 et 500 μM et ont mesuré le taux de survie des plantules au bout de 3 semaines. Leur résultats indiquent qu'avec 500 μM , environ un tiers des plantes se maintient sur le milieu (alors que nous n'avons obtenu que 20 % de germination par rapport au témoin et uniquement des racines) tandis qu'avec 300 μM , il reste encore 55 % de plantes viables (40 % de germination dans notre cas). Ces différences de résultats peuvent être liées à l'écotype car Sharma et Kumar ont travaillé avec l'écotype Landsberg erecta (Ler) et Cho et Seo avec l'écotype Columbia (Col). Ceci impliquerait donc une sensibilité accrue de Ws par rapport à Ler et Col en ce qui concerne la germination sur un milieu enrichi en cadmium.

Tableau 29. Comparaison du taux de germination de différentes espèces et différents écotypes d'*A. thaliana* en présence de cadmium. n.s. : différence non significative par rapport au témoin. Afin de pouvoir comparer les résultats, les pourcentages de germination ont tous été rapportés à une référence de 100 pour le témoin.

Espèce	[Cd] en μM	Germination (%)	Auteurs
<i>A. thaliana</i> (Ws)	50 - 100 à 500	n.s. - 57 à 20	Nos résultats
<i>A. thaliana</i> (Ler)	100 et 200	85 et 75	Sharma et Kumar (2002)
<i>A. thaliana</i> (Col)	300 et 500	55 et 33	Cho et Seo (2005)
<i>Lupinus luteus</i> (lupin jaune)	50	n.s.	Kopyra et Gwozdz (2003)
<i>Oryza sativa</i> (riz)	50 ou 200	90	Ahsan <i>et al.</i> (2007) ; He <i>et al.</i> (2008) ; Rascio <i>et al.</i> (2008)
<i>Triticum aestivum</i> (blé)	89,2	80	Liu <i>et al.</i> (2007)
<i>Avena sativa</i> (avoine)	7000	50	da Rosa Correa <i>et al.</i> (2006)
<i>Lactuca sativa</i> (laitue)	3500	33	
<i>Brassica campestris</i> (navette)	28500	54	
<i>Pisum sativum</i> (pois)	5 000	40	Mihoub <i>et al.</i> (2005)

Par ailleurs, des travaux réalisés chez le riz et le blé montrent que la germination reste assez forte en présence de doses modérées de cadmium : le taux est en effet aux alentours de 90 et 80 % en présence de 200 et 89,2 μM de cadmium dans le milieu (Ahsan *et al.*, 2007 ; Liu *et al.*, 2007 ; He *et al.*, 2008 ; Rascio *et al.*, 2008). Certaines graines montrent des capacités de germination fortes même en présence d'importantes doses de cadmium allant jusqu'à plusieurs mM. Cependant, la germination des graines de pois n'a été suivie qu'en terme de sortie de radicule et non poursuivie pour l'apparition de l'appareil aérien, ce qui ne permet pas de savoir si les plantules peuvent poursuivre leur développement plus longtemps en présence de cadmium (Mihoub *et al.*, 2005). Les auteurs ont d'ailleurs montré que les radicules font moins de 5 mm au bout de 4 jours alors que chez les témoins, elles atteignent presque 4 cm. De même, pour les travaux réalisés sur l'avoine, la laitue et la navette, les biomasses des plantules germées n'ont pas été reportées dans la publication (da Rosa Correa *et al.*, 2006). Elles ont été calculées pour des concentrations deux fois moins élevées et les résultats montrent déjà des réductions de plus de 60 % par rapport aux témoins.

D'après les données de Gardea-Torresdey *et al.* (2005) reportées dans le tableau 1 (page 5), la concentration en cadmium dans les sols métallifères varie de 10 à 320 mg de cadmium par kg. La concentration de 100 μM de cadmium (dose à partir de laquelle la germination est réduite et les plantules sont moins développées que les témoins) correspond à 11,2 mg de cadmium par kg de milieu, ce qui signifie que la germination de graines d'*Arabidopsis thaliana* directement sur un sol métallifère ne pourrait pas permettre aux plantes de se développer correctement. Dans la suite des expériences, les graines ont donc été mises à germer sur un milieu sans cadmium pendant une semaine avant d'être exposées au métal. Des plantules ayant amorcé les premières étapes de développement végétatif pourraient en effet se révéler plus tolérantes au traitement.

II. Le cadmium modifie la croissance et le développement de la plante

1. La tolérance de Ws est corrélée à une « réponse morphogénique induite par le stress » (RMIS) plus prononcée par rapport à Col

1.1. Définition de la RMIS

La RMIS correspond à une inhibition de la division cellulaire au niveau du méristème apical de racine ainsi que de l'élongation cellulaire (figure 44). Le phénotype observé présente des racines plus courtes, de nombreux poils absorbants formés à proximité de l'apex et une production stimulée de racines latérales (Potters *et al.*, 2007).

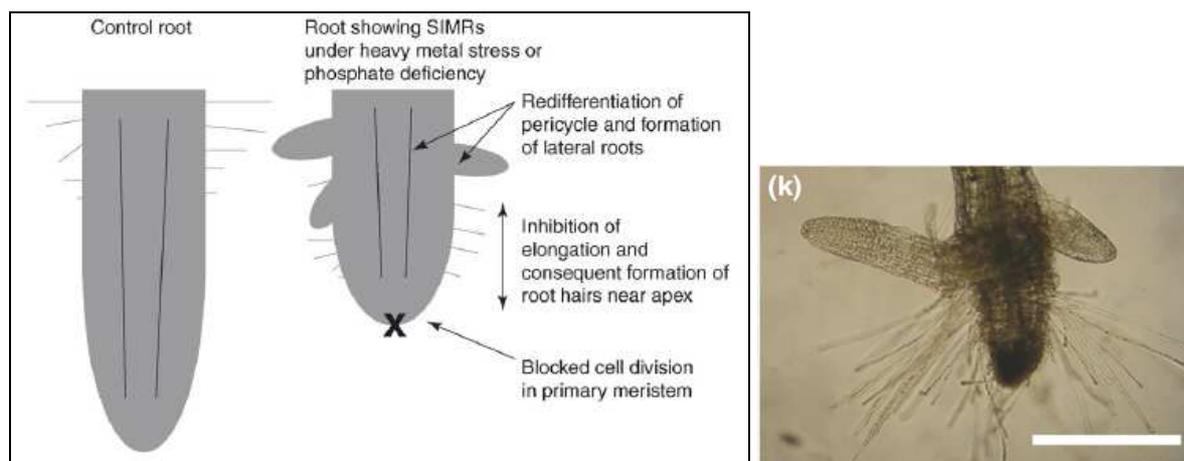


Figure 44. Caractéristiques générales de la réponse morphogénique induite par le stress (RMIS) d'après Potters *et al.* (2007). La photo de droite correspond à l'apex d'une racine d'*Arabidopsis thaliana* (écotype Col) exposée à l'alloxane, un analogue toxique du glucose.

La RMIS n'est pas spécifique du traitement au cadmium car elle a déjà été mise en évidence en réponse à différents stress abiotiques chez l'arabette et chez d'autres espèces (Pasternak *et al.*, 2005a et b ; Potters *et al.*, 2007 et 2009). Elle est induite en réponse à l'exposition à différents ETM (aluminium, cuivre, cadmium, plomb, chrome), à une déficience en source de phosphate ou de sulfure dans le milieu ou encore à un stress oxydant (exposition au paraquat, au peroxyde d'hydrogène). Le même phénotype a été observé en réponse à un stress salin (Zolla *et al.*, 2010). Cette réponse est considérée comme une accommodation des plantes pour échapper à une contrainte d'intensité modérée, une trop forte toxicité n'engendrant pas ce phénotype (Potters *et al.*, 2007). Dans le cas d'une déficience en éléments (phosphate, sulfure), la production des poils absorbants permet d'augmenter la surface d'absorption pour puiser davantage de nutriments au niveau du sol. Dans le cas d'un stress métallique, l'augmentation de la surface d'absorption est interprétée comme une tentative d'«évasion» du milieu potentiellement toxique.

Par ailleurs, la RMIS peut également s'observer au niveau des parties aériennes en réponse à un stress mécanique ou une exposition aux UV-B (Potters *et al.*, 2007). Le phénotype observé est une inhibition de l'élongation de la tige et une augmentation du nombre de ramifications. Nos travaux ayant été réalisés sur des plantules au stade de jeunes feuilles en rosette, nous n'avons pas pu mettre en évidence une élongation perturbée de la tige lors de la transition florale. Avec une dose de 100 μM de cadmium, le nombre de feuilles n'est pas modifié, ce qui laisse penser que, dans nos conditions, la RMIS ne s'est produite qu'au niveau racinaire. Il serait cependant intéressant de traiter les plants plus longtemps et d'analyser les phénotypes observés au niveau du développement de l'appareil aérien.

1.2. Réduction de la longueur de la racine principale

Nos résultats ont montré que la longueur de la racine principale de plantules d'*A. thaliana* est réduite significativement d'un facteur 1,3 dès le traitement avec 50 μM de cadmium et que ce facteur de réduction est le même en réponse à 100 μM de métal. Guo *et al.* (2008) ont mis en évidence une réduction d'un facteur 3,3 et 5 de la longueur de la racine principale chez des plantules d'*A. thaliana* (écotype Col) de 2 jours traitées pendant 14 jours avec 50 et 100 μM de cadmium respectivement. Il est difficile de comparer ces résultats avec les nôtres dans la mesure

où les auteurs ont utilisé des plantules plus jeunes au début du traitement (donc potentiellement plus sensibles) et les ont exposées au métal deux fois plus longtemps. En revanche, les travaux de Sharma *et al.* (2002) ont montré une diminution d'un facteur 1,6 de la longueur de la racine principale lorsque les plantules (écotype Ler) d'une semaine étaient soumises à 25 μM de cadmium pendant 7 jours, soit une concentration 4 fois inférieure à celle que nous avons utilisée. Les travaux de Wojcik et Tukiendorf (2004) sur des plantes plus âgées (7 semaines avant exposition pendant une semaine sur 100 μM de cadmium) font état d'une diminution de l'élongation racinaire d'un facteur 3,5 par rapport aux témoins. Ces deux expériences suggèrent donc que l'écotype Ws serait plus tolérant à l'exposition au cadmium.

Cette réduction de la longueur de la racine principale a été observée chez d'autres espèces : des plants de pois de 7 jours soumis à un traitement de 60 ou 120 μM de cadmium pendant 6 jours présentent une racine principale réduite d'environ 10 et 30 % respectivement (Lima *et al.*, 2006). Des plantules d'orge ayant germé sur un milieu contenant 25 μM de cadmium, présentent des racines réduites de 40 % par rapport aux plantes témoins (Sharma *et al.*, 2004a). Zhou et Qiu (2005) ont également observé une diminution de la longueur des racines chez la plante phytoaccumulatrice *Sedum alfredii* exposée à 800 μM de cadmium pendant 20 jours : les racines sont trois fois plus courtes que celles des témoins (l'âge des plantes au moment du traitement n'est pas précisé dans la publication). De plus, nos résultats obtenus chez le mélèze indiquent une réduction de 60 % de la racine principale pour des plantes de 4 semaines maintenues une semaine sur 1 mM de cadmium.

1.3. Initiation amplifiée de racines latérales et de poils absorbants

Les figures 28 et 32 montrent que les racines secondaires peuvent être également touchées par une réduction de leur longueur lorsqu'elles sont exposées à 50 ou 100 μM . De plus, les plantules initient davantage de racines secondaires et tertiaires et davantage de poils absorbants que les témoins. Les poils absorbants sont initiés beaucoup plus près de l'apex que chez les racines témoins, ce qui indique une disparition de la zone d'élongation observée normalement chez les racines avant la zone de différenciation. Cette observation suggère un arrêt de fonctionnement du méristème apical de racine.

Potters *et al.* (2007) ont montré que des plantules de 6 jours d'*Arabidopsis thaliana* (écotype Col) traitées avec 50 μM de cadmium pendant 48 h présentaient déjà des déformations au niveau des cellules situées vers l'apex. Nous avons observé ce même phénomène chez Ws mais avec la dose de 100 μM , ce qui suggère une sensibilité plus forte de l'écotype Col face au cadmium car nous avons fait nos observations au bout de 7 jours d'exposition au métal. Les auteurs n'ont pas mis en évidence une forte production de poils absorbants ou de racines latérales aussi près de l'apex que chez Ws. Ceci laisse penser que l'écotype Ws pourrait réagir plus vite au stress en produisant des racines latérales et des poils absorbants pour tenter « d'échapper » à la contrainte du milieu. Ce phénomène marquerait donc une plus grande tolérance de Ws au cadmium ou du moins une capacité d'accommodation plus rapidement mise en place.

La RMIS serait liée à une ou plusieurs modification(s) au niveau de l'auxine. Potters *et al.* (2007) ont montré que des plantules d'*Arabidopsis thaliana* (écotype Col) exposées au cadmium présentaient des défauts de distribution de l'auxine. En effet, l'auxine, qui s'accumule normalement au niveau de l'apex, se retrouve localisée au niveau du cylindre central des racines et davantage dans les parties éloignées de l'apex racinaire en réponse au traitement métallique. Ceci induit une activité de division cellulaire (auxine-dépendante) délocalisée et donc la formation de nombreux primordias racinaires latéraux. Potters *et al.* (2009) reportent aussi qu'une surproduction d'auxine peut causer les mêmes effets de délocalisation des zones de divisions cellulaires au niveau des racines. Or nos résultats obtenus avec les microréseaux mettent évidence la surexpression dans les parties aériennes (lieu de synthèse de l'auxine) de 8 gènes codant des protéines interagissant avec l'auxine dont un transporteur d'auxine (auxin efflux carrier, At5g01990). Parallèlement, aucun gène lié au métabolisme de l'auxine n'est sous-exprimé. Il est donc possible qu'une surproduction d'auxine soit un élément clé dans l'apparition de la RMIS. Un dosage d'auxine ainsi qu'une localisation de protéines liées à l'auxine permettraient de confirmer l'hypothèse selon laquelle une surproduction d'auxine causerait une délocalisation de l'accumulation d'auxine et stimulerait la formation de racines latérales.

Les espèces réactives de l'oxygène (ERO) pourraient également contribuer directement ou indirectement à la mise en place de la RMIS (Pasternak *et al.*, 2005a et b ; Potters *et al.*, 2007 et 2009). L'excès de cadmium (comme les autres ETM) génère une oxydation des lipides

membranaires et d'un grand nombre de protéines (Appel et Hirt, 2004 ; Maksymiec et Krupa, 2006). Cette oxydation entraîne l'accumulation d'ERO qui agissent en cascade pour augmenter l'intensité du stress et les dommages cellulaires (Arora *et al.*, 2002). En effet, le cadmium en forte concentration entraîne chez *Arabidopsis thaliana* une accumulation de peroxyde d'hydrogène et une peroxydation des lipides (Cho et Seo, 2005). Les ERO sont certes à l'origine d'un stress oxydant mais peuvent également, lorsqu'elles ne sont pas en concentration trop forte dans la plante, intervenir dans des voies de signalisation liées à la division et à l'élongation cellulaire ainsi qu'à la formation de racines latérales (Li *et al.*, 2007). L'analyse des microréseaux a révélé la surexpression de quelques gènes codant des enzymes anti-oxydantes (voir tableaux 25 et 27) mais assez peu par rapport à toutes les enzymes connues de lutte contre l'oxydation. Ceci pourrait impliquer que : 1) toutes les ERO produites ne seraient pas éliminées et pourraient donc jouer un rôle de signalisation dans la RMIS ; 2) le stress n'est pas suffisamment fort pour induire la génération d'une grande quantité d'ERO (ce qui suggérerait que les enzymes ont une activité constitutive suffisante pour limiter leur teneur) ; 3) toutes les enzymes anti-oxydantes ne sont pas régulées au niveau transcriptionnel.

1.4. La RMIS ne modifie pas la biomasse racinaire

Nos expériences montrent qu'en présence de 50 ou 100 μM , la biomasse racinaire totale de l'arabette n'est pas affectée de manière significative. Ces résultats suggèrent que l'initiation d'un plus grand nombre de racines, voire de poils absorbants, pourrait compenser le raccourcissement de la racine principale et des racines secondaires les plus âgées. La diminution de biomasse a été observée seulement à partir de 200 μM de cadmium avec une réduction de 55 % par rapport aux témoins.

Wojcik et Tukiendorf (2004) ont testé pendant une semaine l'effet de 100 μM de cadmium sur des plantes de l'écotype Col âgées de 7 semaines donc à priori plus résistantes que les plantules Ws âgées de seulement 7 jours au début du traitement. Leurs résultats indiquent une diminution de la biomasse des racines par un facteur d'environ 1,5 par rapport aux témoins alors que dans nos conditions de culture, un traitement des plantules de l'écotype Ws pendant 1 semaine avec 100 μM n'entraîne pas de diminution significative de la biomasse. L'écotype Ws semble donc se révéler plus tolérant à l'exposition au cadmium que l'écotype Col.

La réduction de biomasse racinaire est également mentionnée dans la littérature chez d'autres espèces : des plantules de pois de 5 jours traitées pendant 6 jours avec 60 ou 120 μM de cadmium, présentent une réduction d'environ 25 % de la masse fraîche des racines (Lima *et al.*, 2006). De même, des plantules de maïs de 10 jours exposées 4 jours à 50 ou 200 μM de cadmium présentent une diminution de biomasse de 25 et 50 % respectivement (Rueggsegger et Brunold, 1992). Chez *Thlaspi arvense*, un traitement de 7 jours avec 50 μM de cadmium (sur des plantes âgées au départ de 30 à 40 jours) provoque une réduction de la biomasse racinaire d'un facteur 3,5 (Ebbs *et al.*, 2002). Certaines espèces hyperaccumulatrices peuvent aussi présenter un ralentissement de la production de biomasse. Ainsi des plants d'*Arabidopsis halleri* d'1 mois traités pendant 3 semaines avec 100 μM de cadmium présentent une réduction de biomasse de l'ordre de 70 % (Zhao *et al.*, 2006). Par contre d'autres espèces hyperaccumulatrices sont beaucoup plus tolérantes comme *Thlaspi caerulescens* dont la biomasse n'est pas modifiée en présence de 50 μM de cadmium (Ebbs *et al.*, 2002).

2. Une dose de cadmium de 100 μM n'affecte pas la biomasse aérienne

Différentes concentrations ont été testées chez l'arabette et ont montré que le cadmium est létal lorsque la concentration en métal atteint 1 mM. A des concentrations modérées de 50 et 100 μM , nos résultats montrent que la biomasse aérienne n'est pas modifiée de manière significative. En revanche, à partir de 200 μM , le cadmium a un effet toxique mis en évidence par une diminution de 40 % de la biomasse des parties aériennes. Cette diminution peut s'expliquer à la fois par une diminution de la surface de chaque feuille et également par le nombre de feuilles formées. L'effet du cadmium est moins marqué qu'au niveau des racines car la réduction de biomasse du système racinaire à 200 μM était de 55 %. Ce résultat semble logique dans la mesure où les racines sont les premiers organes à absorber et à accumuler le cadmium.

Une étude a été réalisée avec l'écotype Ler en utilisant des conditions de culture similaires aux nôtres : des plantules d'une semaine ont été transférées pendant une semaine sur un milieu enrichi en cadmium mais avec une concentration de 25 μM (Sharma *et al.*, 2002). Les auteurs ont mis en évidence une diminution de moitié de la biomasse des parties aériennes alors que nous n'avons pas de diminution significative avec 100 μM pour l'écotype Ws. Howden *et al.* (1995)

ont travaillé sur l'écotype Col en exposant des plantules âgées de 8 jours pendant 8 jours sur 15 μM de cadmium. Ils ont ainsi obtenu une diminution de la masse fraîche des parties aériennes de plus de 50 %. Ces expériences, comparées à celles que nous avons réalisées avec l'écotype Ws, suggèrent que ce dernier serait plus tolérant à l'exposition au cadmium donc susceptible d'accumuler de plus fortes quantités de cadmium.

Chez le mélèze, la même tendance a été observée : avec 1 mM de cadmium, la biomasse aérienne n'est pas affectée alors qu'elle diminue d'environ un tiers pour la partie racinaire. La littérature fait mention d'une réduction moins importante de la biomasse des parties aériennes par rapport aux parties racinaires en réponse à une exposition au cadmium. Ainsi, différents cultivars de blé (des espèces *Triticum aestivum* et *T. turgidum*) de 5 jours exposés à 30 μM de cadmium pendant 12 jours présentent une diminution de la masse des parties aériennes d'environ 30 % alors que la masse des parties racinaires est réduite de 45 % (Stolt *et al.*, 2003). Cependant, l'altération plus forte du système racinaire n'est pas toujours mise en évidence. Les travaux précédemment cités de Ruegsegger et Brunold (1992) sur le maïs et de Zhao *et al.* (2006) sur *Arabidopsis halleri* mettent en évidence que les biomasses des parties aériennes et racinaires sont réduites d'un même facteur en présence de cadmium. Le plus surprenant chez *A. halleri*, est que même avec cette forte réduction de croissance (de l'ordre de 70 %), les plantes contiennent des quantités très importantes de cadmium, comme il sera mentionné ultérieurement dans la partie consacrée à la phytoaccumulation. Dans les publications relatives à l'effet du cadmium sur la biomasse, les conditions expérimentales sont très diverses, ce qui rend difficile la formulation d'une conclusion. En effet, la diminution de biomasse peut dépendre à la fois de l'espèce étudiée, de l'âge des plantes au début du traitement, de la durée du traitement et / ou de la concentration en cadmium. Ainsi Peralta-Videa *et al.* (2004) ont clairement montré que l'âge des plantes au moment du traitement peut influencer sur la croissance. Dans leurs expériences, des plants de luzerne (*Medicago sativa*) ont été arrosés avec 500 mg. L⁻¹ de cadmium (à raison de 100 mL pour 1 kg de sol soit une concentration réelle de 50 mg par kg) et la croissance a été évaluée deux semaines plus tard. Les auteurs ont mis en évidence un effet létal sur des plantes âgées de 4 jours au moment du traitement alors que la moitié des plantes de 16 jours sont viables et que 90 % des plantes de 20 jours peuvent se développer sans effet détectable.

La réduction de biomasse peut s'expliquer par une altération de l'activité photosynthétique. En effet, plusieurs auteurs font état d'une diminution de la teneur en chlorophylle et de l'activité du photosystème II en réponse au cadmium : Chugh et Sawhney (1999) chez le pois, Pagliano *et al.* (2006) chez le riz, Mobin et Kahn (2007) chez la moutarde ou encore Ekmekci *et al.* (2008) chez le maïs. D'après ces auteurs, le cadmium perturbe le transfert des électrons et induit la formation d'ERO, ce qui a pour conséquence une altération de l'activité photosynthétique et de l'intégrité membranaire.

3. Bilan de l'effet du cadmium sur la croissance et le développement de l'écotype Ws

En comparant les résultats que nous avons obtenus avec les données de la littérature liées aux écotypes les plus fréquemment utilisés chez l'arabette (Ler et Col), il semblerait que l'écotype Ws soit plus tolérant à l'exposition au cadmium, du moins lors du développement post-germinatif (figure 45). En effet, les biomasses aériennes et racinaires sont moins fortement affectées. Pour la dose de 100 μ M de cadmium sélectionnée pour la suite des expériences, ces biomasses ne varient d'ailleurs pas de manière significative par rapport aux témoins. De plus, la longueur de la racine principale est moins réduite par rapport aux témoins chez Ws. Or la diminution de longueur des racines est un des paramètres observés dans le cas d'une RMIS, ce qui laisse penser que l'écotype Ws est moins sensible à la présence de cadmium dans le milieu. En parallèle, l'initiation rapide de poils absorbants et de racines latérales témoigne d'une mise en place d'un mécanisme d'accommodation au stress.

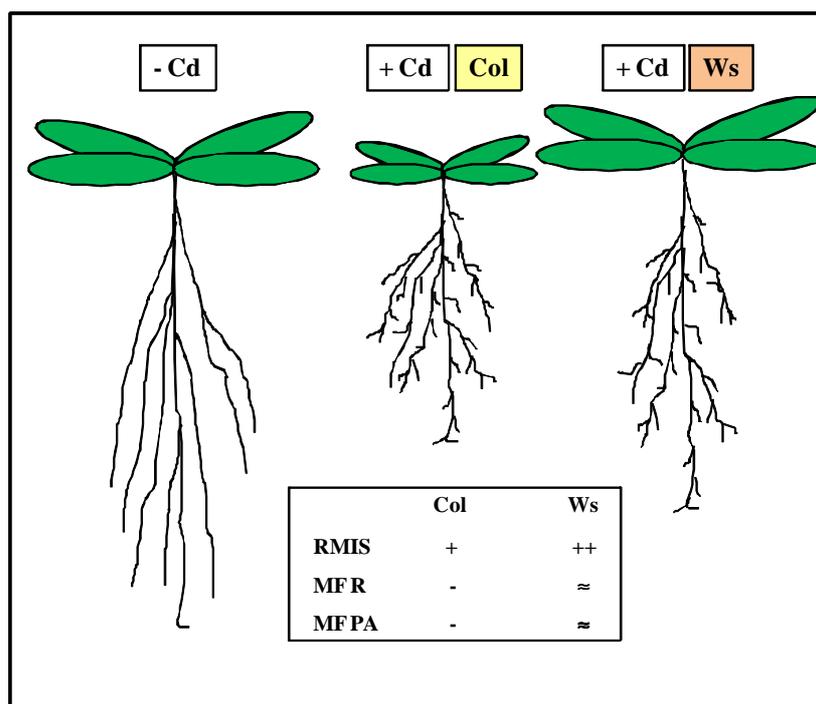


Figure 45. Effet du cadmium chez les écotypes Col et Ws d'*Arabidopsis thaliana*. RMIS : réponse morphogénique induite par le stress, MF : masse fraîche, PA : parties aériennes, R : racines.

III. Réponses spécifiques au traitement métallique : le cadmium induit la production de phytochélatines

1. Le cadmium augmente les teneurs en groupes thiols

Chez *Arabidopsis thaliana*, les résultats ont montré que la teneur en glutathion est similaire dans les parties aériennes et les racines des plantules témoins. De plus, cette teneur ne varie pas de manière significative dans les parties aériennes en réponse au cadmium alors qu'elle est multipliée par 5 dans les racines. Les phytochélatines, quant à elles, n'ont pas été détectées dans les plantes témoins et sont produites en plus grande quantité dans les racines exposées au cadmium que dans les parties aériennes avec un ratio proche de 2. De plus, les PC synthétisées dans les racines sont de type 2 et 3 alors que seules des PC2 ont été détectées dans les parties aériennes. Les racines étant les premiers organes en contact avec le cadmium, le stress est plus important, ce qui semble favoriser la production de PC à chaîne plus longue.

Des travaux réalisés sur des suspensions d'*Arabidopsis thaliana* montrent également qu'une plus forte concentration en cadmium entraîne la production de PC avec davantage de motifs Glu-Cys (Ducruix *et al.*, 2008). En effet, en présence de 5 μM de cadmium, c'est surtout la PC2 qui est détectée alors qu'avec 50 μM c'est la PC3 qui devient majoritaire et avec 200 μM de cadmium, la PC4 est la forme la plus fréquente. La présence de concentrations fortes en cadmium aurait donc pour effet d'augmenter les PC non seulement de manière quantitative mais aussi de manière « qualitative » en favorisant l'élongation de ces oligopeptides. La PCS (ou les PCS, car il existe 2 gènes dont l'expression est discutée dans le paragraphe suivant) pourrait donc avoir davantage d'affinité pour les PC que pour le glutathion. La littérature ne donne cependant pas d'information à ce sujet.

Les travaux réalisés sur la production de phytochélatines par l'écotype Col en réponse au cadmium donnent des résultats variables selon les conditions expérimentales appliquées et les espèces ou écotypes testés (tableau 30). Il est même surprenant de voir qu'avec des conditions similaires, la teneur en PC passe de 375 à 1 000 nmol. g^{-1} MF et celle en glutathion est également différente (Lee *et al.*, 2003a et b). La teneur en PC mesurée par Guo *et al.* (2008) est probablement surestimée car les auteurs ont détecté des PC chez les témoins. Or, les PC ne sont produites qu'en présence de métal d'après la littérature. Ce résultat peut s'expliquer par la technique de dosage utilisée car les auteurs ont dosé les groupes thiols totaux auxquels ils ont retranché la teneur en glutathion. Or, dans les composés riches en groupes thiols se trouvent de la cystéine et de la glutamylcystéine, ce qui pourrait correspondre aux 1 000 nmoles mesurées chez le témoin. Par ailleurs, les travaux de Picault *et al.* (2006) réalisés sur l'écotype Ws montrent que de grandes quantités de PC peuvent être synthétisées mais ils ne sont comparables avec aucune donnée de la littérature car il n'existe pas d'expérience réalisée avec l'écotype Col sur un temps d'exposition au cadmium aussi long (21 jours). Les conditions les plus proches par rapport à celles que nous avons utilisées sont celles de Maksymiec *et al.* (2007) avec un traitement de 6 jours sur 100 μM de cadmium. La différence réside sur l'âge des plantes (écotype Col) au moment du traitement car les auteurs ont travaillé sur des plantes de 7 semaines. Leurs résultats montrent cependant une accumulation 6 fois plus faible de phytochélatines par rapport à des plantes de l'écotype Ws.

Tableau 30. Comparaison de la teneur en glutathion (GSH) et en phytochélatines (PC) chez les écotypes Ws et Col d'*A. thaliana*. en réponse à une exposition au cadmium. PA : parties aériennes, R : racines. Les résultats non précisés comme PA ou R correspondent à des dosages réalisés sur plante entière. GSH : glutathion en nmol. g⁻¹ MF ; PC : phytochélatines en nmol thiols. g⁻¹ MF.

Age avant exposition	Traitement (jours)	[Cd] en µM	GSH (témoin ⇒ traité)	PC	Auteurs
Ws - 7 jours	7	100	125 ⇒ 173 (PA) 127 ⇒ 494 (R)	636 (PA) 996 (R)	Nos résultats
Ws - 7 jours	21	75	500 ⇒ 300 (PA)	6 000 (PA)	Picault <i>et al.</i> (2006)
Col - 8 jours	8	30	250 ⇒ 175	150	Howden <i>et al.</i> (1995)
Col - 10 jours	3	85	500 ⇒ 700	375	Lee <i>et al.</i> (2003a)
Col - 10 jours	3	85	400 ⇒ 460	1 000	Lee <i>et al.</i> (2003b)
Col - 10 jours	4	5	150 ⇒ 150 (PA) 100 ⇒ 100 (R)	17 (PA) 25 (R)	Peterson et Oliver (2006)
Col - 17 jours	5	500	300 ⇒ 400	Non mesuré	Zawoznik <i>et al.</i> (2008)
Col – anthèse (6 semaines)	7	267	150 ⇒ 500	4 500 (témoin à 1 000)	Guo <i>et al.</i> (2008)
Col - 7 semaines	6	100	350 ⇒ 550	250	Maksymiec <i>et al.</i> (2007)

En conclusion, ces résultats suggèrent que l'écotype Ws serait capable de produire davantage de phytochélatines que Col en réponse au cadmium (figure 46). Cette production permettrait de piéger davantage de cations métalliques de manière à limiter leur toxicité, ce qui peut expliquer que la biomasse soit moins affectée chez Ws en réponse à l'exposition au métal.

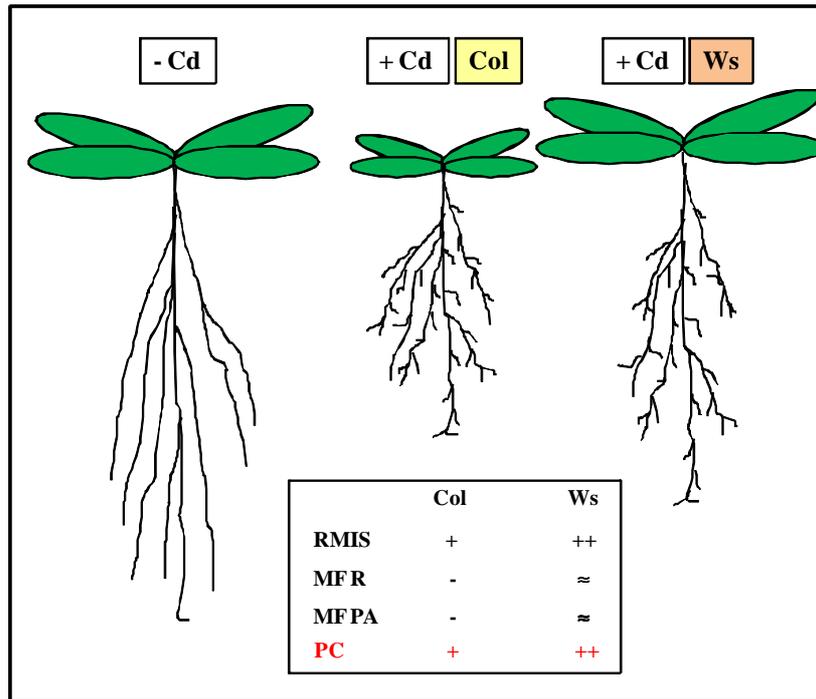


Figure 46. Effet du cadmium chez les écotypes Col et Ws d'*Arabidopsis thaliana* sur la croissance et le développement ainsi que sur la production de phytochélatines. RMIS : réponse morphogénique induite par le stress, MF : masse fraîche, PA : parties aériennes, R : racines, PC : phytochélatines.

2. Le cadmium stimule la voie de synthèse des phytochélatines

L'évolution des activités enzymatiques et de l'expression des gènes codant ces enzymes en présence de cadmium est résumée pour *A. thaliana* (écotype Ws) dans le tableau 31. Ce tableau comparatif permet de montrer que : 1) les activités enzymatiques, plus particulièrement la glutamylcystéine synthétase et la phytochélatine synthase, sont davantage stimulées dans les parties racinaires qu'aériennes, 2) seuls les gènes codant les phytochélatine synthases semblent régulés au niveau transcriptionnel.

Tableau 31. Résumé des activités enzymatiques et expression des gènes codant les enzymes impliquées dans la voie de synthèse des phytochélatines chez *A. thaliana* (Ws) en réponse à l'exposition au cadmium. Les valeurs entre parenthèses correspondent au facteur d'induction par rapport aux témoins. Pour l'expression des gènes, les 2 valeurs indiquées correspondent respectivement aux résultats de la RT-PCR quantitative en temps réel et des microréseaux à oligonucléotides.

Enzyme	Parties aériennes		Racines	
	Activité enzymatique	Expression du gène	Activité enzymatique	Expression du gène
GCS	+ (1,7)	Stable	+++ (3,5)	Stable
GS	Stable	Stable	+ (1,8)	Stable
PCS	+ (1,7)	++ (2,4 à 3,7 pour <i>PCSI</i>)	++ (2,2)	+++ (3,5 à 4,8 pour <i>PCS2</i>)

2.1. Glutamylcystéine et glutathion synthétases

Ces deux premières enzymes de la voie de synthèse des PC catalysent la formation du glutathion, lequel joue plusieurs rôles dans la cellule et notamment dans la régulation de l'état d'oxydo-réduction (Noctor *et al.*, 2002). Il paraît donc logique d'observer une activité de base de ces enzymes dans les plants témoins d'arabette. En présence de cadmium, les activités de ces deux enzymes augmentent dans les racines, ce qui suggère que ces organes synthétisent davantage de glutathion pour limiter l'oxydation des composés cellulaires et / ou pour produire des phytochélatines afin de piéger le cadmium. L'augmentation de la teneur en glutathion et en PC2 et PC3 reportée dans le paragraphe précédent confirme cette hypothèse.

Au niveau des parties aériennes, la présence de cadmium entraîne une augmentation des activités de ces deux enzymes mais de manière plus faible que dans les racines. La quantité de PC et de glutathion étant moins forte dans les parties aériennes, ce résultat semble cohérent. Cependant, l'activité glutathion synthétase n'est pas modifiée de manière significative ce qui peut paraître surprenant. En effet, l'accumulation de PC2 laisse penser que le glutathion est utilisé pour la synthèse de phytochélatines. Il semblerait donc logique que la synthèse de glutathion augmente grâce à l'activation des deux enzymes de sa voie de biosynthèse. Les travaux de Zhu *et al.* (1999) réalisés chez la moutarde chinoise (*Brassica juncea*) vont dans le même sens que les

nôtres : le cadmium régule positivement l'activité glutamylcystéine mais pas l'activité glutathion synthétase. Il est donc possible que dans nos conditions de culture et de traitement, l'activité glutathion synthétase soit suffisante dans les parties aériennes pour permettre la formation de glutathion. Celui-ci serait utilisé au fur et à mesure pour la synthèse des PC, ce qui expliquerait pourquoi la teneur en glutathion ne varie pas. Une autre hypothèse est possible pour expliquer l'accumulation de PC2 malgré l'absence de stimulation de l'activité glutathion synthétase et l'absence d'accumulation de glutathion dans les parties aériennes : les racines pourraient exporter des PC vers les parties aériennes. Ce transport a d'ailleurs déjà été démontré (Gong *et al.*, 2003). Herbet *et al.* (2006) ont mis en évidence qu'en réponse à un traitement au cadmium, la teneur en glutathion foliaire restait stable alors que la teneur en PC augmentait. Ces auteurs ont également émis l'hypothèse d'un transport des PC depuis les racines vers les parties aériennes pour expliquer leurs résultats.

L'expression des gènes codant la glutamylcystéine synthétase et la glutathion synthétase a été suivie par RT-PCR quantitative en temps réel et par les microréseaux. Les résultats ne montrent pas de surexpression réelle des deux gènes en réponse au cadmium, ce qui suggère qu'il n'y aurait pas de régulation de ces enzymes au niveau transcriptionnel. Les travaux de May *et al.* (1998) sur des suspensions cellulaires d'*Arabidopsis thaliana* vont dans le même sens. En effet, les auteurs n'ont pas montré de surexpression de ces deux gènes en réponse à différents traitements dont une exposition au cadmium. De plus, ils ont mis en évidence une stimulation de l'activité glutamylcystéine synthétase mais pas de la glutathion synthétase, résultats que nous avons obtenus concernant les parties aériennes (mais pour les racines, l'activité glutathion synthétase était augmentée).

Une première étude de ces enzymes a été entreprise chez le mélèze après exposition à 1,5 mM de cadmium. Les résultats préliminaires indiquent une stimulation de l'activité des deux enzymes. Le facteur d'induction par rapport au témoin est plus élevé au niveau des racines que dans les parties aériennes pour la glutamylcystéine synthétase. Par contre, il est similaire pour la glutathion synthétase dans les deux parties (aérienne et racinaire). Il semblerait donc ici que la synthèse de glutathion soit stimulée dans toute la plante. Un dosage par HPLC du glutathion et

des PC permettrait de savoir si les PC des parties aériennes sont essentiellement produites « sur place » ou si elles proviennent des parties racinaires comme ce qui est supposé pour l'arabette.

2.2. Phytochélatine synthases

Il existe une activité PCS non négligeable dans les plantes témoins ce qui peut paraître surprenant car la PCS est certes synthétisée en absence de métaux, mais elle est activée par la présence de métal. En effet, la PCS possède un site de liaison aux métaux qui induit l'activation de cette enzyme (Ha *et al.*, 1999 ; Maier *et al.*, 2003). Cependant, les mesures réalisées sont des mesures d'activité *in vitro*, c'est-à-dire avec un ajout de substrats exogènes (glutathion et cadmium). Il est donc logique que les PCS présentes chez les témoins soient activées *in vitro* par l'ajout d'une forte concentration de cadmium (1 mM). D'après les résultats obtenus, il semblerait donc qu'il y ait davantage de PCS synthétisées en réponse au cadmium car les concentrations non limitantes en cadmium et en glutathion utilisées pour les tests d'activités permettent une activation de toutes les PCS présentes. *In vivo*, le cadmium entraînerait donc non seulement une activation de la PCS mais également une synthèse de PCS via une augmentation de l'expression des gènes codant cette enzyme. La PCS pourrait donc être régulée au niveau transcriptionnel.

Les résultats de RT-PCR quantitative en temps réel et des microréseaux confirment la surexpression de gènes codant des PCS. En réponse au cadmium, les résultats indiquent une surexpression significative d'un facteur 2,4 de *PCS1* dans les parties aériennes et d'un facteur 3,5 de *PCS2* au niveau des racines. Très peu de travaux ont été réalisés sur la régulation de l'expression du gène *PCS2*. Cazalé et Clemens (2001) ont montré qu'en absence de stress, le nombre de transcrits de *PCS2* chez l'écotype Col est plus important dans les racines que dans les autres parties de la plante. En réponse à une exposition de 3 ou 24 h au cadmium (10 μ M) de plantes âgées de 6 semaines, les auteurs n'ont cependant pas observé d'augmentation de l'expression de *PCS2* (ni dans les racines, ni dans les parties aériennes). Par ailleurs, Lee *et al.* (2005) ont obtenu des résultats différents : le gène *PCS2* s'exprime très peu dans les racines et dans les parties aériennes dans les arabettes ayant germé et poussé pendant 7 jours sur 50 μ M de cadmium. Les auteurs expliquent leur différence par des techniques de RT-PCR et des choix d'amorces différents. Ces deux publications font donc état soit d'une faible expression de *PCS2* dans toute la plante, soit d'une expression constitutive plus forte dans les racines mais non

amplifiée en réponse au cadmium. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ces différences par rapport à nos résultats :

1) le gène *PCS2* n'est pas surexprimé lorsque la durée d'exposition et / ou lorsque la concentration en cadmium dans le milieu est trop faible. En effet, Cazalé et Clemens ont travaillé sur 3 et 24 h avec 10 μM de cadmium et Lee *et al.* ont utilisé 50 μM de cadmium alors que nous avons fait notre analyse après 7 jours sur 100 μM .

2) l'expression de *PCS2* n'est plus régulée chez des plantes matures. Les plantes étaient en effet âgées de 6 semaines au moment du traitement pour Cazalé et Clemens alors que nous avons utilisé des plantes âgées d'une semaine au moment du transfert.

3) l'écotype Ws surexprime davantage *PCS2* que l'écotype Col.

Peterson et Oliver (2006) ont utilisé des plants d'*Arabidopsis thaliana* surexprimant *PCS1* et ont montré une surexpression plus forte dans les feuilles que dans les racines, ce qui est en accord avec les résultats que nous avons obtenus. Herbette *et al.* (2006) et Lee *et al.* (2002) ont quant à eux montré une surexpression de *PCS1* au niveau de racines exposées au cadmium dans les phases précoces de réponse au métal (quelques heures d'exposition pour des plantes âgées de 3-4 semaines d'après Herbette *et al.*) ou dans les phases précoces de développement de la plante (jusqu'à une dizaine de jours après germination sur cadmium pour Lee *et al.*) mais pas ensuite, même lorsque le cadmium est maintenu dans le milieu. Il semblerait donc que *PCS1* puisse s'exprimer potentiellement dans toute la plante mais que les conditions expérimentales utilisées par les différents auteurs et par nous soient à l'origine de variations des résultats. Il en ressort tout de même que le gène *PCS1* serait surexprimé 1) dans les premières heures d'exposition au cadmium et / ou 2) dans des jeunes plantes (moins de 3 semaines).

Par ailleurs, des travaux contradictoires ont été publiés concernant la régulation transcriptionnelle des gènes codant des PCS. Ainsi pour *PCS1*, plusieurs auteurs ont indiqué une absence de surexpression du gène malgré la stimulation de l'activité PCS en présence de cadmium, ce qui suggérerait dans ce cas une régulation post-transcriptionnelle (Ha *et al.*, 1999 ; Vatamaniuk *et al.*, 2000). De plus, les travaux de Wang *et al.* (2009) ont mis en évidence que la PCS est régulée au niveau post-translationnel par une phosphorylation sur un résidu tyrosine situé à proximité du site catalytique ; la phosphorylation permettant d'achever la conformation du site

catalytique. D'après l'ensemble des publications liées aux PCS, il apparaît donc que les PCS seraient régulées à plusieurs niveaux en réponse au cadmium :

- 1) l'enzyme codée par le gène *PCSI* est activée par phosphorylation (aucun travail n'a été réalisé sur l'enzyme codée par *PCS2* à ce jour mais le domaine correspondant au site catalytique étant très similaire, la régulation est probablement la même).
- 2) le gène *PCSI* est surexprimé chez des plantes jeunes et / ou en réponse à une exposition courte (réponse précoce).
- 3) le gène *PCS2* est surexprimé chez des plantes jeunes et / ou en réponse à une exposition longue (réponse tardive).

Il n'est pas non plus exclu que l'expression des gènes *PCSI* et *PCS2* de l'écotype Ws soit régulée de manière différente par rapport à l'écotype Col. Cependant, la diversité des conditions de culture, de traitement et de concentration en cadmium (ainsi que de techniques de quantification d'expression des gènes) rend difficile la formulation d'une conclusion définitive. Il serait donc intéressant de comparer les réponses de Ws et Col dans des conditions strictement identiques.

3. Hypothèse de régulation de la voie des phytochélatines

Les résultats obtenus avec *A. thaliana* (écotype Ws), permettent de formuler une hypothèse quant à la régulation de la synthèse des phytochélatines et à leur probable transport dans la plante (figure 47). Au niveau racinaire, l'activité des 3 enzymes et la teneur en glutathion et en phytochélatines sont augmentées, ce qui suggère que les racines constituent un premier lieu de piégeage et de stockage du cadmium grâce aux oligopeptides riches en groupes thiols. Au niveau des parties aériennes, la GS et la teneur en glutathion restent stables alors que l'enzyme précédente, la GCS, a une activité stimulée. Ce résultat pourrait être expliqué par une exportation d'une partie de la glutamylcystéine vers les racines qui sont les premiers organes en contact avec le cadmium donc les premiers à devoir mettre en place des réponses de défense. La littérature ne fait cependant pas état d'un transport ou d'une absence de transport de la glutamylcystéine entre les parties aériennes et les racines. Une étude est donc nécessaire pour confirmer ou non l'hypothèse formulée. Cependant, une publication semble aller dans ce sens : il a en effet été

montré chez des peupliers surexprimant une glutamylcystéine synthétase que cette surexpression entraîne une augmentation de la teneur en glutamylcystéine et en glutathion dans le phloème, ce qui traduit un transport possible entre organes (Herschbach *et al.*, 1998).

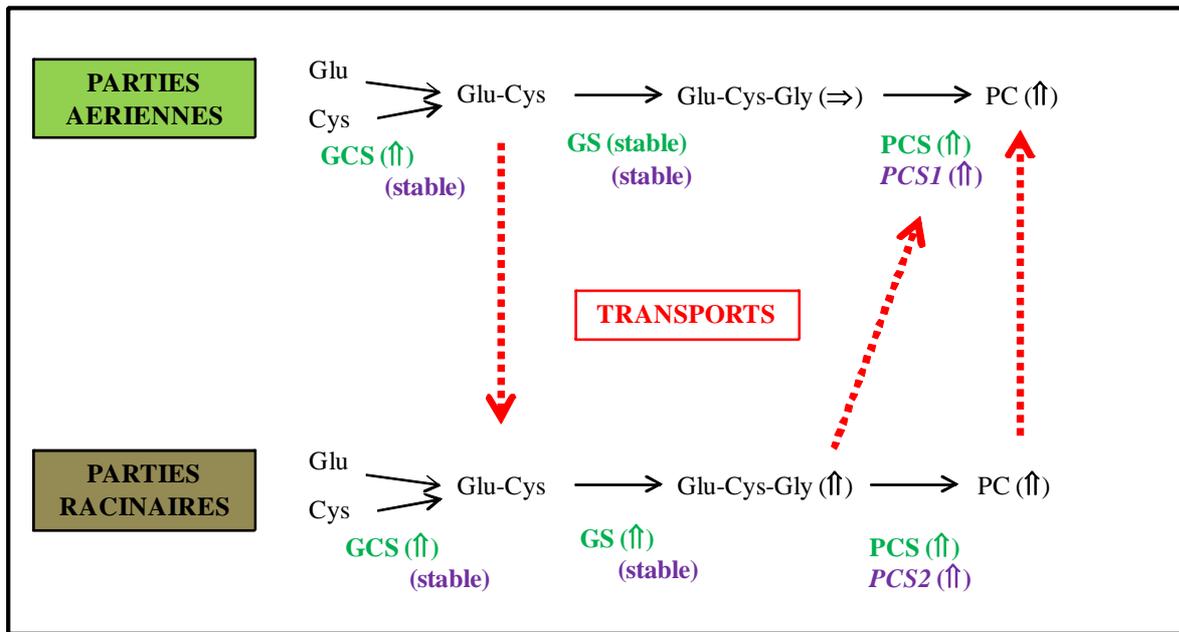


Figure 47. Régulation potentielle de la voie de synthèse des phytochélatines chez *A. thaliana* (écotype Ws) pour des plantules d'une semaine exposées à 100 μM pendant une semaine. Les annotations en vert et en violet correspondent respectivement aux activités enzymatiques et à l'expression des gènes. GCS : glutamylcystéine synthétase ; GS : glutathion synthétase ; PCS : phytochélatine synthase.

Par ailleurs, les résultats ont montré que malgré la stabilité de la GS et de la teneur en glutathion dans les parties aériennes, des phytochélatines sont détectées dans ces organes. L'explication la plus vraisemblable est qu'une partie des phytochélatines produites dans les racines est transportée vers les parties aériennes (Guo *et al.*, 2003). De plus, l'activité PCS est également stimulée dans les parties aériennes, ce qui laisse penser que du glutathion serait également transporté depuis les racines vers les parties aériennes, bien que la littérature ne donne pas d'information permettant de confirmer ou d'infirmer cette supposition.

Les microréseaux ont mis en évidence la surexpression de gènes codant des transporteurs d'oligopeptides proton-dépendants : 3 pour les parties aériennes et 2 pour les racines. Le type d'oligopeptide transporté ainsi que le sens de transport n'est pas précisé dans la base de données

TAIR ; la seule indication concerne une localisation membranaire de ces transporteurs (sans indication plus détaillée sur le type de membrane). Le rôle possible de ces transporteurs proposé dans la figure 48 n'est donc qu'une simple hypothèse qui demande à être confirmée. La littérature ne reportant pas d'information sur le transport de glutamylcystéine et de glutathion, il n'est pas impossible que ces molécules puissent emprunter des transporteurs membranaires pour passer d'une cellule à l'autre et pour transiter entre les parties aériennes et les racines. De même, il a été montré que les phytochélatines peuvent être transportées depuis les racines vers les parties aériennes mais le mode de transport n'a pas été élucidé. Il est donc également possible que ces oligopeptides soient exportés et / ou importés d'une cellule à l'autre via des transporteurs membranaires.

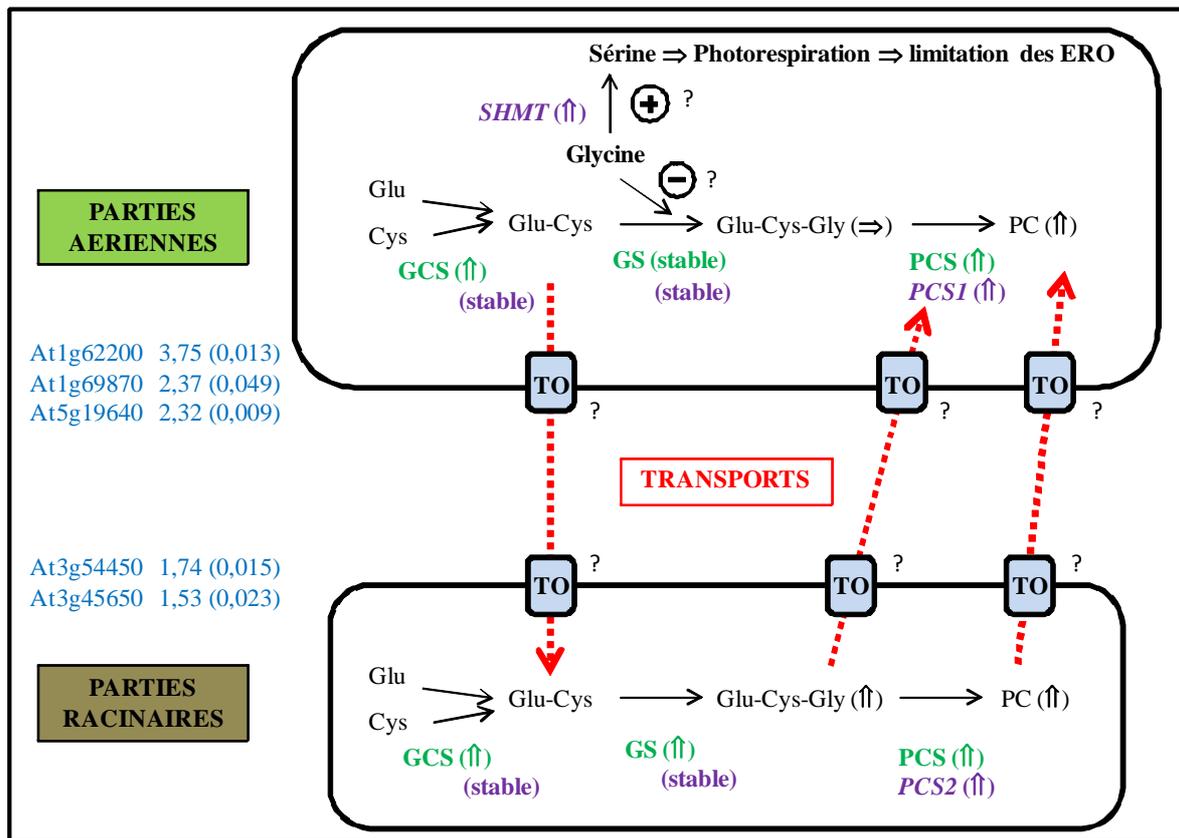


Figure 48. Régulation potentielle de la voie de synthèse des phytochélatines chez *A. thaliana* (écotype Ws) pour des plantules d'une semaine exposées à 100 μ M pendant une semaine. Les annotations en vert et en violet correspondent respectivement aux activités enzymatiques et à l'expression des gènes. GCS : glytamylcystéine synthétase ; GS : glutathion synthétase ; PCS : phytochélatine synthétase ; SHMT : sérine hydroxyméthyl transférase ; ERO : espèces réactives de l'oxygène ; TO : transporteurs d'oligopeptides dont le nom des locus, le facteur de surexpression et la valeur de probabilité (entre parenthèses) sont indiqués en bleu.

Par ailleurs, les microréseaux ont révélé au niveau des parties aériennes la surexpression d'une sérine hydroxyméthyltransférase (*SHMT2* ; facteur d'induction de 2,81), enzyme catalysant la conversion de glycine en sérine dans les mitochondries. Cette surexpression pourrait entraîner une diminution de glycine, qui est un des substrats de la glutathion synthétase. La diminution potentielle de glycine dans les parties aériennes pourrait à son tour expliquer l'absence de stimulation de l'enzyme glutathion synthétase. En parallèle, la sérine intervient dans le processus de photorespiration, plus précisément au niveau des peroxyosomes (Reuman et Webers, 2006). Une étude réalisée sur un mutant d'*Arabidopsis thaliana* déficient en un gène codant une sérine hydroxyméthyl transférase (*SMHT1*) a montré que cette enzyme joue un rôle clé dans la lutte contre différents stress comme un excès de lumière ou une attaque par des agents pathogènes (Moreno *et al.*, 2005). Les auteurs indiquent que l'enzyme participe aux mécanismes de réduction des ERO qui sont générées en réponse aux stress. Or il a été mentionné dans l'introduction bibliographique que le cadmium peut générer un stress oxydant. Les résultats des microréseaux suggèrent donc que l'écotype Ws, en surexprimant *SMHT2*, privilégierait la limitation de production d'ERO au détriment de la synthèse de glutathion dans les parties aériennes.

IV. Transport et phytoaccumulation du cadmium

1. Le cadmium s'accumule différemment dans les racines et les organes aériens

1.1. Le ratio de répartition entre les organes montre un transport important vers les parties aériennes

Faute de matériel biologique suffisant, la quantification du cadmium n'a pu être réalisée chez le mélèze. Par contre, chez *Arabidopsis thaliana* (écotype Ws), l'accumulation de cadmium dans les racines est 1,46 fois plus importante que dans les parties aériennes, ce qui indique une absorption du cadmium et un transport vers les parties aériennes. Ce transport permet en effet à la plante de répartir le métal dans différents organes pour limiter la concentration dans les racines et donc la toxicité localisée du métal (Gong *et al.*, 2003).

Plusieurs travaux ont été reportés concernant l'accumulation de cadmium chez l'écotype Col (tableau 32). Dans la plupart des cas, le rapport racines / parties aériennes est supérieur à

celui que nous avons obtenu avec l'écotype Ws. Les quelques exceptions concernent des travaux réalisés avec des plantes âgées de 4 ou 7 semaines au moment du traitement (Gong *et al.*, 2003 ; Wojcik et Tukiendorf, 2004). Cependant, tous les résultats ne vont pas dans le même sens car des plantes âgées de plusieurs semaines avant le traitement ne présentent pas toutes un ratio du même ordre. La capacité de translocation du cadmium vers les parties aériennes semble dépendre aussi du temps d'exposition et de la concentration en cadmium dans le milieu.

Si les jeunes plantes (moins de 3 semaines) sont prises en considération, il semblerait tout de même que l'écotype Ws soit plus efficace pour transférer le cadmium vers les parties aériennes. Cette stimulation du transport pourrait aussi expliquer la plus forte tolérance de Ws mise en évidence dans la partie II.

Tableau 32. Comparaison de l'accumulation de cadmium chez les écotypes Ws et Col d'*A. thaliana*. La teneur en Cd entre parenthèses correspond aux quantités mesurées dans les racines (R) et les parties aériennes (PA) lorsque les auteurs ont séparé les organes pour les mesures. Les valeurs indiquées en rouge correspondent à une estimation car elles étaient rapportées par g de matière fraîche. D'après les données de la littérature concernant *A. thaliana*, le calcul a été réalisé en considérant que la masse sèche correspond à environ 10 % de la masse fraîche. J : jour, S : semaine.

Age avant exposition	Traitement (J)	[Cd] en μM	[Cd] en $\mu\text{g. g}^{-1}$ MS Total (R + PA)	Ratio R / PA	Auteurs
Ws - 7 J	7	100	278 (165 + 113)	1,46	Nos résultats
Ws - 7 J	21	75	1 250 (PA)		Picault <i>et al.</i> (2006)
Col - 7 J	3	5	636 (503 + 133)	3,8	Peterson et Oliver (2006)
Col - 10 J	3	85	150 (PA)		Lee <i>et al.</i> (2003b)
Col - 12 J	4	200	3 080 (2530 + 550)	4,6	Isaure <i>et al.</i> (2006)
Col - 17 J	5	500	66 (PA)		Zawoznik <i>et al.</i> (2008)
Col - 3 S	1	20	6 600 (5 900 + 700)	8,4	Smeets <i>et al.</i> (2008)
Col - 3 S	1	10	6 700 (6 000 + 700)	8,6	Smeets <i>et al.</i> (2009)
Col - 4 S	3	20	1 350 (800 + 550)	1,45	Gong <i>et al.</i> (2003)
Col - 4 S	14	50	3 750 (3320 + 430)	7,7	Polec-Pawlak <i>et al.</i> (2005)
Col - anthèse (\approx 6 S)	7	267 (30 mg. L^{-1})	1 500		Guo <i>et al.</i> (2008)
Col - 7 S	7 et 14	100	1 550 (1 050 + 500) et 1 700 (800 + 900)	2,1 et 0,9	Wojcik et Tukiendorf (2004)

Au niveau des feuilles, l'épiderme possède des trichomes qui peuvent stocker des métaux au niveau de leur vacuole et notamment du cadmium (Salt *et al.*, 1995 ; Dominguez-Solis *et al.*, 2004). Chez *Arabidopsis thaliana* (écotype Col), il a été montré que la majorité du cadmium présent dans les parties aériennes est localisé au niveau des trichomes (Ager *et al.*, 2002 ; Isaure *et al.*, 2006). Or, Passardi *et al.* (2007) ont mis en évidence que les feuilles de l'écotype Ws possèdent davantage de trichomes que l'écotype Col avec en moyenne 114 trichomes par feuille mature contre 30 respectivement. La densité plus importante de trichomes chez l'écotype Ws pourrait expliquer la capacité de cet écotype à transporter davantage de métal vers les parties aériennes par rapport à l'écotype Col.

La figure 49 reprend les différences observées entre les écotypes Col et Ws. Le transport d'une plus grande proportion de cadmium vers les parties aériennes (peut-être grâce à la plus forte densité de trichomes) va dans le sens de l'hypothèse formulée auparavant d'un transport d'une partie des phytochélatines depuis les racines vers les parties aériennes. Cette stimulation du transport (même si la teneur en cadmium reste plus importante dans les racines) permet donc à la plante de mieux répartir les ions métalliques et de limiter les risques de toxicité, d'autant plus qu'un stockage potentiel de cadmium dans les trichomes est moins dangereux que dans des cellules photosynthétiques. Cette répartition des ions métalliques pourrait donc expliquer l'absence de variation significative des biomasses aérienne et racinaire chez Ws après l'exposition à 100 μ M de cadmium et donc la meilleure tolérance de cet écotype.

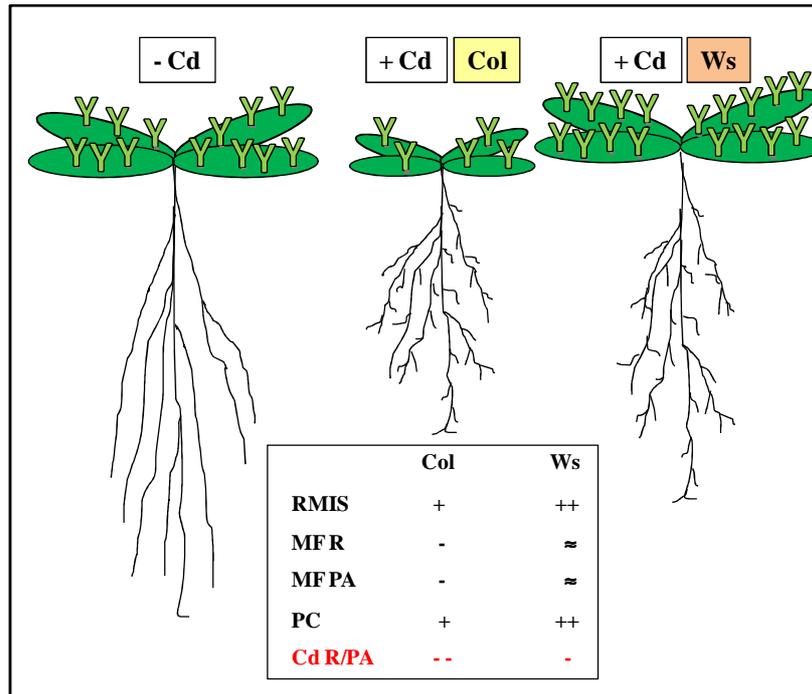


Figure 49. Effet du cadmium chez les écotypes Col et Ws d'*Arabidopsis thaliana* et répartition du cadmium absorbé. RMIS : réponse morphogénique induite par le stress, MF : masse fraîche, PA : parties aériennes, R : racines, PC : phytochélatines. Les symboles verts au niveau des feuilles correspondent à des trichomes.

Par ailleurs, la littérature indique que même dans le cas des espèces hyperaccumulatrices de cadmium, ce métal s'accumule toujours en plus grande quantité dans les racines que dans les parties aériennes. Par exemple, *Lonicera japonica*, espèce hyperaccumulatrice, stocke environ 3 fois plus de cadmium dans les racines que dans les parties aériennes (Liu *et al.*, 2009a). Dans cette publication, les auteurs ont comparé les quantités de cadmium accumulées chez d'autres espèces hyperaccumulatrices et ont ainsi mis en évidence un rapport d'accumulation racines / parties aériennes compris entre 2 et 3 selon les espèces comme par exemple *Thlaspi caerulescens* ou *Arabidopsis halleri*. Dans d'autres cas, le ratio est encore plus élevé : chez l'hyperaccumulatrice *Arabis paniculata*, le rapport d'accumulation de cadmium entre les racines et les parties aériennes est de 6 pour un traitement avec 178 μM de cadmium (pendant 21 jours sur des plantes âgées d'1 mois au début de l'exposition) (Qiu *et al.*, 2008). A l'inverse, chez quelques hyperaccumulatrices, on retrouve presque autant de cadmium dans les parties aériennes que dans les racines, voire un peu plus comme chez *Solanum nigrum* (Sun *et al.*, 2007).

1.2. La quantité de cadmium est plus importante dans les racines

Si l'on considère cette fois la quantité de cadmium accumulé et non plus la répartition entre les organes, les données de la littérature donnent des résultats variables pour l'écotype Col, ce qui rend difficile la comparaison avec l'écotype Ws (tableau 30). Il est assez surprenant de constater par exemple que des plantes de l'écotype Col de 3 semaines, traitées avec 20 μM de Cd pendant seulement 24 h (Smeets *et al.*, 2008) accumulent 2 fois plus de métal que des plantes de 4 semaines traitées avec 50 μM de Cd pendant 14 jours (Polec-Pawlak *et al.*, 2005) ou 4 fois plus que des plantes de 4 semaines traitées avec 20 μM de Cd pendant 3 jours (Gong *et al.*, 2003).

Les quantités de cadmium sont aussi difficilement comparables entre les espèces (même entre phytoaccumulatrices) car les conditions expérimentales sont très variables. Par exemple, au bout de 5 semaines d'exposition au cadmium, *Solanum nigrum* (dont les graines ont été mises à germer directement sur sol contaminé) accumule environ 300 et 250 $\mu\text{g Cd. g}^{-1}$ MS dans les parties aériennes et racinaires respectivement lors d'une exposition à 100 mg. kg^{-1} (environ 90 μM) et seulement 100 et 60 μg en réponse à un traitement à 10 mg. kg^{-1} (Sun *et al.*, 2007). Des graines de *Lonicera japonica* mises à germer et laissées 3 semaines sur un milieu contenant 100 mg Cd. kg^{-1} , peuvent accumuler environ 475, 130 et 16 $\mu\text{g. g}^{-1}$ MS dans les racines, tiges et feuilles respectivement et jusqu'à 1 555, 470 et 52 μg lorsque le milieu contient 50 mg Cd. kg^{-1} (Liu *et al.*, 2009a). De même, les racines d'*Arabidopsis halleri* (plantes d'1 mois exposées 3 semaines au cadmium) accumulent 4 000 $\mu\text{g Cd. g}^{-1}$ MS lorsque le traitement est de 50 μM et 12 800 $\mu\text{g Cd. g}^{-1}$ MS quand la dose de cadmium appliquée est de 100 μM (Zhao *et al.*, 2006).

2. Transporteurs potentiels de cadmium

Les résultats obtenus avec les microréseaux ont mis en évidence la surexpression de gènes codant des transporteurs potentiels de cadmium d'après la littérature (voir l'introduction, troisième partie, paragraphe III) : 13 au niveau des parties aériennes et 8 au niveau racinaire. Les gènes NRAMP sont bien représentés au niveau des organes aériens (NRAMP1 à 4) et moins au niveau racinaire (NRAMP5). Les transporteurs de type NRAMP sont connus pour transporter de nombreux cations métalliques comme le manganèse, le zinc, le cuivre, le fer, le nickel, le cobalt et également le cadmium (Nevo et Nelson, 2006). Les gènes NRAMP3 et 4 ont été localisés chez

A. thaliana comme des transporteurs du tonoplaste (Colangelo et Guerinot, 2006). La surexpression des gènes codant ces protéines favoriserait donc la séquestration du cadmium dans les vacuoles. D'autres transporteurs ont également été mis en évidence : des transporteurs ABC, des membres de la famille MATE (Multidrug And Toxic Compound Extrusion), un CDF et divers transporteurs de métaux ou de cations. Certains transporteurs de type ABC seraient impliqués dans le transport, la séquestration et / ou la redistribution du cadmium chez *A. thaliana* (Bovet *et al.*, 2005).

Il a été montré que des ATPases de la famille HMA (Heavy Metal ATPase), localisées au niveau de la membrane plasmique et à proximité des vaisseaux conducteurs, sont impliquées dans le transport de cadmium, notamment HMA3 et 4 (Gravot *et al.*, 2004 ; Verriet *et al.*, 2004). Elles pourraient jouer un rôle dans le chargement et le déchargement du cadmium au niveau du xylème (Colangelo et Guerinot, 2006). Les gènes codant ces protéines ne ressortent pas de notre analyse mais il est possible que les autres transporteurs mis en évidence soient suffisants pour assurer le transport des racines vers les parties supérieures et le transport intracellulaire pour une séquestration vacuolaire. Par ailleurs, d'autres gènes auraient pu être surexprimés comme des gènes MRP (multi-drug resistant) qui ont été mis en évidence au niveau racinaire en réponse au cadmium (Herbette *et al.*, 2006). Cependant, dans cette publication, l'exposition maximale au métal était de 30 h donc il est possible que certains gènes codant des transporteurs potentiels de cadmium soient surexprimés de manière précoce et d'autres de manière plus tardive, ce qui correspondrait à nos résultats (analyse après 7 jours de traitement au cadmium).

Comme le montrent les tableaux 23 et 24 de la partie « Résultats », les transporteurs potentiels de cadmium, pour lesquels les gènes sont surexprimés, ne sont pas totalement identifiés pour ce qui est de leur localisation cellulaire. En effet, tous les transporteurs n'ont pas été étudiés et les données fournies par la base TAIR, lorsqu'elles ne mentionnent que le terme « membranaire » ou « endomembranaire » pour la localisation, proviennent d'une prédiction de domaines d'après la séquence protéique. Sans localisation précise, un schéma de synthèse de l'accumulation du cadmium basé sur les transporteurs (mis en évidence par les résultats de microréseaux) reste trop hypothétique.

3. Accumulation potentielle du cadmium au niveau pariétal

Les données de la littérature indiquent que le cadmium peut être piégé au niveau vacuolaire mais également au niveau pariétal. Cette accumulation dans les parois peut être importante. Par exemple, la laitue, le riz et la ramie (*Beckmeria nivea*) stockent dans les parois environ 50 à 65 % du cadmium total, quel que soit les organes (racines, feuilles, tiges) (Ramos *et al.*, 2002 ; He *et al.*, 2008 ; Wang *et al.*, 2008). Cependant, Vasquez *et al.* (2007) ont obtenu une distribution différente chez le lupin blanc : la paroi est bien le lieu de stockage majoritaire dans les racines mais le compartiment vacuolaire devient le lieu d'accumulation privilégié au niveau des parties aériennes. A l'inverse, *A. thaliana* accumule le cadmium majoritairement au niveau de la paroi dans les parties aériennes (surtout des trichomes) alors qu'au niveau des racines, le cadmium est essentiellement lié à des composés riches en groupes thiols localisés au niveau intracellulaire (Isaure *et al.*, 2006). La compartimentation du cadmium pourrait donc dépendre non seulement de l'espèce considérée mais aussi de l'organe.

Nos résultats obtenus avec les microréseaux ont mis en évidence une surexpression de plusieurs gènes liés au métabolisme des polysaccharides pariétaux. Certains sont liés à la synthèse et / ou à la modification de molécules : callose synthase (ainsi qu'une glucose transférase depuis le saccharose vers la callose pour les racines), xyloglucane fucosyl transférases et pour les parties aériennes uniquement, une cellulose synthase, une xyloglucane xyloglucosyl transférase, une mannosyl transférase et une galacturonosyl transférase. Ces résultats tendent en faveur d'un renforcement de la paroi cellulaire qui pourrait constituer un frein à la pénétration intracellulaire du cadmium. De plus, nous avons montré la surexpression de gènes codant pour des protéines de structure pariétale, ce qui va également dans le sens d'un épaissement de la paroi.

En parallèle, d'autres gènes surexprimés traduisent une déstabilisation du réseau pectique : polygalacturonases et pectine estérase pour les racines et parties aériennes et de manière plus localisée une pectine acétyl estérase et une glycosyl hydrolase pour les parties aériennes d'une part et 2 galactosidases et un inhibiteur de pectine estérase pour les racines d'autre part. Ces résultats sembleraient indiquer deux types d'action du cadmium sur les polysaccharides pariétaux : 1) une hydrolyse partielle du réseau pectique, et 2) une dé-

estérisation d'acides galacturoniques qui pourrait entraîner une compétition entre les ions calcium et les ions cadmium pour la fixation.

Les réponses générées au niveau pariétal traitées uniquement sous l'aspect de l'expression des gènes ne permettent pas de formuler une hypothèse claire quant à l'impact du cadmium sur ce compartiment. Une quantification des composés pariétaux et du cadmium ainsi qu'une observation des parois en microscopie s'avèrent donc nécessaires pour pouvoir émettre une conclusion.

V. Le cadmium induit également des réponses non spécifiques du stress métallique

Cette partie est liée essentiellement à l'analyse des microréseaux à oligonucléotides. Des expériences complémentaires (activités enzymatiques, quantification des produits formés) sont donc nécessaires pour démontrer les hypothèses qui sont formulées ici.

1. Métabolisme azoté

Chez *A. thaliana*, nos résultats ont montré qu'une exposition avec 100 μM de cadmium ne diminue pas la biomasse de la plante mais cause une réduction de l'élongation de la racine principale et un phénotype racinaire de type RMIS. Ces observations laissent penser que la plante subit un stress mais est tout de même capable de se défendre et de s'accommoder en présence du métal. La quantification de la proline chez *A. thaliana* ne révèle pas de différence significative entre les plantules témoins et les plantules traitées. Il a cependant été montré que la teneur en proline libre augmente en réponse à différents stress dont le cadmium (Chen *et al.*, 2003 ; Dinakar *et al.*, 2008 ; Tamas *et al.*, 2008). Plusieurs rôles sont attribués à cet acide aminé comme le piégeage d'ERO, la protection des protéines contre la dénaturation, la stabilisation des membranes par interaction avec les phospholipides ou encore une fonction dans l'ajustement osmotique chez certaines espèces (Szabados et Savaur, 2009 ; Verbruggen et Hermans, 2009). Le fait que la teneur en proline ne varie pas, suite au traitement des plantules avec 100 μM de

cadmium, laisse penser les plantes ont mis en place des mécanismes de défenses suffisants qui n'entraînent pas de surproduction de proline.

La quantification des protéines solubles totales chez l'arabette n'a pas montré de différence significative entre les témoins et les plantes traitées, ce qui confirme que le stress métallique imposé n'a pas d'effet toxique très marqué. Il en va de même chez le mélèze car les expériences préliminaires ne font pas ressortir de diminution de la teneur en protéines solubles totales dans les parties aériennes ou dans les racines. Cependant une teneur en protéines solubles totales qui varie peu ne signifie pas forcément une absence totale de modification de la synthèse protéique. En effet, nos résultats obtenus avec les microréseaux montrent par exemple la surexpression de nombreux gènes liés au système ubiquitine / protéasome impliqué dans le marquage et la dégradation de protéines (Moon *et al.*, 2004) ou des gènes codant des protéases. Au total, ce sont 41 gènes qui sont surexprimés dans les parties aériennes et 27 dans les racines (tableaux 25 et 27). En parallèle, d'autres gènes liés à des synthèses, modifications et transports d'acides aminés et / ou de protéines sont surexprimés dans les parties aériennes et dans les racines. La protéolyse d'une part, et la synthèse *de novo* d'autre part, suggèrent qu'en réponse au cadmium, les plantes pourraient réorganiser leur contenu enzymatique afin de mieux tolérer le stress, par exemple en produisant des isoformes mieux adaptées.

Par ailleurs, l'analyse des microréseaux montre la surexpression de gènes codant pour des protéines du cytosquelette : 21 gènes pour les parties aériennes et 9 pour les racines. Les gènes mis en évidence codent des protéines de type tubuline, myosine, formine, harpine, kinésine, actine... Schwarzerova *et al.* (2002) ont montré que des cellules de tabac exposées à de l'aluminium produisaient davantage de tubulines et de protéines impliquées dans la polymérisation des tubulines. Le cytosquelette est impliqué notamment dans les processus de division, d'élongation et de différenciation cellulaire (Kost et Chua, 2002 ; Wasteneys et Yang, 2004). La biomasse des parties aériennes n'étant pas affectée avec 100 μ M de cadmium, l'augmentation potentielle de protéines de structure ne semble pas générer de modifications importantes. De plus, visuellement les parties aériennes ne présentent pas d'altérations ou de modification de surface (figure 28). En revanche au niveau racinaire, nous avons observé un ralentissement de l'élongation et une initiation plus forte de racines latérales (phénotype

« RMIS »). Les résultats des microréseaux fournissant des informations au niveau du système racinaire entier, nous ne savons pas si la surproduction potentielle de protéines liées au cytosquelette est répartie de manière homogène dans tout le système racinaire ou si elle est localisée dans certaines zones (près de l'apex, au niveau des racines latérales...). Il est donc difficile de savoir si la surproduction de protéines du cytosquelette pourrait 1) générer une structure cellulaire plus rigide et donc inhiber l'élongation cellulaire, ou 2) participer à l'initiation des racines latérales et des poils absorbants plus nombreux en réponse au cadmium.

2. Lutte contre l'oxydation

En réponse à l'exposition des plantes au cadmium, d'autres biomarqueurs de stress pourraient être suivis, notamment ceux liés à la régulation de l'état d'oxydo-réduction des cellules. En effet, il a été indiqué précédemment que le cadmium peut induire un stress oxydant. Pour limiter la production d'ERO générée par le cadmium, plusieurs enzymes impliquées dans la régulation de l'état d'oxydo-réduction cellulaire sont souvent synthétisées. Cho et Seo (2005) ont par exemple montré que des mutants d'*Arabidopsis thaliana* résistants au cadmium (sélectionnés après un traitement de graines avec du méthane sulfonate d'éthyle) présentaient des activités ascorbate peroxydase, glutathion peroxydase et glutathion réductase stimulées par rapport aux plantes témoins. L'activité superoxyde dismutase (SOD) peut être également stimulée en présence de cadmium (Drazkiewicz *et al.*, 2007). Les auteurs ont mis en évidence une augmentation de la MnSOD (mitochondriale) et de la FeSOD (chloroplastique) dans des feuilles d'*A. thaliana* soumises à un traitement au métal. En revanche, l'activité Cu/ZnSOD (localisée dans le cytoplasme, les chloroplastes, le noyau et l'apoplaste) est diminuée par la présence du métal et pourrait être due d'après les auteurs à une modification au niveau transcriptionnel ou traductionnel. Cette hypothèse a été confirmée par Smeets *et al.* (2008) qui ont montré par RT-PCR quantitative une diminution de la transcription du gène codant pour la Cu/ZnSOD chloroplastique en réponse au cadmium. Les auteurs ont également observé en parallèle une augmentation de la transcription de gènes codant les autres SOD ainsi que d'autres enzymes anti-oxydantes : catalase, ascorbate peroxydase, glutathion réductase.

L'analyse des microréseaux a mis en évidence la surexpression de plusieurs gènes codant des enzymes anti-oxydantes ou d'autres enzymes impliquées dans les défenses. Concernant les enzymes anti-oxydantes, nos expériences n'ont pas fait ressortir de surexpression de gènes codant les enzymes mises en évidence par Smeets *et al.* (2008). Cependant, les conditions de culture sont assez différentes des nôtres car les auteurs ont travaillé sur des plantes de 3 semaines soumises pendant 24 h à des concentrations en cadmium allant de 5 à 20 μM . Les réponses anti-oxydantes de type SOD pourraient être des réponses précoces, ce qui expliquerait pourquoi nous n'avons pas pu les mettre en évidence. Les gènes qui se trouvent surexprimés de manière significative dans nos conditions expérimentales sont essentiellement des thioredoxines et des glutaredoxines ainsi qu'une monodéhydroascorbate réductase uniquement dans les parties aériennes et deux peroxyredoxines ainsi qu'une peroxydase uniquement au niveau racinaire. A l'inverse, peu de gènes liés à la lutte contre l'oxydation sont sous-exprimés en réponse au traitement métallique : une thioredoxine dans les parties aériennes et 3 gènes dans les racines (peroxydase, glutaredoxine et thioredoxine).

3. Autres défenses non spécifiques

L'analyse du transcriptome a montré la surexpression de gènes codant des enzymes impliquées dans des réponses à différents stress. Par exemple, les parties aériennes et racinaires surexpriment des enzymes intervenant dans les interactions plantes / pathogènes mais détectées aussi en réponse à des stress abiotiques : thaumatines, défensines, thionines, chitinases... (Utriainen *et al.*, 1998 ; Porat *et al.*, 1999 ; Mackerness *et al.*, 2001 ; Castro *et al.*, 2008).

Par ailleurs, il a été montré une surexpression de gènes codant des enzymes de type cytochrome P450, des protéines de choc thermique ou encore des « protéines universelles de stress ». Ces protéines sont également impliquées dans la réponse à différents stress biotiques et abiotiques (Werck-Reichhart *et al.*, 2000 ; Wang *et al.*, 2004).

De nombreux gènes liés au processus de signalisation étant surexprimés dans les parties aériennes et racinaires, il apparaît donc que le cadmium pourrait stimuler différentes voies de signalisation aboutissant à des réponses de défenses générales et non pas ciblées spécifiquement

en réponse au cadmium. Ce type de réponse n'est pas surprenant car la littérature indique que l'exposition au cadmium peut engendrer un stress oxydant. Or, d'autres stress aboutissent également à des réactions d'oxydation chez les plantes comme le stress salin, le stress hydrique, les basses et hautes températures, les UV, diverses molécules polluantes du sol ou encore l'agression par des agents pathogènes ou des herbivores. De plus, les ions cadmium peuvent se substituer aux ions calcium au niveau des calmodulines et donc déclencher des voies de signalisation dépendantes du calcium, lesquelles peuvent être activées en réponse à différents stress (Ghelis *et al.*, 2000 ; Perfus-Barbeoch *et al.*, 2002).

VI. La phytoaccumulation du cadmium chez le mélèze

Nos travaux concernant le mélèze sont une première approche et demandent à être confirmés et complétés. Cependant les premiers résultats obtenus sont encourageants en ce qui concerne la concentration sur laquelle les jeunes plantes peuvent pousser sans effet létal. En effet, nous avons montré précédemment pour l'arabette qu'une concentration en cadmium supérieure à 100 μM perturbait fortement la croissance des plantes. Or, les plantules de mélèze ayant été exposées à 1 mM de cadmium ne sont pas affectées au niveau de leur biomasse aérienne et les plantules ayant poussé sur 1,5 mM ne semblent pas non plus altérées au niveau de leurs parties aériennes (même si la quantification de biomasse n'a pas encore été réalisée pour cette concentration). Ceci laisse présager une accumulation de métal plus importante chez le mélèze que chez l'arabette. La quantification prochaine du cadmium permettra de confirmer ou non cette hypothèse.

Dans la littérature, peu de recherche fondamentale est réalisée sur les réponses d'espèces ligneuses à un traitement au cadmium, et même à un traitement métallique de manière générale. En se focalisant uniquement sur le cadmium, les données bibliographiques font état d'expériences réalisées sur des arbres cultivés en serre (Cosio *et al.*, 2006 ; Dos Santos Utmazian *et al.*, 2007) ou situés sur de sites pollués (Sebastiani *et al.*, 2004 ; Unterbrunner *et al.*, 2007), des lots témoins n'étant donc pas disponibles dans ce cas pour effectuer des tests de croissance. Les espèces ligneuses les plus fréquemment citées sont des espèces de peupliers et de saules, lesquelles sont

considérées comme ayant une croissance rapide. Les conditions expérimentales sont variables d'une publication à l'autre : type de substrat, âge des plantes au moment du traitement, concentration en cadmium, durée d'exposition. De plus, selon les espèces et les clones utilisés, les teneurs en cadmium accumulé peuvent être très différentes : deux peupliers hybrides (*Populus deltoides* x *P. yunnanensis* NZ 5006 et *P. deltoides* x *P. nigra* NZ 5015) ainsi qu'un clone de saule (*Salix matsudana* x *S. alba* NZ 1040) ont été cultivés en présence de 60 mg de cadmium par kg de sol, soit environ 530 μM (Robinson *et al.*, 2000). Les boutures de 20 cm ont été exposées pendant une vingtaine de semaines au métal et les résultats ont montré une plus grande accumulation de cadmium chez le saule : 167 mg de métal par kg de matière sèche contre 6 et 75 mg pour les peupliers. Cependant une autre expérience réalisée dans les mêmes conditions à partir d'un autre clone de peuplier provenant d'une zone contaminée a montré une accumulation de 209 mg par kg de matière sèche. Une autre espèce de saule (*S. viminalis*) a été testée : des boutures de 10 cm ont été exposées 15 semaines avec 200 μM de cadmium en conditions hydroponiques (Cosio *et al.*, 2006). Les résultats ont montré une accumulation de 181 mg par kg de matière sèche dans les feuilles et plus de 13 g dans les racines. A notre connaissance, il n'existe pas d'étude réalisée *in vitro* sur des jeunes arbres en réponse au cadmium, ce qui rend difficile l'interprétation de nos premiers résultats obtenus avec le mélèze et la comparaison avec d'autres ligneux.

Par ailleurs, chez le mélèze, les activités des enzymes impliquées dans la voie de synthèse des phytochélatines sont stimulées en réponse au cadmium mais pas de manière forte. Il en va de même pour la production de composés riches en groupes thiols, ce qui suggère probablement une seconde voie de piégeage du métal, peut-être au niveau de la paroi. La voie des phytochélatines n'a jusqu'à présent pas été étudiée en détail chez des espèces ligneuses. En effet, bien souvent, les données principales des publications sont focalisées sur la teneur en cadmium sans chercher à comprendre de quelle manière ce métal transite et s'accumule dans les organes. Quelques travaux ont été réalisés chez des peupliers surexprimant un gène codant une glutamylcystéine synthétase ou une glutathion synthétase mais sans étudier les conséquences sur la synthèse de phytochélatines. Ainsi une surexpression de la glutamylcystéine synthétase chez un peuplier hybride permet de doubler la synthèse de glutamylcystéine et de glutathion mais les auteurs ne se

sont pas intéressés aux phytochélatines produites (Ivanova *et al.*, 2009). Herschbach *et al.* (1998) ont quant à eux montré qu'une surexpression d'un gène codant une glutamylcystéine synthétase chez un peuplier entraînait une augmentation de la teneur en glutamylcystéine et en glutathion dans le phloème mais ces expériences n'ont pas été suivies en réponse à un traitement métallique. D'autres travaux ont montré que la surexpression d'un gène codant une glutamylcystéine synthétase chez une espèce de peuplier permettait au final d'augmenter la quantité de cadmium fixé par la plante (Koprivova *et al.*, 2002). Cependant, aucun dosage de phytochélatines n'a été réalisé pour montrer une corrélation directe entre cette voie et l'accumulation de cadmium. Une autre étude a été réalisée sur des peupliers surexprimant une glutamylcystéine synthétase mais les résultats n'ont quant à eux pas montré d'amélioration réelle de la tolérance vis-à-vis du métal (Arisi *et al.*, 2000). A l'opposé, d'autres auteurs ont montré que des peupliers surexprimant une glutamylcystéine synthétase accumulent davantage de zinc, ce qui laisse penser que le glutathion et / ou les phytochélatines pourraient faire partie des processus de tolérance à certains ETM comme chez les herbacées (Bittsanszky *et al.*, 2005).

La compréhension des mécanismes d'accumulation du cadmium par des Gymnospermes constitue encore à l'heure actuelle un axe de recherche peu développé qui pourrait à l'avenir apporter des réponses nouvelles aussi bien sur le plan fondamental qu'appliqué. Notre première approche de la phytoremédiation du cadmium par un mélèze hybride offre donc des perspectives novatrices et d'intérêt tant du point de vue de la recherche que du point de vue économique et surtout environnemental.

Conclusions et Perspectives

CONCLUSIONS et PERSPECTIVES

Ce travail apporte de nouvelles informations sur les réponses de l'écotype Ws d'*A. thaliana* à l'exposition au cadmium, notamment une tolérance plus importante que les écotypes Col et Ler plus fréquemment utilisés en recherche. L'approche transcriptomique met en évidence l'induction de l'expression de nombreux gènes, notamment des gènes codant des transporteurs potentiels de cadmium dont certains n'ont pas encore fait l'objet d'études à ce jour. Par ailleurs, les travaux préliminaires sur le mélèze hybride offrent des perspectives encourageantes d'utilisation de cette espèce pour la phytoremédiation.

I. Les réponses au cadmium d'*Arabidopsis thaliana*, sont-elles « écotype-dépendantes » ?

Après avoir comparé nos résultats avec ceux obtenus essentiellement pour l'écotype Col, il apparaît que l'écotype Ws est plus tolérant à l'exposition au cadmium :

- 1) les biomasses aériennes et racinaires sont moins fortement affectées pour des concentrations en cadmium similaires,
- 2) la longueur de la racine principale est moins réduite,
- 3) la plante initie plus rapidement des racines latérales et des poils absorbants pour tenter « d'échapper » au stress (phénotype appelé RMIS),
- 4) la teneur en phytochélatines semble plus importante, ce qui favorise une accumulation non toxique du cadmium,
- 5) le ratio de la quantité de cadmium entre les racines et les parties aériennes, même s'il reste en faveur des racines, indique tout de même une plus forte capacité de transport vers les parties aériennes.

Les données de la littérature concernant l'écotype Col donnent des résultats qui ne sont pas toujours révélés faciles à exploiter dans la mesure où de nombreux paramètres varient d'une publication à l'autre. Il serait donc intéressant de mener une étude sur plusieurs écotypes (Col et

Ler, voire d'autres écotypes) dans les mêmes conditions que celles que nous avons utilisées afin de pouvoir comparer les réponses des plantes et apporter une indication claire quant au niveau de sensibilité / tolérance des écotypes en présence de cadmium. Cette étude permettrait de plus d'apporter des informations supplémentaires sur le niveau d'expression du gène *PCS2* afin de savoir s'il existe chez les écotypes une corrélation entre la surexpression de *PCS2* et une tolérance accrue au cadmium. Par ailleurs, les différents travaux concernant essentiellement l'écotype Col ont été réalisés soit sur des jeunes plantes, soit sur des plantes âgées de 3-4 ou 6-7 semaines avant traitement et ne donnent pas forcément des résultats similaires (par exemple le ratio de cadmium entre racines et parties aériennes). Il pourrait donc être intéressant d'étudier l'effet du cadmium chez des plantes matures de l'écotype Ws pour savoir si la tolérance accrue que nous avons observée à travers certains paramètres chez les jeunes plantules (croissance moins ralentie, cadmium davantage transporté vers les parties aériennes) se vérifie encore à l'âge adulte.

Sur un autre plan, l'analyse des microréseaux a révélé des modifications d'expression de gènes liés à la paroi mais qui sont difficiles à exploiter seules. Une étude plus précise des composés pariétaux (quantification, marquages et observations microscopiques) paraît nécessaire pour appréhender les réponses de l'écotype Ws au cadmium. En complément, il serait également nécessaire de mieux localiser l'accumulation du cadmium. Une extraction séparée des compartiments pariétaux et intracellulaires pour le dosage de cadmium permettrait ainsi de savoir où est accumulé préférentiellement le métal et si cette localisation est identique entre les racines et les parties aériennes. De plus, les trichomes pouvant être un lieu de stockage du cadmium, il serait intéressant de procéder à une quantification du métal au niveau de ces cellules, par exemple par microscopie ionique.

Par ailleurs, les résultats obtenus avec les microréseaux ont mis en évidence la surexpression de plusieurs gènes impliqués dans le transport potentiel du cadmium. Cependant, les bases de données ne permettent pas à l'heure actuelle d'identifier précisément la localisation de tous ces transporteurs. Par exemple, nous avons mis en évidence des surexpressions de gènes notés « metal ion transporteur » dans les racines et dans les parties aériennes. Dans la mesure où ces gènes ne sont pas connus davantage, il serait intéressant de les étudier (ainsi que les protéines produites) pour savoir s'ils jouent un rôle important dans le transport ou la séquestration du

cadmium. De même, les gènes notés « transporteurs d'oligopeptides » pourraient faire l'objet d'une étude plus précise pour savoir notamment si les oligopeptides transportés sont des chélateurs de cadmium. Une approche envisageable est l'utilisation de mutants sur- ou sous-exprimant l'un de ces gènes, d'autant plus que l'INRA de Versailles-Grignon propose une banque de mutants d'insertion de l'écotype Ws.

Une autre approche peut également être envisagée pour évaluer le niveau de stress subi par les plantules : comme il a été montré que le cadmium peut générer un stress oxydant, il serait judicieux non seulement de mettre en évidence la présence des ERO formées (H_2O_2 , $O_2^- \dots$), mais également d'étudier l'activité d'enzymes impliquées dans l'élimination des ERO comme la catalase, des SOD ou encore des peroxydases (ascorbate ou glutathion peroxydase) et de mesurer l'intégrité membranaire (par un dosage de malondialdéhyde qui est souvent utilisé pour évaluer l'état des structures membranaires).

II. Le mélèze hybride, une espèce potentiellement phytoaccumulatrice ?

Les premiers résultats obtenus avec le mélèze hybride laissent déjà présager une plus grande tolérance au cadmium que l'arabette car cette dernière peut se développer sans grands dommages en présence de 100 μM de métal alors que les mélèzes sont assez peu affectés par la présence de 1 voire 1,5 mM de cadmium dans le milieu de culture.

Les travaux en cours sont orientés dans un premier temps sur la quantification du cadmium entre racines et parties aériennes et sur l'identification des différents oligopeptides riches en thiols pour avoir une idée plus précise de la teneur en phytochélatines et des différents types de phytochélatines. Dans un second temps, les travaux préciseront la localisation de l'accumulation du cadmium pour savoir notamment si le compartiment pariétal stocke davantage de métal que le compartiment intracellulaire. De plus, une étude est prévue sur la composition et l'organisation de la paroi suite à l'exposition des plantes au cadmium afin de déterminer si le traitement métallique induit des modifications à ce niveau. Une telle approche, développée à

l'origine sur une suspension cellulaire de tomate, est actuellement mise en œuvre sur une autre espèce ligneuse, le Douglas.

Par la suite, d'autres perspectives sont envisagées pour mieux comprendre les réponses du mélèze au traitement métallique. Une approche globale par la protéomique pourrait permettre de cibler certaines voies de défenses à étudier plus en détail par la suite. L'approche transcriptomique globale n'est pas possible dans la mesure où le génome du mélèze n'est pas séquencé. Par comparaison des séquences d'autres espèces, il sera possible de sélectionner des amorces consensus à partir des domaines conservés afin de tenter de quantifier le niveau d'expression de ces gènes par RT-PCR quantitative. Ce travail est envisageable pour les phytochélatine synthases dans la mesure où le domaine phytochélatine synthase est assez bien conservé entre les espèces. En revanche pour les deux enzymes précédentes dans la voie de synthèse, la variabilité est beaucoup plus forte d'une espèce à l'autre, ce qui rend cette approche moins aisée.

Sur un autre plan, les études fondamentales débutées sur le mélèze permettront de déterminer si cette espèce peut être utilisée par la suite en phytoremédiation (du cadmium dans un premier temps). Si les résultats obtenus avec les mélèzes cultivés *in vitro* donnent des résultats satisfaisants, un suivi de plantes en serre cultivées sur des sols pollués sera nécessaire pour se rapprocher davantage des conditions naturelles et proposer cette espèce comme une alternative économique et écologique à l'extraction chimique des métaux sur les sites contaminés.

Références Bibliographiques

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Ager F.J., Ynsa M.D., Dominguez-Solis J.R., Gotor C., Respaldiza M.A., Romero L.C.** (2002). Cadmium localization and quantification in the plant *Arabidopsis thaliana* using micro-PIXE. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B* 189 : 494-498.
- Ahsan N., Lee S.H., Lee D.G., Lee H., Lee S.W., Bahk J.D., Lee B.H.** (2007). Physiological and protein profiles alternation of germinating rice seedlings exposed to acute cadmium toxicity. *Comptes Rendus Biologies* 330 : 735-746.
- Albersheim P., Darvill A.G., O'Neill M.A., Schols H.A., Voragen A.G.J.** (1996). An hypothesis: the same six polysaccharides are components of the primary cell wall of all higher plants. In "Pectins and Pectinases", Eds. Visser J., Voragen A.G.J., Elsevier Science, Amsterdam, pp. 47-55.
- Alloway B.J.** (1995). In "Heavy Metals in Soils", seconde édition, Ed. Alloway B.J., Blackie Academic & Professional, Londres (Royame-Uni).
- Andra S.S., Datta R., Sarkar D., Saminathan S.K.M., Mullens C.P., Bach S.B.H.** (2009). Analysis of phytochelatin complexes in the lead tolerant vetiver grass [*Vetiveria zizanioides* (L.)] using liquid chromatography and mass spectrometry. *Environmental Pollution* 155 : 2173-2183.
- Antosiewicz D.M.** (2005). Study of calcium-dependent lead-tolerance on plants differing in their level of Ca-deficiency tolerance. *Environmental Pollution* 134 : 23-34.
- Appel K., Hirt H.** (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* 55 : 373-399.
- Araujo G.L., Lemos S.G., Nabais C.** (2009). Nickel sorption capacity of ground xylem of *Quercus ilex* trees and effects of selected ligands present in the xylem sap. *Journal of Plant Physiology* 166 : 270-277.
- Arazi T., Sunkar R., Kaplan B., Fromm H.** (1999). A tobacco plasma membrane calmodulin-binding transporter confers Ni²⁺ tolerance and Pb²⁺ hypersensitivity in transgenic plants. *The Plant Journal* 20 (2) : 171-182.
- Arisi A.C.M., Mocquot B., Lagriffoul A., Mench M., Foyer C.H., Jouanin L.** (2000). Responses to cadmium in leaves of transformed poplars overexpressing γ -glutamylcysteine synthetase. *Physiologia Plantarum* 109 : 143-149.
- Arora A., Sairam R. K., Srivastava G. C.** (2002). Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Current Science* 82 : 1227-1238.
- Baize D.** (1997). In "Teneurs totales en éléments traces métalliques dans les sols", Ed. INRA.

- Baker A.J.M., Brooks R.R.** (1989). Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements: A review of their distribution, ecology and phytochemistry. *Biorecovery* 1 : 81-126.
- Baker A.J.M., Reeves R.D., Hajar A.S.M.** (1994). Heavy metal accumulation and tolerance in British populations of the metallophyte *Thlaspi caerulescens* J&C. Presl (Brassicaceae). *New Phytologist* 127 : 61-68.
- Balandin T., Castresana C.** (2002). AtCOX17, an *Arabidopsis* homolog of the yeast copper chaperone COX17. *Plant Physiology* 129 : 1852-1857.
- Barona A, Aranguiz I, Elias A.** (2001). Metal associations in soils before and after EDTA extractive decontamination: implications for the effectiveness of further clean-up procedures. *Environmental Pollution* 113 : 79-85.
- Becwar M.R., Nagmani R., Wann S.R.** (1990). Initiation of embryogenic cultures and somatic embryo development in loblolly pine (*Pinus taeda*). *Canadian Journal of Forest Research* 20 : 810-817.
- Beemster, G.T., De Vusser, K., De Tavernier, E., De Bock, K., Inze, D.** (2002). Variation in growth rate between *Arabidopsis* ecotypes is correlated with cell division and A-type cyclin-dependent kinase activity. *Plant Physiology* 129 : 854-864.
- Bernard C., Roosens N., Czernic P., Lebrun M., Verbruggen N.** (2004). A novel CPx-ATPase from the cadmium hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *FEBS Letters* 569 : 140-148.
- Best E.P.H., Zappi M.E., Fredrickson H.L., Sprecher S.L., Larson S.L., Ochman M.** (1997). Screening of aquatic and wetland plant species for phytoremediation of explosives-contaminated groundwater from the Iowa Army Ammunition Plant. *Annals of the New York Academy of Science* 829 : 179-194.
- Bidwell S.D., Woodrow I.E., Batianoff G.N., Sommer-Knudsen J.** (2002): Hyperaccumulation of manganese in the rainforest tree *Austromyrtus bidwillii* (*Myrtaceae*) from Queensland, Australia. *Functional Plant Biology* 29 : 899-905.
- Bisson M., Vivier S., La Rocca B., Gourland C.** (2009). Point sur les Valeurs Toxicologiques de Référence (VTR). Rapport d'étude INERIS N° DRC-08-94380-11776C.
- Bittsanszky A., Kfmives T., Gullner G., Gyulai G., Kiss J., Heszky L., Radimszky L., Rennenberg H.** (2005). Ability of transgenic poplars with elevated glutathione content to tolerate zinc(2+) stress. *Environment International* 31 : 251-254.
- Bizily S.P., Kim T., Kandasamy M.K., Meagher R.B.** (2003). Subcellular targeting of methylmercury lyase enhances its specific activity for organic mercury detoxification in plants. *Plant Physiology* 131 : 463-471.
- Blaylock M.J., Huang J.W.** (2000). Phytoextraction of metals. In "Phytoremediation of toxic metals: using plants to clean up the environment", Eds. Raskin I., Ensley B.D., New York, pp. 53-71.

- Bluskov S., Arocena J.M., Omotoso O.O., Young J.P.** (2005). Uptake, distribution, and speciation of chromium in *Brassica Juncea*. *International Journal of Phytoremediation* 7 : 153-155.
- Boominathan R., Doran P.M.** (2003). Organic acid complexation, heavy metal distribution and the effect of ATPase inhibition in hairy roots of hyperaccumulator plant species. *Journal of Biotechnology* 101 : 131- 146.
- Boutin C., Esser D., Molle P., Liénard A.** (2000). Les filtres et lits plantés de roseaux en traitement d'eaux usées domestiques. Perspectives pour le traitement d'eaux pluviales. Journée technique du GRAIE (Chambéry, 1^{er} février).
- Bovet L., Feller U., Martinoia E.** (2005). Possible involvement of plant ABC transporters in cadmium detoxification: a cDNA sub-microarray approach. *Environment International* 31 : 263-267.
- Boyes D.C., Zayed A.M., Ascenzi R., McCaskill A.J., Hoffman N.E., Davis K.R., Görlach J.** (2001). Growth stage-based phenotypic analysis of Arabidopsis: a model for high throughput functional genomics in plants. *The Plant Cell* 13 : 1499-1510.
- Brauer S.L., Hneihen A.S., McBride J.S., Wetterhahn K.E.** (1996). Chromium(VI) forms thiolate complexes with glutamylcysteine, *N*-acetylcysteine, cysteine, and the methyl ester of *N*-acetylcysteine. *Inorganic Chemistry* 35 : 373-381.
- Brentner L.B., Mukherji S.T., Merchie K.M., Yoon J.M., Schnoor J.L., Van Aken B.** (2008). Expression of glutathione *S*-transferases in poplar trees (*Populus trichocarpa*) exposed to 2,4,6-trinitrotoluene (TNT). *Chemosphere* 73 : 657-662.
- Broadhurst C.L., Chaney R.L., Angle J.S., Erbe E.F., Mangel T.K.** (2004). Nickel localization and response to increasing Ni soil levels in leaves of the Ni hyperaccumulator *Alyssum murale* "kotodesh". *Plant and Soil Journal* 265 : 225-242.
- Brunet J., Repellin A., Varrault G., Terryn N., Zuily-Fodil Y.** (2008). Lead accumulation in the roots of grass pea (*Lathyrus sativus* L.): a novel plant for phytoremediation systems? *Comptes Rendus Biologies* 331 : 859-864.
- Burken J.G., Schnoor J.L.** (1997). Uptake and metabolism of atrazine by poplar trees. *Environmental science and Technology* 31 : 1399-1406.
- Burnol A., Duro L., Grive M.** (2006). Eléments traces métalliques. Guide méthodologique. Recommandations pour la modélisation des transferts des éléments traces métalliques dans les sols et les eaux souterraines. Rapport INERIS.
- Caçõilo Corticeiro S., Gusmão Lima A.I., Figueira E.M.** (2006). The importance of glutathione in oxidative status of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* under Cd exposure. *Enzyme and Microbial Technology* 40 : 132-137.

- Caffall K.H., Mohnen D.** (2009). The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. *Carbohydrate research* 344 : 1879-1900.
- Callahan D.L., Baker A.J.M., Kolev S.D., Wedd A.G.** (2006). Metal ion ligands in hyperaccumulating plants. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 11 : 2-12.
- Callahan D.L., Kolev S.D., O’Hair R.A.J., Salt D.E., Baker A.J.M.** (2007). Relationships of nicotianamine and other amino acids with nickel, zinc and iron in *Thlaspi* hyperaccumulators. *New Phytologist* 176 : 836-848.
- Cambrollé J., Redondo-Gómez S., Mateos-Naranjo E., Figueroa M.E.** (2008). Comparison of the role of two *Spartina* species in terms of phytostabilization and bioaccumulation of metals in the estuarine sediment. *Marine Pollution Bulletin* 56 : 2037-2042.
- Campbell C.S., Ogden M.** (1999). In “Constructed wetlands in the sustainable landscape”, Ed. Wiley J. et Sons Inc. (Etats-Unis).
- Casati P., Walbot V.** (2004). Rapid transcriptome responses of maize to UV-B in irradiated and shielded tissues. *Genome Biology* 5 : R16.
- Castro A.J., Saladin G., Bézier A., Mazeyrat-Gourbeyre F., Baillieul F., Clément C.** (2008). The herbicide flumioxazin stimulates pathogenesis-related gene expression and enzyme activities in *Vitis vinifera*. *Physiologia Plantarum* 134 : 453-463.
- Cataldo D.A., Harvey S.D., Fellows R.J., Bean R.M., McVeety B.D.** (1989). An evaluation of the environment fate and behavior of munitions material (TNT, RDX) in soil and plant systems. Environmental fate and behavior of TNT. Final Report PNL-7370. Pacific Northwest Laboratory.
- Cazalé A.C., Clemens S.** (2001). *Arabidopsis thaliana* expresses a second functional phytochelatin synthase. *FEBS Letters* 507 : 215-219.
- Chen D., Toone W.M., Mata J., Lyne R., Burns G., Kivinen K., Brazma A., Jones N., Bahler J.** (2003). Global transcriptional responses of fission yeast to environmental stress. *Molecular Biology of the Cell* 14 : 214-229.
- Cho U.H., Seo N.H.** (2005). Oxidative stress in *Arabidopsis thaliana* exposed to cadmium is due to hydrogen peroxide accumulation. *Plant Science* 168 : 113-120.
- Choi Y.E., Harada E., Wada M., Tsuboi H., Morita Y., Kusano T., Sano H.** (2001). Detoxification of cadmium in tobacco plants: formation and active excretion of crystals containing cadmium and calcium through trichomes. *Planta* 213 : 45-50.
- Chrestensen C.A., Starke D.W., Mieyal J.J.** (2000). Acute cadmium exposure inactivates thioltransferase (glutaredoxin), inhibits intracellular reduction of protein-glutathionyl-mixed disulfides, and initiates apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry* 275 : 26556-26565.

- Chugh L.K., Sawhney S.K.** (1999). Photosynthetic activities of *Pisum sativum* seedlings grown in presence of cadmium, *Plant Physiology and Biochemistry* 37 : 297-303.
- Clemens S.** (2002). A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation. *TRENDS in Plant Science* 7 : 309-315.
- Clemens S., Antosiewicz D.M., Ward J.M., Schachtman D.P., Schroeder J.I.** (1998). The plant cDNA *LCT1* mediates the uptake of calcium and cadmium in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95 : 12043-12048.
- Clemens S., Kim E.J., Neumann D., Schroeder J.I.** (1999). Tolerance to toxic metals by a gene family of phytochelatin synthases from plants and yeast. *EMBO Journal* 18 : 3325-3333.
- Clemens S., Persoh D.** (2009). Multi-tasking phytochelatin synthases. *Plant Science* 177 : 266-271.
- Cobbett C., Goldsbrough P.** (2002). Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 53 : 159-182.
- Cobbett C.S.** (2000). Phytochelatins and their roles in heavy metal detoxification. *Plant Physiology* 123 : 825-32.
- Cohen M.D., Prophete C., Sisco M., Chen L., Zelikoff J.T.** (2006). Pulmonary immunotoxic potentials of metals are governed by select physicochemical properties: chromium agents. *Journal of Immunotoxicology* 3 : 69-81.
- Colangelo E.P., Guérinot M.L.** (2006). Put the metal to the petal: metal uptake and transport throughout plants. *Current Opinion in Plant Biology* 9 : 322-330.
- Collin-Hansen C., Pedersen S.A., Andersen R.A., Steinnes E.** (2007). First report of phytochelatins in a mushroom: induction of phytochelatins by metal exposure in *Boletus edulis*. *Mycologia* 99 : 161-174.
- Cosgrove D.J.** (1997). Assembly and enlargement of the primary cell wall in plants. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 13 : 171-201.
- Cosio C., Vollenweider P., Keller C.** (2006). Localization and effects of cadmium in leaves of a cadmium-tolerant willow (*Salix viminalis* L.) I. Macrolocalization and phytotoxic effects of cadmium. *Environmental and Experimental Botany* 58 : 64-74.
- Curie C., Panaviene Z., Loulergue C., Dellaporta S.L., Briat J.F., Walker E.L.** (2001). Maize yellow stripe1 encodes a membrane protein directly involved in Fe(III) uptake. *Nature* 409 : 346-349.
- Curl E.A., Truelove B.** (1986). Rhizosphere in relation to plant nutrient and growth. In "The Rhizosphere", Eds. Bommer D.R., Sabey B.R., Thomas G.W., Vaadia Y., Van Vleck L.D., Springer-Verlag, New York, pp. 167-190.

- Da Rosa Correa A.X., Rorig L.R., Verdinelli M.A., Cotellet S., Férard J.F., Radetski C.M.** (2006). Cadmium phytotoxicity: Quantitative sensitivity relationships between classical endpoints and antioxidative enzyme biomarkers *Science of the Total Environment* 357 : 120-127.
- Dakora F.D., Phillips D.A.** (2002). Root exudates as mediators of mineral acquisition in low-nutrient environments. *Plant and Soil* 245 : 35-47.
- Das P., Samantaray S., Rout G.R.** (1997). Studies on cadmium toxicity in plants: a review. *Environmental Pollution* 98 : 29-36.
- Daud M.K., Suna Y., Dawooda M., Hayat Y., Variatha M.T., Wua Y.-X., Raziuddina, Mishkat U., Salahuddine, Najeeba U., Zhua S.** (2008). Cadmium-induced functional and ultrastructural alterations in roots of two transgenic cotton cultivars. *Journal of Hazardous Materials* 161 : 463-473.
- De Burbure C., Buchet J.P., Leroyer A., Nisse C., Haguenoer J.M., Mutti A., Smerhovsky Z., Cikrt M., Trzcinka-Ochocka M., Razniewska G., Jakubowski M., Bernard A.** (2006). Renal and neurologic effects of cadmium, lead, mercury, and arsenic in children: evidence of early effects and multiple interactions at environmental exposure levels. *Environmental Health Perspectives* 114 : 584-590.
- De Souza M.P., Pickering I.J., Walla M., Terry N.** (2002). Selenium assimilation and volatilization from selenocyanate-treated Indian mustard and muskgrass. *Plant Physiology* 128 : 625-633.
- Delhaize E., Ryan P.R., Randall P.J.** (1993). Aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum*) II. Aluminum-stimulated excretion of malic acid from root apices. *Plant Physiology* 103 : 695-702.
- Desbrosses-Fonrouge A.G., Voigt K., Schröder A., Arrivault S., Thomine S., Krämer U.** (2005). *Arabidopsis thaliana* MTP1 is a Zn transporter in the vacuolar membrane which mediates Zn detoxification and drives leaf Zn accumulation. *FEBS Letters* 579 : 4165-4174.
- Deschamps T., Benzaazoua M., Bussière B., Belem T., Mbonimpa M.** (2006). Mécanismes de rétention des métaux lourds en phase solide : cas de la stabilisation des sols contaminés et des déchets industriels. *VertigO – La revue en sciences de l'environnement* 7 : 1-11.
- Dhankher O.P., Rosen B.P., McKinney E.C., Meagher R.B.** (2006). Hyperaccumulation of arsenic in the shoots of *Arabidopsis* silenced for arsenate reductase (ACR2). *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103 : 5413-5418.
- Dinakar N., Nagajyothi P.C., Suresh S., Udaykiran Y., Damodharam T.** (2008). Phytotoxicity of cadmium on protein, proline and antioxidant enzyme activities in growing *Arachis hypogaea* L. seedlings. *Journal of Environmental Sciences* 20 : 199-206.
- Dixon D.P., Laphorn A., Edwards R.** (2002). Plant glutathione transferases. *Genome Biology* 3 : 1-10.

- Domènech J., Mir G., Huguet G., Capdevila M., Molinas M., Atrian S.** (2006). Plant metallothionein domains: functional insight into physiological metal binding and protein folding. *Biochimie* 88 : 583-593.
- Dominguez-Solis J.R., Lopez-Martin M.C., Ager F.J., Ynsa M.D., Romero L.C., Gotor C.** (2004). Increased cysteine availability is essential for cadmium tolerance and accumulation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biotechnology Journal* 2 : 469-476.
- Dos Santos F.S., Magalhaes M.O.L., Mazur N., Brasil do Amaral Sobrinho N.M.** (2007). Chemical amendment and phytostabilization of an industrial residue contaminated with Zn and Cd. *Scientia Agricola* 64 (5) : 506-512.
- Dos Santos Utmazian M.N., Wieshammer G., Vega R., Wenzel W.W.** (2007). Hydroponic screening for metal resistance and accumulation of cadmium and zinc in twenty clones of willows and poplars. *Environmental Pollution* 148 : 155-165.
- Downie A., Miyazaki S., Bohnert H., John P., Coleman J., Parry M., Haslam R.** (2004). Expression profiling of the response of *Arabidopsis thaliana* to methanol stimulation. *Phytochemistry* 65 : 2305-2316.
- Drazkiewicz M., Skorzynska-Polit E., Krupa Z.** (2007). The redox state and activity of superoxide dismutase classes in *Arabidopsis thaliana* under cadmium or copper stress. *Chemosphere* 67 : 188-193.
- Droux M.** (2004). Sulfur assimilation and the role of sulfur in plant metabolism: a survey. *Photosynthesis Research* 79 : 331-348.
- Duarte B., Delgado M., Cacador I.** (2007). The role of citric acid in cadmium and nickel uptake and translocation in *Halimione portulacoides*. *Chemosphere* 69 : 836-840.
- Ducruix C., Vailhen D., Werner E., Fievet J.B., Bourguignon J., Tabet J.C., Ezan E., Junot C.** (2008). Metabolomic investigation of the response of the model plant *Arabidopsis thaliana* to cadmium exposure: Evaluation of data pretreatment methods for further statistical analyses. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 91 : 67-77.
- Dupont F., Fontaine N.Y., Fontaine G.** (2008). La construction, un avenir pour le bois du Limousin. *La Lettre du Limousin* 79 : 11-12.
- Duquène L., Vandenhove H., Tack F., Meers E., Baeten J., Wannijn J.** (2009). Enhanced phytoextraction of uranium and selected heavy metals by Indian mustard and ryegrass using biodegradable soil amendments. *Science of the Total Environment* 407 : 1496-1505.
- Ebbs S., Brady D.J., Kochian L.V.** (1998). Role of uranium speciation in the uptake and translocation of uranium by plants. *Journal of Experimental Botany* 49 : 1183-1190.
- Ebbs S., Lau I., Ahner B., Kochian L.** (2002). Phytochelatin synthesis is not responsible for Cd tolerance in the Cd/Zn hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* (J. & C. Presl). *Planta* 214 : 635-640.

- Ekman D.R., Lorenz W.W., Przybyla A.E., Wolfe L., Dean J.F.** (2003). SAGE analysis of transcriptome responses in *Arabidopsis* roots exposed to 2,4,6-trinitrotoluene. *Plant Physiology* 133 : 1397-1406.
- Ekmekci Y., Tanyolac D., Ayhan B.** (2008). Effects of cadmium on antioxidant enzyme and photosynthetic activities in leaves of two maize cultivars. *Journal of Plant Physiology* 165 : 600-611.
- Entry J.A., Vance N.C., Hamilton M.A., Zabowski D., Watrud L.S., Adriano D.C.** (1996). Phytoremediation of soil contaminated with low concentrations of radionuclides. *Water, Air, and Soil Pollution* 88 : 167-176.
- Estrella-Gomez N., Mendoza-Cózatl D., Moreno-Sanchez R., Gonzalez-Mendoza D., Zapata-Perez O., Martinez-Hernandez A., Santamaria J.M.** (2009). The Pb-hyperaccumulator aquatic fern *Salvinia minima* Baker, responds to Pb²⁺ by increasing phytochelatins via changes in *SmPCS* expression and in phytochelatin synthase activity. *Aquatic Toxicology* 91 : 320-328.
- Ferro A., Sims M.R.C., Bugbee B.** (1994). Hycrest crested wheatgrass accelerates the degradation of pentachlorophenol in soil. *Journal of Environmental Quality* 23 : 272-279.
- Fletcher J.S., Hegde R.S.** (1995). Release of phenols by perennial plant roots and their potential importance in bioremediation. *Chemosphere* 31 : 3009-3016.
- Folsom B.L., Pennington J.D., Teeter C.L., Barton M.R., Bright J.A.** (1998). Effects of soil pH and treatment level on persistence and plant uptake of 2,4,6-trinitrotoluene. Technical Report EL-88-22, US Army Engineer Waterways Experiment Station, Vicksburg.
- Förstner U.** (1985). Chemicals forms and reactivities of metals in sediments. In "Chemical methods for assessing bio-available metals in sludges and soil", Ed. Leschber R., Davis R.D., L'Hermite P., Elsevier Applied Science publishers, 1-30.
- Francesconi K., Visoottiviset P., Sridokchan W., Goessler W.** (2002). Arsenic species in an arsenic hyperaccumulating fern, *Pityrogramma calomelanos*: a potential phytoremediator of arsenic-contaminated soils. *Science of Total Environment* 284 : 27-35.
- Freisinger E.** (2008). Plant MTs-long neglected members of the metallothionein superfamily. *Dalton Transactions* 47 : 6649-6852.
- French C.J., Dickinson N.M., Putwain P.D.** (2006). Woody biomass phytoremediation of contaminated brownfield land. *Environmental Pollution* 141 : 387-395.
- Gamborg O.L., Miller R.A., Ojima K.** (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research* 50 : 151-158.
- Gardea-Torresdey J.L., Gonzalez J.H., Tiemann K.J., Rodriguez O., Gamez G.** (1998). Phytofiltration of hazardous cadmium, chromium, lead and zinc ions by biomass of *Medicago sativa* (Alfalfa). *Journal of Hazardous Materials* 57 : 29-39.

- Gardea-Torresdey J.L., Peralta-Videa J.R., de la Rosa G., Parsons J.G.** (2005). Phytoremediation of heavy metals and study of the metal coordination by X-ray absorption spectroscopy. *Coordination Chemistry Reviews* 249 : 1797-1810.
- Geisler M., Axelsen K.B., Harper J.F., Palmgren M.G.** (2000). Molecular aspects of higher plant P-type Ca²⁺-ATPases. *Biochimica et Biophysica Acta* 1465 : 52-78.
- Gerhardt K.E., Huang X.D., Glick B.R., Greenberg B.M.** (2009). Phytoremediation and rhizoremediation of organic soil contaminants: Potential and challenges. *Plant Science* 176 : 20-30.
- Ghelis T., Dellis O., Jeannette E., Bardat F., Miginiac E., Sotta B.** (2000). Abscisic acid plasmalemma perception triggers a calcium influx essential for RAB18 gene expression in *Arabidopsis thaliana* suspension cells *FEBS Letters* 483 : 67-70.
- Ghosh M., Singh S.P.** (2005). A review on phytoremediation of heavy metals and utilization of its byproducts. *Applied Ecology And Environmental Research* 3 : 1-18.
- Goel A., Kumar G., Payne G.F., Dube S.K.** (1997). Plant cell biodegradation of a xenobiotic nitrate ester, nitroglycerin. *Nature Biotechnology* 15 : 174-177.
- Gong J.M., Lee D.A., Schroeder J.I.** (2003). Long-distance root-to-shoot transport of phytochelatin and cadmium in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100 : 10118-10123.
- Gonzales X.I., Aboal J.R., Fernandez J.A., Carballeira A.** (2008). Heavy metal transfers between trophic compartments in different ecosystems in Galicia (northwest Spain): Essential elements. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 55 : 691-700.
- Gravot A., Lieutaud A., Verret F., Auroy P., Vavasseur A., Richaud P.** (2004). AtHMA3, a plant P1B-ATPase, functions as a Cd/Pb transporter in yeast. *FEBS Letters* 561 : 22-28.
- Grill E., Löffler S., Winnacker E.L. et Zenk M.H.** (1989). Phytochelatin, the heavy-metal-binding peptides of plants, are synthesized from glutathione by a specific γ -glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatin synthase). *Proceedings of the National Academy of Sciences* 86 : 6838-6842.
- Groom C.A., Halasz A., Paquet L., Morris N., Olivier L., Dubois C., Hawari J.** (2002). Accumulation of HMX (octahydro-1,3,5,7-tetraazocine) in indigenous and agricultural plants grown in HMX-contaminated anti-tank firingrange soil. *Environmental Science and Technology* 36 : 112-118.
- Grotz N., Guérinot M.L.** (2006). Molecular aspects of Cu, Fe and Zn homeostasis in plants. *Biochimica et Biophysica Acta* 1763 : 595-608.
- Grzam A., Martin M.N., Hell R., Meyer A.J.** (2007). γ -Glutamyl transpeptidase GGT4 initiates vacuolar degradation of glutathione S-conjugates in *Arabidopsis*. *FEBS Letters* 581 : 3131-3138.
- Guérinot M.L.** (2000). The ZIP family of metal transporters. *Biochimica et Biophysica Acta* 1465 : 190-198.

- Guillaumot D., Lelu-Walter M.A., Germot A., Meytraud F., Gastinel L., Riou-Khamlichi C.** (2008). Expression patterns of *LmAP2L1* and *LmAP2L2* encoding two-APETALA2 domain proteins during somatic embryogenesis and germination of hybrid larch (*Larix×marschlinsii*). *Journal of Plant Physiology* 165 : 1003-1010.
- Guo J., Dai X., Xu W., Ma M.** (2008). Overexpressing *GSH1* and *AsPCS1* simultaneously increases the tolerance and accumulation of cadmium and arsenic in *Arabidopsis thaliana*. *Chemosphere* 72 : 1020-1026.
- Guo T.R., Zhang G.P., Zhang Y.H.** (2007). Physiological changes in barley plants under combined toxicity of aluminum, copper and cadmium. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 57 : 182-188.
- Guo W.J., Bundithya W., Goldsbrough P.B.** (2003). Characterization of the *Arabidopsis* metallothionein gene family: tissue-specific expression and induction during senescence and in response to copper. *New Phytologist* 159 : 369-381.
- Gupta D.K., Tohoyama H., Joho M., Inouhe M.** (2004). Changes in the levels of phytochelatins and related metal-binding peptides in chickpea seedlings exposed to arsenic and different heavy metal ions. *Journal of Plant Research* 117 : 253-256.
- Gutierrez-Alcala G., Gotor C., Meyer A.J., Fricker M., Vega J.M., Romero L.C.** (2000). Glutathione biosynthesis in *Arabidopsis* trichome cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97 : 11108-11113.
- Ha S.B., Smith A.P., Howden R., Dietrich W.M., Bugg S., O'Connell M.J., Goldsbrough P.B., Cobbett C.S.** (1999). Phytochelatin synthase genes from *Arabidopsis* and the Yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *The Plant Cell* 11 : 1153-1163.
- Hall J.L., Williams L.E.** (2003). Transition metal transporters in plants. *Journal of Experimental Botany* 54 : 2601-2613.
- Hänsch R., Mendel R.R.** (2009). Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl). *Current Opinion in Plant Biology* 12 : 259-266.
- Harada E., Yamaguchi Y., Koizumi N., Sano H.** (2002). Cadmium stress induces production of thiol compounds and transcripts for enzymes involved in sulfur assimilation pathways in *Arabidopsis*. *Journal of Plant Physiology*. 159 : 445-448.
- He J.Y., Zhu C., Ren Y.F., Yan Y.P., Cheng C., Jiang D.A., Sun Z.X.** (2008). Uptake, subcellular distribution, and chemical forms of cadmium in wild-type and mutant rice. *Pedosphere* 18 : 371-377.
- Hedge R.S., Fletcher J.S.** (1996). Influence of plant growth stage and season on the release of root phenolics by mulberry as related to development of phytoremediation technology. *Chemosphere* 32 : 2471-2479.

- Herbette S., Taconnat L., Hugouvieux V., Piette L., Magniette M., Cuine S., Auroy P., Richaud P., Forestier C., Bourguignon J., Renou J.P., Vavasseur A., Leonhardt N.** (2006). Genome-wide transcriptome profiling of the early cadmium response of *Arabidopsis* roots and shoots. *Biochimie* 88 : 1751-1765.
- Herschbach C., Jouanin L., Rennenberg H.** (1998). Overexpression of glutamylcysteine synthetase, but not of glutathione synthetase, elevates glutathione allocation in the phloem of transgenic poplar trees. *Plant and Cell Physiology* 39 : 447-451.
- Hiomura M., Sakurai H.** (2001). Intracellular metal transport proteins. *RIKEN Review* 35 : 23-25.
- Howden R., Andersen C.R., Coldsbrough P.B., Cobbett C.C.** (1995). A cadmium-sensitive, glutathione-deficient mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* 107: 1067-1073.
- Huang J.W., Blaylock M.J, Kapulnik Y., Ensley B.D.** (1998). Phytoremediation of uranium-contaminated soils: role of organic acids in triggering uranium hyperaccumulation in plants. *Environmental Science and Technology* 32 : 2004-2008.
- Huang J.W., Cunningham S.D.** (1996). Lead phytoextraction: species variation in lead uptake and translocation. *New Phytologist* 134 : 73-84.
- Inhoue M.** (2005). Phytochelatins. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 17 : 65-78.
- Isaure M.P., Fayard B., Sarret G., Pairis S., Bourguignon J.** (2006). Localization and chemical forms of cadmium in plant samples by combining analytical electron microscopy and X-ray spectromicroscopy. *Spectrochimica Acta Part B* 61 : 1242-1252.
- Ivanova L.A., Ronzhina D.A., Ivanov L.A., Stroukova L.V., Peuke A.D., Rennenberg H.** (2009). Chloroplast parameters differ in wild type and transgenic poplars overexpressing *gsh1* in the cytosol. *Plant Biology* 11 : 625-630.
- Jambhulkar H.P., Juwarkar A.A.** (2009). Assessment of bioaccumulation of heavy metals by different plant species grown on fly ash dump. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72 : 1122-1128.
- Jez J.M., Cahoon R.E.** (2004). Kinetic mechanism of glutathione synthetase from *Arabidopsis thaliana*. *The Journal of Biological Chemistry* 279 : 42726-42731.
- Jez J.M., Cahoon R.E., Chen S.** (2004). *Arabidopsis thaliana* glutamate-cysteine ligase. *The Journal of Biological Chemistry* 279 : 33463-33470.
- John R., Ahmad P., Gadgil K., Sharma S.** (2009). Heavy metal toxicity: Effect on plant growth, biochemical parameters and metal accumulation by *Brassica juncea* L. *International Journal of Plant Production* 3 : 65-75.
- Jones L., O'Reilly M., Morgan A.J.** (2007). Responses of a non-target organism to metalliferous field soils amended by a phytoremediation-promoting chelator (EDTA): The earthworm, *Eisenia fetida*. *European Journal of Soil Biology* 43 : 289-296.

- Juste C., Chassin P., Gomez A., Linères M., Mocquot B., Feix I., Wiart J.** (1995). Les micropolluants métalliques dans les boues résiduelles des stations d'épuration urbaines. Ademe, Angers.
- Kaplan B., Sherman T., Fromm H.** (2007). Cyclic nucleotide-gated channels in plants. *FEBS Letters* 581 : 2237-2246.
- Kim D.Y., Bovet L., Kushnir S., Noh E.W., Martinoia E., Lee Y** (2006b). AtATM3 is involved in heavy metal resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 140 : 922-932.
- Kim Y.J., Kim J.H., Lee C.E., Mok Y.G., Choi J.S., Shin H.S., Hwang S.** (2006a). Expression of yeast transcriptional activator MSN1 promotes accumulation of chromium and sulfur by enhancing sulfate transporter level in plants. *FEBS Letters* 580 : 206-210.
- Klein M., Burla B., Martinoia E.** (2006). The multidrug resistance-associated protein (MRP/ABCC) subfamily of ATP-binding cassette transporters in plants. *FEBS Letters* 580 : 1112-1122.
- Kohler A., Blaudez D., Chalot M., Martin F.** (2004). Cloning and expression of multiple metallothioneins from hybrid poplar. *New Phytologist* 164 : 83-93.
- Kopriva S., Koprivova A.** (2005). Sulfate assimilation and glutathione synthesis in C4 plants. *Photosynthesis Research* 86 : 363-372.
- Koprivova A., Kopriva S., Jäger D., Will B., Jouanin L., Rennenberg H.** (2002). Evaluation of transgenic poplars over-expressing enzymes of glutathione synthesis for phytoremediation of cadmium. *Plant Biology* 4 : 664-670.
- Kopyra M., Gwozdz E.A.** (2003). Nitric oxide stimulates seed germination and counteracts the inhibitory effect of heavy metals and salinity on root growth of *Lupinus luteus*. *Plant Physiology and Biochemistry* 41 : 1011-1017.
- Kost B., Chua N.H.** (2002). Plant cytoskeleton: vacuoles and cell walls make the difference. *Cell* 108 : 9-12.
- Kovacik J., Klejdus B., Kadukova J., Backor M.** (2007). Physiology of *Matricaria chamomilla* exposed to nickel excess. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72 : 603-609.
- Kovalchuk I., Titov V., Hohn B., Kovalchuk O.** (2005). Transcriptome profiling reveals similarities and differences in plant responses to cadmium and lead. *Mutation Research* 570 : 149-161.
- Krämer U., Cotter-Howells J.D., Charnock J.M., Baker A.J.M., Smith J.A.C.** (1996). Free histidine as a metal chelator in plants that accumulate nickel. *Nature* 379 : 635-638.
- Krämer U., Talke I.N., Hanikenne M.** (2007). Transition metal transport. *FEBS Letters* 581 : 2263-2272.
- Kubota H., Takenaka C.** (2003). *Arabis gemmifera* is a hyperaccumulator of Cd and Zn. *International Journal of Phytoremediation* 5 : 197-201.

- Kumpiene J., Guerri G., Landi L., Pietramellara G., Nannipieri P., Renella G.** (2009). Microbial biomass, respiration and enzyme activities after in situ aided phytostabilization of a Pb- and Cu-contaminated soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72 : 115-119.
- Küpper H., Zhao F.J., McGrath S.P.** (1999). Cellular compartmentation of zinc in leaves of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Plant Physiology* 119 : 305-311.
- Lafuente A.L., Gonzalez C., Quintana J.R., Vazquez A., Romero A.** (2008). Mobility of heavy metals in poorly developed carbonate soils in the Mediterranean region. *Geoderma* 145 : 238-244.
- Lane T.W., Saito M.A., George G.N., Pickering I.J., Prince R.C., Morel F.M.** (2005). A cadmium enzyme from a marine diatom. *Nature* (brief communications) 435 : 42.
- Lasat M.M., Baker A.J.M., Kochian L.V.** (1998). Altered zinc compartmentation in the root symplasm and stimulated Zn²⁺ absorption into the leaf as mechanisms involved in zinc hyperaccumulation in *Thlaspi caerulescens*. *Plant Physiology* 118 : 875-883.
- Laureysens I., Blust R., De Temmerman L., Lemmens C., Ceulemans R.** (2004). Clonal variation in heavy metal accumulation and biomass production in a poplar coppice culture: I. Seasonal variation in leaf, wood and bark concentrations. *Environmental Pollution* 131 : 485-494.
- Lavid N., Barkay Z., Tel-Or E.** (2001). Accumulation of heavy metals in epidermal glands of the waterlily (Nymphaeaceae). *Planta* 212 : 313-322.
- Lee S., Kang B.S.** (2005). Expression of *Arabidopsis* phytochelatin synthase 2 is too low to complement an *AtPCS1*-defective *Cad1-3* mutant. *Molecules and Cells* 19 : 81-87.
- Lee S., Korban S.S.** (2002). Transcriptional regulation of *Arabidopsis thaliana* phytochelatin synthase (*AtPCS1*) by cadmium during early stages of plant development. *Planta* 215 : 689-693.
- Lee S., Moon J.S., Ko T.S., Petros D., Goldsbrough P.B., Korban S.S.** (2003b). Overexpression of *Arabidopsis* phytochelatin synthase paradoxically leads to hypersensitivity to cadmium stress. *Plant Physiology* 131 : 656-663.
- Lee S., Petros D., Moon J.S., Ko T.S., Goldsbrough P.B., Korban S.S.** (2003a). Higher levels of ectopic expression of *Arabidopsis* phytochelatin synthase do not lead to increased cadmium tolerance and accumulation. *Plant Physiology and Biochemistry* 41 : 903-910.
- Lelu-Walter M.A., Pâques L.E.** (2009). Simplified and improved somatic embryogenesis of hybrid larches (*Larix x eurolepis* and *Larix x eurolepis*). Perspectives for breeding. *Annals of Forest Science* 66 : n°104 (10 p).
- Li S.W., Xue L.G., Xu S.J., Feng H.Y., An L.Z.** (2007). Hydrogen peroxide involvement in formation and development of adventitious roots in cucumber. *Plant Growth Regulation* 52 : 173-180.
- Li X.F., Ma J.F., Matsumoto H.** (2000). Pattern of aluminum-induced secretion of organic acids differs between rye and wheat. *Plant Physiology* 123 : 1537-1543.

- Li Z.S., Lu Y.P., Zhen R.G., Szczypka M., Thiele D.J., Rea P. A.** (1997). A new pathway for vacuolar cadmium sequestration in *Saccharomyces cerevisiae*: YCF1-catalyzed transport of bis(glutathionato)cadmium. *Biochemistry* 94 : 42-47.
- Liang H.M., Lin T.H., Chiou J.M., Yeh K.C.** (2009). Model evaluation of the phytoextraction potential of heavy metal hyperaccumulators and non-hyperaccumulators. *Environmental Pollution* 157 : 1945-1952.
- Liao S.W., Chang W.L.** (2004). Heavy metal phytoremediation by water hyacinth at constructed wetlands in Taiwan. *Journal of Aquatic Plant Management* 42 : 60-68.
- Lima A.I.G., Pereira S.I.A., de Almeida Paula Figueira E.M., Caldeira J.C.N., de Matos Caldeira H.D.Q.** (2006). Cadmium detoxification in roots of *Pisum sativum* seedlings: relationship between toxicity levels, thiol pool alterations and growth. *Environmental and Experimental Botany* 55 : 149-162.
- Lin Q., Mendelssohn I.A.** (2009). Potential of restoration and phytoremediation with *Juncus roemerianus* for diesel-contaminated coastal wetlands. *Ecological Engineering* 35 : 85-91.
- Lin W.** (2004). Les Puces à ADN sur lames de verre : principes et méthodes de confection, d'application expérimentale et d'analyse des données. Extrait de la thèse « Applications de la technologie des puces à ADN à l'étude de la différenciation méiotique et des mécanismes de recombinaison chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* ».
- Liphadzi M.S., Kirkham M.B.** (2006). Availability and plant uptake of heavy metals in EDTA-assisted phytoremediation of soil and composted biosolids. *South African Journal of Botany* 72 : 391-397.
- Liu T., Guan H., Ma L., Chen Z., Gu H., Li-Jia Q.** (2009b). Transcriptional profiling of *Arabidopsis* seedlings in response to heavy metal lead (Pb). *Environmental and Experimental Botany* 67 : 377-386.
- Liu W., Shu W., Lan C.** (2004). *Viola baoshanensis*, a plant that hyperaccumulates cadmium. *Chinese Science Bulletin* 49 : 29-32.
- Liu W., Yang Y.S., Francis D., Rogers H.J., Li P., Zhang Q.** (2008). Cadmium stress alters gene expression of DNA mismatch repair related genes in *Arabidopsis* seedlings. *Chemosphere* 73 : 1138-1144.
- Liu X.L., Zhang S.Z., Shan X.Q., Christie P.** (2007). Combined toxicity of cadmium and arsenate to wheat seedlings and plant uptake and antioxidative enzyme responses to cadmium and arsenate co-contamination. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 68 : 305-313.
- Liu Z., He X., Chen W., Yuan F., Yan K., Tao D.** (2009a). Accumulation and tolerance characteristics of cadmium in a potential hyperaccumulator-*Lonicera japonica* Thunb. *Journal of Hazardous Materials* 169 : 170-175.

- Lyon G.L., Brooks R.R., Peterson P.J., Butler G.W.** (1967). Trace elements in New Zealand serpentine Flora. *Plant and Soil* 29 : 225-240.
- Ma J.F., Ryan P.R., Delhaize E.** (2001). Aluminium tolerance in plants and the complexing role of organic acids. *Trends in Plant Science* 6 : 273-278.
- Ma M., Lau P.S., Jia Y.T., Tsang W.K., Lam S.K.S., Tam N.F.Y., Wong Y.S.** (2003). The isolation and characterization of Type 1 metallothionein (MT) cDNA from a heavy-metal-tolerant plant, *Festuca rubra* cv. Merlin. *Plant Science* 164 : 51-60.
- Macfie S. M., Welbourn P. M.** (2000). The cell wall as a barrier to uptake of metal ions in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyceae). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 39 : 413-419.
- Mackerness S.A.H., John C.F., Jordan B., Thomas B.** (2001). Early signaling components in ultraviolet-B responses: distinct roles for different reactive oxygen species and nitric oxide. *FEBS Letters* 489 : 237-242.
- Madrid F., Liphadzi M.S., Kirkham M.B.** (2003). Heavy metal displacement in chelate-irrigated soil during Phytoremediation. *Journal of Hydrology* 272 : 107-119.
- Maier T., Yu C., Küllertz G., Clemens S.** (2003). Localization and functional characterization of metal-binding sites in phytochelatin synthases. *Planta* 218 : 300-308.
- Maksymiec W., Krupa Z.** (2006). The effects of short-term exposition to Cd, excess Cu ions and jasmonate on oxidative stress appearing in *Arabidopsis thaliana*. *Environmental and Experimental Botany* 57 : 187-194.
- Maksymiec W., Wojcik M., Krupa Z.** (2007). Variation in oxidative stress and photochemical activity in *Arabidopsis thaliana* leaves subjected to cadmium and excess copper in the presence or absence of jasmonate and ascorbate. *Chemosphere* 66 : 421-427.
- Manceau A., Marcus M. A., and Tamura N.** (2002). Quantitative speciation of heavy metals in soils and sediments by Synchrotron X-ray techniques. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry* 49 : 341-428.
- Mari S., Gendre D., Pianelli K., Ouerdane L., Lobinski R., Briat J.F., Lebrun M., Czernic P.** (2006). Root-to-shoot long-distance circulation of nicotianamine and nicotianamine-nickel chelates in the metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Journal of Experimental Botany* 57 : 4111-4122.
- Martin-Dupont F., Gloaguen V., Guilloton M., Granet R., Krausz P.** (2006). Study of the chemical interaction between barks and heavy metal cations in the sorption process. *Journal of Environmental Science and Health - Part A, Toxic / Hazardous Substances and Environmental Engineering* 4 : 149-160.
- Matsunaga T., Ishii T.** (2004). Characterization of metal binding properties of rhamnogalacturonan II from plant cells by size-exclusion HPLC/ICP-MS. *Analytical Sciences* 20 : 1389-1393.

- May M.J., Vernoux T., Sanchez-Fernandez R., Van Montagu M., Inzé D.** (1998). Evidence for posttranscriptional activation of glutamylcysteine synthetase during plant stress responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95 : 12049-12054.
- McCann M.C., Roberts K.** (1996). Plant cell wall architecture: the role of pectins. In "Pectins and Pectinases", Eds. Visser J., Voragen A.G.J., Elsevier Science, Amsterdam, pp. 91-107.
- McGrath S.P., Zhao F.J., Lombi E.** (2002). Phytoremediation of metals, metalloids and radionuclides. *Advances in Agronomy* 75 : 1-56.
- McIntyre T.** (2003). Phytoremediation of heavy metals from soils. *Advance in Biochemical Engineering Biotechnology* 78 : 97-123.
- McLean C.M., Koller C.E., Rodger J.C., MacFarlane G.R.** (2009). Mammalian hair as an accumulative bioindicator of metal bioavailability in Australian terrestrial environments. *Science of the Total Environment* 407 (11) : 3588-3596.
- Meagher R.** (2000). Phytoremediation of toxic elemental and organic pollutants. *Current Opinion in Plant Biology* 3 : 153-162.
- Medina V.F., Larson S.L., Agwarambo L., Perez W., Escalon L.** (2004). Treatment of trinitrotoluene by crude plant extracts. *Chemosphere* 55 : 725-732.
- Medina V.F., McCutcheon S.C.** (1996). Phytoremediation: modeling removal of TNT and its breakdown products. *Remediation* 6 : 31-45.
- Medina V.F., Rivera R., Larson S.L., McCutcheon S.C.** (1998). Phytoreactors show promise in treating munitions contaminants. *Soil & Groundwater Cleanup* : 19-24.
- Mench M., Vangronsveld J., Lepp N.W., Edwards R.** (1998). Physico-chemical aspects and efficiency of trace element immobilization by soil amendments. In "Metal-Contaminated Soils. In situ Inactivation and Phytoremediation", Eds. Vangronsveld J., Cunningham S.D., Springer, Berlin, pp. 151-182.
- Mendoza-Cózatl D.G., Loza-Tavera H., Hernandez-Navarro A., Moreno-Sanchez R.** (2005). Sulfur assimilation and glutathione metabolism under cadmium stress in yeast, protists and plants. *FEMS Microbiology Reviews* 29 : 653-671.
- Mendoza-Cózatl D.G., Moreno-Sanchez R.** (2005). Cd²⁺ transport and storage in the chloroplast of *Euglena gracilis*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1706 : 88-97.
- Mendoza-Cózatl D.G., Moreno-Sanchez R.** (2006). Control of glutathione and phytochelatin synthesis under cadmium stress. Pathway modeling for plants. *Journal of Theoretical Biology* 238 : 919-936.
- Méplan C., Mann K., Hainaut P.** (1999). Cadmium induces conformational modifications of wild-type p53 and suppresses p53 response to DNA damage in cultured cells. *The Journal of Biological Chemistry* 274 : 31663-31670.

- Meyers D.E.R., Auchterlonie G.J., Webb R.I., Wood B.** (2008). Uptake and localisation of lead in the root system of *Brassica juncea*. *Environmental Pollution* 153 : 323-332.
- Mihoub A., Chaoui A., El Ferjani E.** (2005). Changements biochimiques induits par le cadmium et le cuivre au cours de la germination des graines de petit pois (*Pisum sativum* L.). *Comptes Rendus Biologies* 328 : 33-41.
- Mills R.F., Francini A., Ferreira da Rocha P.S.C., Baccarini P.J., Aylett M., Krijger G.C., Williams L.E.** (2005). The plant P1B-type ATPase AtHMA4 transports Zn and Cd and plays a role in detoxification of transition metals supplied at elevated levels. *FEBS Letters* 579 : 783-791.
- Milner M., Kochian L.V.** (2008). Investigating heavy-metal hyperaccumulation using *Thlaspi caerulescens* as a model system. *Annals of Botany* 102 : 3-13.
- Mira H., Martinez-Garcia F., Penarrubia L.** (2001). Evidence for the plant-specific intercellular transport of the Arabidopsis copper chaperone CCH. *The Plant Journal* 25 : 521-528.
- Mishra S., Tripathi R.D., Srivastava S., Dwivedi S., Trivedi P. K., Dhankher O.P., Khare A.** (2009). Thiol metabolism play significant role during cadmium detoxification by *Ceratophyllum demersum* L. *Bioresource Technology* 100 : 2155-2161.
- Miyasaka S.C., Buta J.G., Howell R.K., Foy C.D.** (1991). Mechanism of aluminum tolerance in snapbeans: root exudation of citric acid. *Plant Physiology* 96 : 737-743.
- Mizuno T., Usui K., Horie K., Nosaka S., Mizuno N., Obata H.** (2005). Cloning of three ZIP/Nramp transporter genes from a Ni hyperaccumulator plant *Thlaspi japonicum* and their Ni²⁺-transport abilities. *Plant Physiology and Biochemistry* 43 : 793-801.
- Mobin M., Khan N.A.** (2007). Photosynthetic activity, pigment composition and antioxidative response of two mustard (*Brassica juncea*) cultivars differing in photosynthetic capacity subjected to cadmium stress, *Journal of Plant Physiology* 164 : 601-610.
- Mohammadkhani N., Heidari R.** (2008). Effects of drought stress on soluble proteins in two maize varieties. *Turkish Journal of Biology* 32 : 23-30.
- Montargès-Pelletier E., Chardot V., Echevarria G., Michot L.J., Bauer A., Morel J.L.** (2008). Identification of nickel chelators in three hyperaccumulating plants: an X-ray spectroscopic study. *Phytochemistry* 69 : 1695-1709.
- Moon J., Parry G., Estelle M.** (2004). The ubiquitin-proteasome pathway and plant development. *The Plant Cell* 16 : 3181-3195.
- Morel J.L., Mench M., Guckert A.** (1986). Measurement of Pb²⁺, Cu²⁺ and Cd²⁺ binding with mucilage exudates from maize (*Zea mays* L.) roots. *Biology and Fertility of Soils* 2 : 29-34.

- Moreno F.N., Anderson C.W.N., Stewart R.B., Robinson B.H.** (2008). Phytofiltration of mercury-contaminated water: Volatilisation and plant-accumulation aspects. *Environmental and Experimental Botany* 62 : 78-85.
- Moreno J.I., Martin R., Castresana C.** (2005). *Arabidopsis* SHMT1, a serine hydroxymethyltransferase that functions in the photorespiratory pathway influences resistance to biotic and abiotic stress. *The Plant Journal* 41 : 451-463.
- Moreno Pires A.M., Marchi G., Mattiazzo M.E., Guimarães Guilherme L.R.** (2007). Organic acids in the rhizosphere and phytoavailability of sewage sludge-borne trace elements. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* 42 : 917-924.
- Mueller W.F., Bedell G.W., Shojaee S., Jackson P.J.** (1995). Bioremediation of TNT wastes by higher plants. In "Proceedings of the 9th Annual Conference on Hazardous Waste Research", Eds. Erickson L.E., Tillison D.L., Grant S.C., McDonald J.P., Kansas State University, Manhattan, pp. 222-230.
- Muratova A., Golubev S., Wittenmayer L., Dmitrieva T., Bondarenkova A., Hirche F., Merbach W., Turkovskaya O.** (2009). Effect of the polycyclic aromatic hydrocarbon phenanthrene on root exudation of *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *Environmental and Experimental Botany* 66 : 514-521.
- Nevo Y., Nelson N.** (2006). The NRAMP family of metal-ion transporters. *Biochimica et Biophysica Acta* 1763 : 609-620.
- Newman L.A., Reynolds C.M.** (2004). Phytodegradation of organic compounds. *Current Opinion in Biotechnology* 15 : 225-230.
- Ni T.H., Wei Y.Z.** (2003). Subcellular distribution of cadmium in mining ecotype *Sedum alfredii*. *Acta Botanica Sinica* 45 : 925-928.
- Nocito F.F., Pirovano L., Cocucci M., Sacchi G.A.** (2002). Cadmium-induced sulfate uptake in maize roots. *Plant Physiology* 129 : 1872-1879.
- Noctor G., Arisi A.C.M., Jouanin L., Kunert K.J., Rennenberg H., Foyer C.H.** (1998). Glutathione: biosynthesis, metabolism and relationship to stress tolerance explored in transformed plants. *Journal of Experimental Botany* 49 : 623-647.
- Noctor G., Foyer C.H.** (1998). Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49 : 249-279.
- Noctor G., Gomez L., Vanacker H., Foyer C.H.** (2002). Interactions between biosynthesis, compartmentation and transport in the control of glutathione homeostasis and signaling. *Journal of Experimental Botany* 53 : 1283-1304.
- Oven M., Grill E., Golan-Goldhirsh A., Kutchan T.M., Zenk M.H.** (2002). Increase of free cysteine and citric acid in plant cells exposed to cobalt ions. *Phytochemistry* 60 : 467-474.

- Overall R.A., Parry D.L.** (2004). The uptake of uranium by *Eleocharis dulcis* (Chinese water chestnut) in the Ranger Uranium Mine constructed wetland filter. *Environmental Pollution* 132 : 307-320.
- Pagliano C., Raviolo M., Vecchia F.D., Gabbrielli R., Gonnelli C., Rascio N., Barbato R., La Rocca N.** (2006). Evidence for PSII donor-side damage and photoinhibition induced by cadmium treatment on rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of photochemistry and photobiology* 84 : 70-78.
- Pai S.G., Riley M.B., Camper N.D.** (2001). Microbial degradation of mefenoxam in rhizosphere of *Zinnia angustifolia*. *Chemosphere* 44 : 577-582.
- Palazzo A.J., Leggett D.C.** (1986). Effect and disposition of TNT in a terrestrial plant. *Journal of Environmental Quality* 15 : 49-52.
- Palmiter R.D.** (1998). The elusive function of metallothioneins. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95 : 8428-8430.
- Parani M., Rudrabhatla S., Myers R., Weirich H., Smith B., Leaman D.W., Goldman S.L.** (2004). Microarray analysis of nitric oxide responsive transcripts in *Arabidopsis*. *Plant Biotechnology Journal* 2 : 359-366.
- Parida A.K., Dasa A.B., Mittrac B., Mohanty P.** (2004). Salt-stress Induced Alterations in Protein Profile and Protease Activity in the Mangrove *Bruguiera parviflora*. *Zeitschrift für Naturforschung* 59c : 408-414.
- Passardi F., Dobias J., Valério L., Guimil S., Penel C., Dunand C.** (2007). Morphological and physiological traits of three major *Arabidopsis thaliana* accessions. *Journal of Plant Physiology* 164 : 980-992.
- Pasternak T., Potters G., Caubergs R., Jansen M.** (2005a) Complementary interactions between oxidative stress and the phytohormone auxin control plant growth responses at plant, organ and cellular level. *Journal of Experimental Botany* 56 : 1991-2001.
- Pasternak T., Rudas V., Potters G., Jansen M.** (2005b). Morphogenic effects of abiotic stress: reorientation of growth in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Environmental and Experimental Botany* 53 : 299-314.
- Pastor J., Aparicio A.M., Gutierrez-Maroto A., Hernandez A.J.** (2007). Effects of two chelating agents (EDTA and DTPA) on the autochthonous vegetation of a soil polluted with Cu, Zn and Cd. *Science of the Total Environment* 378 : 114-118.
- Peng H.Y., Yang X., Tian S.K.** (2005). Accumulation and ultrastructural distribution of copper in *Elsholtzia splendens*. *Journal of Zhejiang University Science* 6B(5) : 311-318.
- Peng S., Zhou Q., Cai Z., Zhang Z.** (2009). Phytoremediation of petroleum contaminated soils by *Mirabilis Jalapa* L. in a greenhouse plot experiment. *Journal of Hazardous Materials* 168 : 1490-1496.

- Peralta-Videa J.R., de la Rosa G., Gonzalez J.H., Gardea-Torresdey J.L.** (2004). Effects of the growth stage on the heavy metal tolerance of alfalfa plants. *Advances in Environmental Research* 8 : 679-685.
- Peralta-Videa J.R., Lopez M.L., Narayan M., Saupe G., Gardea-Torresdey J.** (2009). The biochemistry of environmental heavy metal uptake by plants: Implications for the food chain. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 41 : 1665-1677.
- Perfus-Barbeoch L., Leonhardt N., Vavasseur A., Forestier C.** (2002). Heavy metal toxicity: cadmium permeates through calcium channels and disturbs the plant water status. *The Plant Journal* 32 : 539-548.
- Persans M.W., Nieman K., Salt D.E.** (2001). Functional activity and role of cation-efflux family members in Ni hyperaccumulation in *Thlaspi goesingense*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98 : 9995-10000.
- Peterson A.G., Oliver D.J.** (2006). Leaf-targeted phytochelatin synthase in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology and Biochemistry* 44 : 885-892.
- Pflugmacher S., Schröder P., Sandermann H.Jr.** (2000). Taxonomic distribution of plant glutathione S-transferases acting on xenobiotics. *Phytochemistry* 54 : 267-273.
- Picault N., Cazalé A.C., Beyly A., Cuiné S., Carrier P., Luu D.T., Forestier C., Peltier G.** (2006). Chloroplast targeting of phytochelatin synthase in *Arabidopsis*: effects on heavy metal tolerance and accumulation. *Biochimie* 88 : 1743-1750.
- Pickering I.J., Prince R.C., George M.J., Smith R.D., George G.N., Salt D.E.** (2000). Reduction and coordination of arsenic in Indian mustard. *Plant Physiology* 122 : 1171-1177.
- Piechalak A., Tomaszewska B., Baralkiewicz D., Malecka A.** (2002). Accumulation and detoxification of lead ions in legumes. *Phytochemistry* 60 : 153-162.
- Pilon-Smits E.A.H., LeDuc D.L.** (2009). Phytoremediation of selenium using transgenic plants. *Current Opinion in Biotechnology* 20 : 1-6.
- Pineros M.A., Kochian L.V.** (2001). A patch-clamp study on the physiology of aluminum toxicity and aluminum tolerance in maize. Identification and characterization of Al³⁺-induced anion channels. *Plant Physiology* 125 : 292-305.
- Pittman J.K., Shigaki T., Hirschi K.D.** (2005). Evidence of differential pH regulation of the *Arabidopsis* vacuolar Ca²⁺/H⁺ antiporters CAX1 and CAX2. *FEBS Letters* 579 : 2648-2656.
- Polec-Pawlak K., Ruzik R., Abramski K., Ciurzynska M., Gawronska H.** (2005). Cadmium speciation in *Arabidopsis thaliana* as a strategy to study metal accumulation system in plants. *Analytica Chimica Acta* 540 : 61-70.

- Popper Z.A.** (2008). Evolution and diversity of green plant cell walls. *Current Opinion in Plant Biology* 11 : 286-292.
- Porat R., Lers A., Dori S., Cohen L., Weiss B., Daus A., Wilson C.S., Droby S.** (1999). Induction of chitinase and β -1,3-endoglucanase proteins by UV irradiation and wounding in grapefruit peel tissue. *Phytoparasitica* 27 : 233-238.
- Potters G., Pasternak T.P., Guisez Y., Jansen M.** (2009). Different stresses, similar morphogenic responses: integrating a plethora of pathways. *Plant, Cell and Environment* 32 : 158-169.
- Potters G., Pasternak T.P., Guisez Y., Palme K.J., Jansen M.** (2007). Stress-induced morphogenic responses: growing out of trouble? *TRENDS in Plant Science* 12 : 98-105.
- Prasad M.N.V., Freitas H.M.D.** (2003). Metal hyperaccumulation in plants - Biodiversity prospecting for phytoremediation technology. *Electronic Journal of Biotechnology* 93 : 285-321.
- Prasad M.N.V., Greger M., Landberg T.** (2001). *Acacia nilotica* L. bark removes toxic metals from solution: corroboration from toxicity bioassay using *Salix viminalis* L. in hydroponic system. *International Journal of Phytoremediation* 3 : 289-300.
- Puig S., Mira H., Dorcey E., Sancenon V., Andres-Colas N., Garcia-Molina A., Burkhead J.L., Gogolin K.A., Abdel-Ghany S.E., Thiele D.J., Ecker J.R., Pilon M., Penarrubia L.** (2007). Higher plants possess two different types of ATX1-like copper chaperones. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 354 : 385-390.
- Pulford I.D., Dickinson N.M.** (2005). Phytoremediation Technologies Using Trees. In "Trace elements in the environment", Eds. Prasad M.N.V., Sajwan K.S., Naidu R., Boca Raton, Lewis, pp. 375-395.
- Pulford I.D., Watson C.** (2003). Phytoremediation of heavy metal-contaminated land by trees - a review. *Environment International* 29 : 529-540.
- Qiu R.L., Zhao X., Tang Y.T., Yu F.M., Hu P.J.** (2008). Antioxidative response to Cd in a newly discovered cadmium hyperaccumulator, *Arabis paniculata* F. *Chemosphere* 74 : 6-12.
- Ramos I., Esteban E., Lucena J.J., Garate A.** (2002). Cadmium uptake and subcellular distribution in plants of *Lactuca* sp. Cd- Mn interaction. *Plant Science* 162 : 761- 767.
- Rascio N., Vecchia F.D., La Rocca N., Barbato R., Pagliano C., Raviolo M., Gonnelli C., Gabbrielli R.** (2008). Metal accumulation and damage in rice (*cv.* Vialone nano) seedlings exposed to cadmium. *Environmental and Experimental Botany* 62 : 267-278.
- Raskin I., Smith R.D., Salt D.E.** (1997). Phytoremediation of metals: using plants to remove pollutants from the environment. *Current Opinion in Biotechnology* 8 : 221-226.
- Rea P.A.** (1999). MRP subfamily ABC transporters from plants and yeast. *Journal of Experimental Botany* 50 : 895-913.

- Remans T., Smeets K., Opdenakker K., Mathijsen D., Vangronsveld J., Cuypers A.** (2008). Normalisation of real-time RT-PCR gene expression measurements in *Arabidopsis thaliana* exposed to increased metal concentrations. *Planta* 227:1343-1349.
- Reumann S., Weber A.P.M.** (2006). Plant peroxisomes respire in the light: Some gaps of the photorespiratory C2 cycle have become filled-Others remain. *Biochimica et Biophysica Acta* 1763 : 1496-1510.
- Richau K.H., Kozhevnikova A.D., Seregin I.V., Vooijs R., Koevoets P.L.M., Smith J.A.C., Ivanov V.B., Schat H.** (2009). Chelation by histidine inhibits the vacuolar sequestration of nickel in roots of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *New Phytologist* 183 : 106-116.
- Rivera R., Medina V.F., Larson S.L., McCutcheon S.C.** (1998). Phytoremediation of TNT contaminated groundwater. *Journal of Soil Contamination* 7 : 511-529.
- Robinson B. H., Chiarucci A., Brooks R. R., Petit D., Kirkman J. H., Gregg P. E. H., De Dominicis V.** (1997) The nickel hyperaccumulator plant *Alyssum bertolonii* as potential agent for phytoremediation and phytomining of nickel. *Journal of Geochemical Exploration* 59 : 75-86.
- Robinson B.H., Mills T.M., Petit D., Fung L.E., Green S.R., Clothier B.E.** (2000). Natural and induced cadmium-accumulation in poplar and willow: Implications for phytoremediation. *Plant and Soil* 227 : 301-306.
- Robinson H., Brooks R.R., Clothier B.E.** (1999). Soil amendments affecting nickel and cobalt uptake by *Berkheya coddii*: potential use for phytomining and phytoremediation. *Annals of Botany* 84 : 689-694.
- Roosens N.H., Bernard C., Leplae R., Verbruggen N.** (2004). Evidence for copper homeostasis function of metallothionein (MT3) in the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *FEBS Letters* 577 : 9-16.
- Roper J.C., Dec J., Bollag J.** (1996). Using minced horseradish roots for the treatment of polluted waters. *Journal of Environmental Quality* 25 : 1242-1247.
- Roth U, von Roepenack-Lahaye E., Clemens S.** (2006). Proteome changes in *Arabidopsis thaliana* roots upon exposure to Cd²⁺. *Journal of Experimental Botany* 57 (15) : 4003-4013.
- Ruegsegger A., Brunold C.** (1992). Effect of cadmium on γ -glutamylcysteine synthesis in maize seedlings. *Plant Physiology* 99 : 428-433.
- Ruttens A., Mench M., Colpaert J.V., Boisson J., Carleer R., Vangronsveld J.** (2006). Phytostabilization of a metal contaminated sandy soil. I: influence of compost and/or inorganic metal immobilizing soil amendments on phytotoxicity and plant availability of metals. *Environmental Pollution* 144 : 524-532.

- Sagner S., Kneer R., Wanner G., Cosson J.P., Deus-Neumann B., Zenk M.H.** (1998). Hyperaccumulation, complexation and distribution of nickel in *Sebertia acuminata*. *Phytochemistry* 41 : 339-347.
- Sahi S.V., Bryant N.L., Sharma N.C., Singh S.R.** (2002). Characterization of a lead hyperaccumulator shrub, *Sesbania drummondii*. *Environmental Science and Technology* 36 : 4676-4680.
- Saifullah M.E., Qadir M., de Caritat P., Tack F.M.G., Du Laing G., Zia M.H.** (2009). EDTA-assisted Pb phytoextraction. *Chemosphere* 74 : 1279-1291.
- Sakulkoo N., Akaracharanya A., Chareonpornwattana S., Leepipatpiboon N., Nakamura T., Yamaguchi Y., Shinmyo A., Sano H.** (2005). Hyper-assimilation of sulfate and tolerance to sulfide and cadmium in transgenic water spinach expressing an *Arabidopsis* adenosine phosphosulfate reductase. *Plant Biotechnology* 22 : 27-32.
- Salanoubat M., Choisne N., Artiguenave F., Weissenbach J. and Quétier F.** (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana* *Nature* 408 : 796-815.
- Salt D.E., Prince R.C., Pickering I.J., Raskin I.** (1995). Mechanisms of cadmium mobility and accumulation in Indian mustard. *Plant Physiology* 109 : 1427-1433.
- Sanita di Toppi L., Gabrielli R.** (1999). Response to cadmium in higher plants. *Environmental and Experimental Botany* 41 : 105-130.
- Santibanez C., Verdugo C., Ginocchio R.** (2008). Phytostabilization of copper mine tailings with biosolids: Implications for metal uptake and productivity of *Lolium perenne*. *Science of the Total Environment* 395 : 1-10.
- Satofuka H., Fukui T., Takagi M., Atomi H. et Imanaka T.** (2001). Metal-binding properties of phytochelatin-related peptides. *Journal of Inorganic Biochemistry* 86 : 595-602.
- Schnoor J.L., Licht L.A., McCutcheon S.C., Wolfe N.L., Carreira L.** (1995). Phytoremediation of organic and nutrient contaminants. *Environmental Science and Technology* 7A : 318-323.
- Schröder P., Daubner D., Maier H., Neustifter J., Debus R.** (2008). Phytoremediation of organic xenobiotics – Glutathione dependent detoxification in *Phragmites* plants from European treatment sites. *Bioresource Technology* 99 : 7183-7191.
- Schröder P., Scheer C.E., Diekmann F., Stampfl A.** (2007). How plants cope with foreign compounds. Translocation of xenobiotic conjugates in roots of barley (*Hordeum vulgare*). *Environmental Science and Pollution Research* 14 : 114-122.
- Schulz B., Kolukisaoglu H.U.** (2006). Genomic analysis of plant ABC transporters: The alphabet of photosynthetic life forms or just holes in membranes? *FEBS Letters* 580 : 1010-1016.
- Schutzendubel A., Nikolova P., Rudolf C., Polle A.** (2002). Cadmium and H₂O₂-induced oxidative stress in *Populus × canescens* roots. *Plant Physiology and Biochemistry* 40 : 577-584.

- Schwarzerova K., Zelenkova S., Nick P., Opatrny Z.** (2002). Aluminum-induced rapid changes in the microtubular cytoskeleton of tobacco cell lines *Plant Cell Physiology* 43 : 207-216.
- Sebastiani L., Scebba F., Tognetti R.** (2004). Heavy metal accumulation and growth responses in poplar clones Eridano (*Populus deltoides* × *maximowiczii*) and I-214 (*P.* × *euramericana*) exposed to industrial waste. *Environmental and Experimental Botany* 52 : 79-88.
- Seregin I.V., Shpigu L.K., Ivanov V.B.** (2004). Distribution and toxic effects of cadmium and lead on maize roots. *Russian Journal of Plant Physiology* 51 : 525-533.
- Serpaud B., Al-Shukry M., Casteigneau M., Matejka G.** (1994). Adsorption des métaux lourds (Cu, Zn, Cd et Pb) par les sédiments superficiels d'un cours d'eau: rôle du pH, de la température et de la composition du sédiment. *Revue des sciences de l'eau* 7 : 343-365.
- Shanker A.K., Cervantes C., Loza-Tavera H., Avudainayagam S.** (2005). Chromium toxicity in plants. *Environment International* 31 : 739-753.
- Sharma N.C., Gardea-Torresdey J.L., Parsons J., Sahi S.V.** (2004b). Chemical speciation and cellular deposition of lead in *Sesbania drummondii*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23 : 2068-2073.
- Sharma P., Dubey R.S.** (2005). Lead toxicity in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 17 : 35-52.
- Sharma S., Kumar V.** (2002). Responses of wild type and abscisic acid mutants of *Arabidopsis thaliana* to cadmium. *Journal of Plant Physiology* 159 : 1323-1327.
- Sharma S.S., Kaul S., Metwally A., Goyal K.C., Finkemeier I., Dietz K.J.** (2004a). Cadmium toxicity to barley (*Hordeum vulgare*) as affected by varying Fe nutritional status. *Plant Science* 166 : 1287-1295.
- Sheppard S.C., Evenden W.G., Anderson A.J.** (1992). Multiple assays of uranium in soil. *Environmental Toxicology and Water Quality* 7 : 275-294.
- Shingu Y., Kudo T., Ohsato S., Kimura M., Ono Y., Yamaguchi I., Hamamoto H.** (2005). Characterization of genes encoding metal tolerance proteins isolated from *Nicotiana glauca* and *Nicotiana tabacum*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 331 : 675-680.
- Sikora F.J., Behrends L.L., Coonrod H.S., Phillips W.D., Bader D.F.** (1998). Phytoremediation of explosives in groundwater using innovative wetlands-based treatment technologies. In "Proceedings of the 12th Annual Conference on Hazardous Waste Research", Eds. Erickson L.E., Rankin M.M., Grant S.C., McDonald J.P., Kansas State University, Manhattan, pp. 168-178.
- Singer A.C., Bell T., Heywood C.A., Smith J.A.C., Thompson I.P.** (2007). Phytoremediation of mixed-contaminated soil using the hyperaccumulator plant *Alyssum lesbiacum*: Evidence of histidine as a measure of phytoextractable nickel. *Environmental Pollution* 147 : 74-82.
- Singh R.P., Tripathi R.D., Sinha S.K., Maheshwari R., Srivastava H.S.** (1997). Response of higher plants to lead contaminated environment. *Chemosphere* 34 : 2467-2493.

- Smeets K., , Opdenakker K., Remans T., Van Sanden S., Van Belleghem F., Semane B., Horemans N., Guisez Y., Vangronsveld J., Cuypers A.** (2009). Oxidative stress-related responses at transcriptional and enzymatic levels after exposure to Cd or Cu in a multipollution context. *Journal of Plant Physiology* 166 : 1982-1992.
- Smeets K., Ruytinx J., Semane B., Van Belleghem F., Remans T., Van Sanden S., Vangronsveld J., Cuypers A.** (2008). Cadmium-induced transcriptional and enzymatic alterations related to oxidative stress. *Environmental and Experimental Botany* 63 : 1-8.
- Sousa A.I, Caçador I., Lillebo A.I, Pardal M.A.** (2008). Heavy metal accumulation in *Halimione portulacoides*: intra- and extra-cellular metal binding sites. *Chemosphere* 70 : 850-857.
- Spuches A.M., Kruszyna H.G., Rich A.M., Wilcox D.E.** (2005). Thermodynamics of the As(III)-thiol interaction: arsenite and monomethylarsenite complexes with glutathione, dihydrolipoic acid, and other thiol ligands. *Inorganic Chemistry* 44 : 2964-2972.
- Srivastava M., Ma L.Q., Santos J.A.** (2006). Three new arsenic hyperaccumulating ferns. *Science of the Total Environment* 364 : 24-31.
- Stearns J.C., Glick B.R.** (2003). Transgenic plants with altered ethylene biosynthesis or perception. *Biotechnology Advances* 21 : 193-210.
- Stengel P., Gelin S.** (1998). Sol : interface fragile. Ed. INRA, Paris.
- Sticklen M.B.** (2008). Plant genetic engineering for biofuel productions: towards affordable cellulosic ethanol. *Nature Reviews Genetics* 9 : 433-443.
- Stolt J.P., Sneller F.E.C., Bryngelsson T., Lundborg T., Schat H.** (2003). Phytochelatin and cadmium accumulation in wheat. *Environmental and Experimental Botany* 49 : 21- 28.
- Sun Q., Ye Z.H., Wang X.R., Wong M.H.** (2005). Increase of glutathione in mine population of *Sedum alfredii*: a Zn hyperaccumulator and Pb accumulator. *Phytochemistry* 66 : 2549-2556.
- Sun R.L., Zhou Q.X., Sun F.H., Jin C.X.** (2007). Antioxidative defense and proline/phytochelatin accumulation in a newly discovered Cd-hyperaccumulator, *Solanum nigrum* L. *Environmental and Experimental Botany* 60 : 468-476.
- Sun Y., Zhou Q, Wang L., Liu W.** (2009). Cadmium tolerance and accumulation characteristics of *Bidens pilosa* L. as a potential Cd-hyperaccumulator. *Journal of Hazardous Materials* 161 : 808-814.
- Sunkar R., Kaplan B., Bouche N., Arazi T., Dolev D., Talke I.N., Maathuis F.J., Sanders D., Bouchez D., Fromm H.** (2000). Expression of a truncated tobacco NtCBP4 channel in transgenic plants and disruption of the homologous Arabidopsis CNGC1 gene confer Pb²⁺ tolerance. *The Plant Journal* 24 : 533-542.
- Susarla S., Victor F. Medina V. F, McCutcheon S.C.** (2002). Phytoremediation: an ecological solution to organic chemical contamination. *Ecological Engineering* 18 : 647-658.

- Szabados L., Savouré A.** (2009). Proline: a multifunctional amino acid. *Trends in Plant Science* 15 : 89-97.
- Tamas L., Dudikova J., Durcekova K., Haluskova L., Huttova J., Mistrik I., Olle M.** (2008). Alterations of the gene expression, lipid peroxidation, proline and thiol content along the barley root exposed to cadmium. *Journal of Plant Physiology* 165 : 1193-1203.
- Tang Y.T., Qiu R.L., Zeng X.W., Ying R.R., Yu F.M., Zhou X.Y.** (2009). Lead, zinc, cadmium hyperaccumulation and growth stimulation in *Arabis paniculata* Franch. *Environmental and Experimental Botany* 66 : 126-134.
- Terry N., Sambukumar S.V., LeDuc D.L.** (2003). Biotechnological approaches for enhancing phytoremediation of heavy metals and metalloids. *Acta Biotechnology* 23 : 281-288.
- Terry N., Zayed A.M., de Souza M.P., Tarun A.S.** (2000). Selenium in higher plants. *Annual Review in Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 51 : 401-432.
- Thomson P.L., Ramer L.A., Schnoor J.L.** (1998a). Uptake and transformation of TNT by hybrid poplar trees. *Environmental Science and Technology* 32 : 975-980.
- Thornton I.** (1995). In "Metals in the global environment: facts and misconceptions", Ed. International Council on Metals and the Environment, Ottawa.
- Tomé F.V., Rodriguez P.B., Lozano J.C.** (2009). The ability of *Helianthus annuus* L. and *Brassica juncea* to uptake and translocate natural uranium and ²²⁶Ra under different milieu conditions. *Chemosphere* 74 : 293-300.
- Tripathi R.D., Srivastava S., Mishra S., Singh N., Tuli R., Gupta D.K., Maathuis F.J.M.** (2007). Arsenic hazards: strategies for tolerance and remediation by plants. *Trends in Biotechnology* 25 : 158-165.
- Tripathi R.D., Vajpayee P., Singh N., Rai U.N., Kumar A., Ali M.B., Kumar B., Yunus M.** (2004). Efficacy of various amendments for amelioration of fly-ash toxicity: growth performance and metal composition of *Cassia siamea* Lamk. *Chemosphere* 54 : 1581-1588.
- Tu C., Ma L.G.** (2002). Effects of Arsenic Concentrations and Forms on Arsenic Uptake by the Hyperaccumulator Ladder Brake. *Journal of Environmental Quality* 31 : 641-647.
- Tuskan G.A., DiFazio S., Jansson S., Bohlmann J., Grigoriev I., Hellsten U., Putnam N., Ralph S., Rombauts S., Salamov A., Schein J., Sterck L., Aerts A., Bhalerao R.R., Bhalerao R.P., Blaudez D., Boerjan W., Brun A., Brunner A., Busov V., Campbell M., Carlson J., Chalot M., Chapman J., Chen G.L., Cooper D., Coutinho P.M., Couturier J., Covert S., Cronk Q., Cunningham R., Davis J., Degroeve S., Déjardin A., Depamphilis C., Detter J., Dirks B., Dubchak I., Duplessis S., Ehrling J., Ellis B., Gendler K., Goodstein D., Gribskov M., Grimwood J., Groover A., Gunter L., Hamberger B., Heinze B., Helariutta Y., Henrissat B., Holligan D., Holt R., Huang W., Islam-**

- Faridi N., Jones S., Jones-Rhoades M., Jorgensen R., Joshi C., Kangasjärvi J., Karlsson J., Kelleher C., Kirkpatrick R., Kirst M., Kohler A., Kalluri U., Larimer F., Leebens-Mack J., Leplé J.C., Locascio P., Lou Y., Lucas S., Martin F., Montanini B., Napoli C., Nelson D.R., Nelson C., Nieminen K., Nilsson O., Pereda V., Peter G., Philippe R., Pilate G., Poliakov A., Razumovskaya J., Richardson P., Rinaldi C., Ritland K., Rouzé P., Ryaboy D., Schmutz J., Schrader J., Segerman B., Shin H., Siddiqui A., Sterky F., Terry A., Tsai C.J., Uberbacher E., Unneberg P., Vahala J., Wall K., Wessler S., Yang G., Yin T., Douglas C., Marra M., Sandberg G., Van de Peer Y., Rokhsar D.** (2006). The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). *Science* 313 : 5793-1604.
- Unterbrunner R., Puschenreiter M., Sommer P., Wieshammer G., Tlustos P., Zupan M., Wenzel W.W.** (2007). Heavy metal accumulation in trees growing on contaminated sites in Central Europe. *Environmental Pollution* 148 : 107-114.
- Utriainen M., Kokko H., Auriola S., Sarrazin O., Kärenlampi S.** (1998). PR-10 protein is induced by copper stress in roots and leaves of a Cu/Zn tolerant clone of birch, *Betula pendula*. *Plant, Cell & Environment* 21 : 821-828.
- Van Hoof N.A.L.M., Hassinen V.H., Hakvoort H.W.J., Ballintijn K.F., Schat H., Verkleij J.A.C., Ernst W.H.O., Kärenlampi S.O., Tervahauta A.I.** (2001). Enhanced copper tolerance in *Silene vulgaris* (Moench). Garcke populations from copper mines is associated with increased transcript levels of a 2b-type metallothionein gene. *Plant Physiology* 126 : 1519-1526.
- Vandecasteele B., Meers E., Vervaeke P., De Vos B., Quataert P., Tack F.M.G.** (2005). Growth and trace metal accumulation of two *Salix* clones on sediment-derived soils with increasing contamination levels. *Chemosphere* 58 : 995-1002.
- Vanderford M., Shanks J.V., Hughes J.B.** (1997). Phytotransformation of trinitrotoluene and distribution of metabolic products in *Myriophyllum aquaticum*. *Biotechnology Letters* 19 : 277-280.
- Varga A., Zaray G., Fodor F., Cseh E.** (1997). Study of interaction of iron and lead during their uptake process in wheat roots by total-reflection X-ray fluorescence spectrometry. *Spectrochimica Acta B* 52 : 1027-1032.
- Vasquez S., Fernandez-Pascual M., Sanchez-Pardo B., Carpena R.O., Zornoza P.** (2007). Subcellular compartmentalisation of cadmium in white lupins determined by energy-dispersive X-ray microanalysis. *Journal of Plant Physiology* 164 : 1235-1238.
- Vassilev A., Schwitzguébel J.P., Thewys T., van der Lelie D., Vangronsveld J.** (2007). The use of plants for remediation of metal-contaminated soils. *The Scientific World Journal* 4 : 9-34.
- Vatamaniuk O.K., Mari S., Lu Y.P., Rea P.A.** (2000). Mechanism of heavy metal ion activation of phytochelatin (PC) synthase. *Journal of Biological Chemistry* 275 : 31451-31459.

- Verbruggen N., Hermans C.** (2008). Proline accumulation in plants: a review. *Amino acids* 35 : 753-759.
- Verbruggen N., Hermans C., Schat H.** (2009). Molecular mechanisms of metal hyperaccumulation in plants. *New Phytologist* 181 : 759-776.
- Verrier P.J., Bird D., Burla B., Dassa E., Forestier C., Geisler M., Klein M., Kolukisaoglu U., Lee Y., Martinoia E., Murphy A., Rea P.A., Samuels L., Schulz B., Spalding E.J., Yazaki K., Theodoulou F.L.** (2008). Plant ABC proteins – a unified nomenclature and updated inventory. *Trends in Plant Science* 13 : 151-159.
- Vollenweider P., Cosio C., Günthardt-Goerg M.S., Keller C.** (2006). Localization and effects of cadmium in leaves of a cadmium-tolerant willow (*Salix viminalis* L.). Part II Microlocalization and cellular effects of cadmium. *Environmental and Experimental Botany* 58 : 64-74.
- Von Aderkas P., Label P., Lelu M.A.** (2002a). Charcoal affects early development and hormonal concentrations of somatic embryos of hybrid larch. *Tree Physiology* 22 : 431-434.
- Von Aderkas P., Rohr R., Sundberg B., Gutmann M., Dumont-Bébox N., Lelu M.A.** (2002b). Abscisic acid and its influence on development of the embryonal root cap, storage product and secondary metabolite accumulation in hybrid larch somatic embryos. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 69 : 111-120.
- Von Wiren N., Klair S., Bansal S., Briat J.F., Khodr H., Shioiri T., Leigh R.A., Hider R.C.** (1999). Nicotianamine chelates both Fe^{III} and Fe^{II}. Implications for metal transport in plants. *Plant Physiology* 119 : 1107-1114.
- Walton B.T., Anderson T.A.** (1990). Microbial degradation of trichloroethylene in the rhizosphere: potential application to biological remediation of waste sites. *Applied and Environmental Microbiology* 56 : 1012-1016.
- Wang H., Miyazaki S., Kawai K., Deyholos M., Galbraith D.W., Bohnert H.J.** (2003b). Temporal progression of gene expression responses to salt shock in maize roots. *Plant Molecular Biology* 52 : 873-891.
- Wang H.C., Wu J.S., Chia J.C., Yang C.C., Wu Y.J., Juang R.H.** (2009). Phytochelatin synthase is regulated by protein phosphorylation at a threonine residue near its catalytic site. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57 : 7348-7355.
- Wang R., Okamoto M., Xing X., Crawford N.M.** (2003a). Microarray analysis of the nitrate response in Arabidopsis roots and shoots reveals over 1,000 rapidly responding genes and new linkages to glucose, trehalose-6-phosphate, iron, and sulfate metabolism. *Plant Physiology* 132 : 556-567.
- Wang W., Vinocur B., Shoseyov O., Altman A.** (2004). Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *TRENDS in Plant Science* 9 : 244-252.

- Wang X., Liu Y., Zeng G., Chai L., Song X., Min Z., Xiao X.** (2008). Subcellular distribution and chemical forms of cadmium in *Beckhamia nivea* (L.) Gaud. *Environmental and Experimental Botany* 62 : 389-395.
- Wasteneys G.O., Yang Z.** (2004). New views on the plant cytoskeleton. *Plant Physiology* 136 : 3884-3891.
- Wei S., Zhou Q., Saha U.K., Xiao H., Hu Y., Ren L., Ping G.** (2009). Identification of a Cd accumulator *Conyza canadensis*. *Journal of Hazardous Materials* 163 : 32-35.
- Wei S., Zhou Q., Wang X., Zhang K., Guo G., Ma L.Q.** (2005). A newly-discovered Cd-hyperaccumulator *Solanum nigrum* L. *Chinese Science Bulletin* 50 : 33-38.
- Werck-Reichhart D., Hehn A., Didierjean L.** (2000). Cytochromes P450 for engineering herbicide tolerance. *Trends in Plant Science* 5 : 116-123.
- Wintz H., Vulpe C.** (2002). Plant copper chaperones. *Biochemical Society Transactions* 30 : 732-735.
- Wojas S., Ruszczynska A., Bulska E., Wojciechowski M., Antosiewicz D.M.** (2007). Ca²⁺-dependent plant response to Pb²⁺ is regulated by *LCT1*. *Environmental Pollution* 147 : 584-592.
- Wojcik M., Tukiendorf A.** (2004). Phytochelatin synthesis and cadmium localization in wild type of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Growth Regulation* 44 : 71-80.
- Wojcik M., Vangronsveld J., D'Haen J., Tukiendorf A.** (2005). Cadmium tolerance in *Thlaspi caerulescens* II. Localization of cadmium in *Thlaspi caerulescens*. *Environmental and Experimental Botany* 53 : 163-171.
- Wu C.C., Gardarin A., Catty P., Guillain F., Mintz E.** (2006). CadA, the Cd²⁺-ATPase from *Listeria monocytogenes*, can use Cd²⁺ as co-substrate. *Biochimie* 88 : 1687-1692.
- Wu L.H., Luo Y.M., Xing X.R., Christie P.** (2004). EDTA-enhanced phytoremediation of heavy metal contaminated soil with Indian mustard and associated potential leaching risk. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 102 : 307-318.
- Xu Y., Feng L., Jeffrey P.D., Shi Y.G., Morel F.F.M.** (2008). Structure and metal exchange in the cadmium carbonic anhydrase of marine diatoms. *Nature* 452 : 56-61.
- Xue S.G., Chen Y.X., Reeves R.D., Baker A.J., Lin Q., Fernando D.R.** (2004). Manganese uptake and accumulation by the hyperaccumulator plant *Phytolacca acinosa* Roxb. (Phytolaccaceae). *Environmental Pollution* 131 : 393-399.
- Yanai J., Zhao F.J., McGrath S.P., Kosaki T.** (2006). Effect of soil characteristics on Cd uptake by the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Environmental Pollution* 139 : 167-175.
- Yang J.L., Li Y.Y., Zhang Y.J., Zhang S.S., Wu Y.R., Wu P., Zheng S.J.** (2008). Cell wall polysaccharides are specifically involved in the exclusion of aluminum from the rice root apex. *Plant Physiology* 146 : 602-661.

- Yang X., Feng Y., He Z., Stoffella P. J.** (2005) Molecular mechanisms of heavy metal hyperaccumulation and phytoremediation. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 18 : 339-353.
- Yang X., Long X., Ni W., Fu C.** (2002). *Sedum alfredii* H: A new Zn hyperaccumulating plant first found in China. *Chinese Science Bulletin* 47 : 1634-1637.
- Yang X.E., Shi W.Y., Fu C.X., Yang M.J.** (1998). Copper hyperaccumulators of chinese native plants: characteristics and possible use for phytoremediation. In “*Sustainable Agriculture for Food, Energy and Industry*”. Eds. Bassam N.E.L., James & James Publishers, Londres, pp. 484-489.
- Yoshihara T., Hodoshima H., Miyano Y., Shoji K., Shimada H., Goto F.** (2006). Cadmium inducible Fe deficiency responses observed from macro and molecular views in tobacco plants. *Plant Cell Reports* 25 : 365-373.
- Young D.G.** (1995). The biochemical remediation of TNT contaminated soil. Thèse de Doctorat, Auburn University.
- Yruela I.** (2005). Copper in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 17 : 147-156.
- Zawoznik M.S., Groppa M.D., Tomaro M.L., Benavides M.P.** (2008). Endogenous salicylic acid potentiates cadmium-induced oxidative stress in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Science* 173 : 190-197.
- Zayed A.M., Terry N.** (2003). Chromium in the environment: factors affecting biological remediation. *Plant and Soil* 249 : 139-156.
- Zeng F., Chen S., Miao Y., Wu F., Zhang G.** (2008). Changes of organic acid exudation and rhizosphere pH in rice plants under chromium stress. *Environmental Pollution* 15 : 284-289.
- Zenk H.M.** (1996). Heavy metal detoxification in higher plants - a review. *Gene* 179 : 21-30.
- Zhang X.B., Liu P., Yang Y.S., Chen W.R.** (2007a). Phytoremediation of urban wastewater by model wetlands with ornamental hydrophytes. *Journal of Environmental Sciences* 19 : 902-909.
- Zhang X.H., Liu J., Huang H.T., Chen J., Zhu Y.N., Wang D.Q.** (2007b). Chromium accumulation by the hyperaccumulator plant *Leersia hexandra* Swartz. *Chemosphere* 67 : 1138-1143.
- Zhang Y.W., Tam N.F.Y., Wong Y.S.** (2004). Cloning and characterization of type 2 metallothionein-like gene from a wetland plant, *Typha latifolia*. *Plant Science* 167 : 869-877.
- Zhao F.J., Dunham S.J., McGrath S.P.** (2002). Arsenic hyperaccumulation by different fern species. *New Phytologist* 156 : 27-31.
- Zhao F.J., Jiang R.F., Dunham S.J., McGrath S.P.** (2006). Cadmium uptake, translocation and tolerance in the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *New Phytologist* 172 : 646-654.
- Zhou W., Qiu B.** (2005). Effects of cadmium hyperaccumulation on physiological characteristics of *Sedum alfredii* Hance (Crassulaceae). *Plant Science* 169 : 737-745.

Zhu Y.G., Pilon-Smits E.A.H., Zhao F.J., Williams P.N., Meharg A.A. (2009). Selenium in higher plants: understanding mechanisms for biofortification and phytoremediation. *Trends in Plant Science* 14 : 436-442.

Zhu Y.L., Pilon-Smits E.A.H., Tarun A.S., Weber S.U., Jouanin L., Terry N. (1999). Cadmium tolerance and accumulation in indian mustard is enhanced by overexpressing glutamylcysteine synthetase. *Plant Physiology* 121 : 1169-1177.

Zolla G., Heimer Y.M., Barak S. (2010). Mild salinity stimulates a stress-induced morphogenic response in *Arabidopsis thaliana* roots. *Journal of Experimental Botany* 61 : 211-224.

Liens Internet

BASOL: <http://basol.environnement.gouv.fr>

Donald Danforth Plant Science Center: <http://www.danforthcenter.org/jez/research.asp>

Institut Pasteur: <http://www.pasteur.fr/ip/easysite/go/03b-000011-018/recherche/plates-formes-technologiques/technopole-de-l-institut-pasteur/genopole/pf/pf2-puces-a-adn/protocoles>

Office National des Forêts (ONF) : <http://www.onf.fr>

Phytorestore® : <http://www.phytorestore.com/>

Plateforme Régionale de Cytométrie pour la Microbiologie (PRECYM) : <http://www.com.univ-mrs.fr/PRECYM/spip.php?article24>

The Arabidopsis Information Resource (TAIR) : <http://www.arabidopsis.org/>

Union des Industries de la Protection des Plantes (UIPP) : <http://www.uipp.org>

Résumé

Face à la toxicité provoquée par les éléments traces métalliques dans l'environnement, les végétaux ont développé différentes stratégies de défense. Cependant à ce jour, aucune étude exhaustive (moléculaire, biochimique et développementale) n'avait encore été menée chez *Arabidopsis thaliana* en réponse au cadmium (Cd). Notre travail a donc consisté à étudier les mécanismes mis en jeu en réponse au Cd chez l'écotype Wassilewskija (Ws) d'*A. thaliana* par des approches moléculaire, biochimique et d'étude phénotypique. Dès 50 μ M de Cd, les plantules âgées de 14 jours développent une « réponse morphogénique induite par le stress » (RMIS) au niveau des racines qui se traduit par un raccourcissement de la racine principale et l'initiation multiple de racines secondaires. Parallèlement, l'activité des enzymes de la voie de synthèse des phytochélatines ou PC (glutamylcystéine synthétase, glutathion synthétase et phytochélatine synthase) est stimulée dans la plante entière avec cependant une accumulation plus importante de PC et de Cd dans les racines. Au niveau transcriptionnel, seules les PC synthases sont spatialement régulées en présence de 100 μ M de Cd avec une surexpression des gènes *PCS1* et *PCS2* dans les parties aériennes et les racines respectivement. L'étude transcriptomique sur la totalité du génome d'*A. thaliana* a montré la surexpression de gènes codant notamment des transporteurs potentiels de Cd dans les racines et les parties aériennes, ce qui est en accord avec la présence du métal dans différents organes de la plante. Enfin, nous avons montré que l'écotype Ws est plus tolérant au Cd que les écotypes Columbia et Landsberg erecta. Notre travail s'est aussi focalisé sur la réponse au Cd de jeunes plants de mélèze hybride (*Larix x eurolepis*) obtenus par embryogenèse somatique. Excepté un raccourcissement de la racine principale, le développement du mélèze n'est pas altéré par 1,5 mM de Cd. Bien que la voie de synthèse des PC soit aussi stimulée en réponse au Cd, il semblerait qu'une autre voie de chélation du métal, probablement au niveau pariétal, intervienne dans la mise en place de la tolérance chez le mélèze. **Mots clés** : *Arabidopsis thaliana*, *Larix x eurolepis*, cadmium, phytochélatines, microréseau pangénomique à oligonucléotides, réponse morphogénique induite par le stress (RMIS).

Abstract

The presence of trace metal elements in the environment led plants to develop diverse defense mechanisms. However, no exhaustive study (molecular, biochemical and developmental) had been led to date in *Arabidopsis thaliana* in response to cadmium (Cd) stress. Our work thus consisted in the study of defense mechanisms in response to Cd in the ecotype Wassilewskija (Ws) of *Arabidopsis thaliana* using molecular and biochemical approaches and the study of phenotype. A "stress-induced morphogenic response" (SMIR) is observed in the roots of 14 day-old plants since 50 μ M Cd. This SMIR is characterized by the shortening of the main root and multiple initiations of secondary roots. At the same time, the activity of the enzymes involved in the synthesis of phytochelatin (PC) (glutamylcystein synthetase, glutathione synthetase and phytochelatin synthase) is stimulated in the whole plant, PC and Cd however being more accumulated in roots than in shoots. At the transcriptional level, only PC synthase is spatially regulated in the presence of 100 μ M Cd with an up-regulation of the genes *PCS1* and *PCS2* in the shoots and the roots respectively. The transcriptomic study on the whole genome of *A. thaliana* showed an up-regulation of genes coding particularly potential Cd transporters in roots and shoots, what is in agreement with the presence of the metal in various organs of the plant. Finally, we showed that the ecotype Ws is a better Cd tolerant than ecotypes Columbia and Landsberg erecta. Our work also focused on the response to Cd of young hybrid larch plants (*Larix x eurolepis*) obtained by somatic embryogenesis. A part from a shortening of the main root, the development of the larch is not altered with 1.5 mM Cd. Although the PC synthesis pathway is also stimulated in response to Cd, another way of metal chelation, probably at the cell wall level, seems to be involved in tolerance mechanisms of the larch.

Key words: *Arabidopsis thaliana*, *Larix x eurolepis*, cadmium, phytochelatin, genome-wide DNA microarray, stress-induced morphogenic response (SIMR).