

Liste des abréviations

ABC	ATP-Binding Cassette
APX	Ascorbate Peroxydase
ETMs	Eléments traces métalliques
GSH	Glutathion
GSHS	Glutathion Synthétase
GST	Glutathion-S-Transférase
HMA	Heavy Metal ATPase
IRT	Iron-Regulated Transporter
MRE	Metal Response Element
MS	Murashige et Skooge
MT	Métallothionéine
NRAMP	Natural Resistance-Associated Macrophage Protein
PC	Phytochélatine
ROS	Reactive Oxygen Species
SOD	Superoxyde Dismutase
TBE	Tris Borate EDTA
ZIP	Zinc and Iron regulated transporters Protein
ZRT	Zinc-Regulated Transporter

Listes des acronymes et sigles

CNRA	Centre National de la Recherches Agronomiques
FST	Faculté des Sciences et Techniques
ISESCO	Organisation Islamique pour l'Education, les Sciences et la Culture
ISRA	Institut Sénégalais de Recherche Agricole
LPBV	Laboratoire de Physiologie et des Biotechnologies Végétales
UCAD	Université Cheikh Anta Diop
UMR	Université Mohamed V de Rabat (Maroc)
USSEIN	Université Sine Saloum El hadji Ibrahima Niass

Liste des figures

Figure 1 : Origines des métaux lourds dans le sol (Robert et Juste, 1999)	8
Figure 2 : Effet de l'exposition chronique à différentes concentrations de zinc sur la croissance aérienne et racinaire chez le Pin	12
Figure 3 : Génération de différentes ROS par transfert d'énergie ou réduction monovalente séquentielle de l'oxygène triplet à l'état fondamental (Apel & Hirt, 2004).....	16
Figure 4 : Les principaux modes de nettoyage enzymatique des ROS par la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT), le cycle ascorbate-glutathion et le cycle glutathion-péroxydase (GPX) (Apel & Hirt, 2004).	18
Figure 5 : Courbe de calibration standard de la proline construite à partir de concentration connue.....	24
Figure 6 : Longueur (en cm) de la partie aérienne (A) et racinaire (B) de <i>H. incana</i> cultivée en hydroponie pendant 15 jours en présence de différents niveaux de traitement au zinc	28
Figure 7 : Poids frais (en g) de la biomasse aérienne (A) et racinaire des jeunes plants de <i>H. incana</i> cultivées en hydroponie pendant 15 jours en présence de différents niveaux de traitement au zinc	29
Figure 8 : Teneur en chlorophylles a (A) et b (B) (mg/mg de matière fraîche) des feuilles de jeunes plants de <i>H. incana</i> cultivée en hydroponie pendant 15 jours en présence de différents niveaux de traitements au zinc	30
Figure 9 : Teneur en proline des jeunes plants de <i>H. incana</i> cultivée en hydroponie pendant 15 jours en présence de différents niveaux de traitements au zinc	31
Figure 10 : Teneur en anthocyanes (Absorbance/mg de matières fraîches) des jeunes plants de <i>H. incana</i> cultivée en hydroponie pendant 15 jours en présence de différents niveaux de traitements au zinc.	32

Liste des photos et des planches

Planche 1 : Plante de <i>Hirschfeldia incana</i> et organes aériens	4
Photo 1 : Répartition géographique de <i>H. incana</i>	5
Photo 2 : Oxyde de zinc	7
Planche 2 : Jeunes plants de <i>H. incana</i> germés dans des boîtes de Petri.....	21
Planche 3 : Culture des jeunes plants de <i>H. incana</i> en hydroponie dans la chambre de culture	22
Photo 3 : Aspect des jeunes plants de <i>H. incana</i> soumises à différentes concentrations de zinc	26

Liste des tableaux

Tableau 1 : Effets des trois traitements de zinc sur les paramètres de croissance mesurés ...	26
Tableau 2 : Effet des trois traitements de zinc sur les paramètres biochimiques mesurés.....	27
Tableau 3 : Relation entre les différentes variables mesurées	32

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	ii
Dédicace	iii
Remerciements	iv
Liste des abréviations.....	vi
Listes des acronymes et sigles.....	vi
Liste des figures	vii
Liste des photos et des planches.....	viii
Liste des tableaux.....	viii
Table des matières.....	ix
Introduction	1
I. Généralités sur <i>Hirschfeldia incana</i> (L.) Lagr-Foss	3
I.1 Position systématique et description botanique de <i>Hirschfeldia incana</i> (L)	3
I.1.1 Position systématique de <i>H. incana</i> (L.)	3
I.1.2 Description botanique de <i>H. incana</i> (L.) Lagr-Foss.....	3
I.2 Origine, diffusion et répartition géographique	5
I.2.1 Origine de <i>H. incana</i> (L.).....	5
I.2.2 Diffusion et répartition géographique	5
I.3 Importance agro-écologique de <i>H. incana</i> (L.).....	6
I.4 Rôle potentiel de <i>H. incana</i> (L.) dans la phytorémédiation.....	6
II. Généralités sur le zinc	7
II.1 Propriétés physico-chimiques du zinc.....	7
II.2 Origine du zinc.....	7
II.2.1 Origines naturelles du zinc	7
II.2.2 Origines anthropiques du zinc.....	8
II.3 Effet du zinc sur la santé humaine.....	9
II.4 Le zinc : importance, toxicité et carence chez la plante.....	9
III. Mécanismes physiologiques et biochimiques induits par le zinc chez les plantes	10
III.1 Etudes de l'effet du stress dû au zinc sur les processus physiologiques majeurs chez les plantes	10
III.1.1 Effet du zinc sur la germination, la croissance et le développement.....	10
III.1.2 Effet du zinc sur l'absorption hydrominérale, la photosynthèse et la respiration.....	12
III.1.3 Effet du zinc sur la senescence et l'apoptose cellulaire	14
III.2 Mécanismes biochimiques des plantes en réponse au stress dû au Zinc.....	15

III.2.1	Synthèse de composés oxydants et d'antioxydants	15
III.2.1.1	La synthèse de composés oxydants : les ROS	15
III.2.1.2	Synthèse de composés antioxydants	17
III.2.2	Biomolécules impliquées dans l'hyper-accumulation des métaux lourds : cas du zinc	
	18	
I.	Matériel	20
I.1	Matériel végétal	20
II.	Méthodes	20
II.1	Culture <i>in vitro</i>	20
II.1.1	Désinfection des graines.....	20
II.1.2	Mise en culture des graines	20
II.2	Culture en hydroponie	21
II.3	Mesure des paramètres de croissance et caractérisation biochimique	22
II.3.1	Récolte et conditionnement des jeunes plants.....	22
II.3.2	Mesure des paramètres de développement.....	23
II.3.3	Caractérisation biochimique.....	23
II.3.3.1	Dosage des chlorophylles a et b	23
II.3.3.2	Dosage de la proline	23
II.3.3.3	Dosage des anthocyanes.....	24
II.4	Analyses statistiques.....	24
I.	Résultats	26
I.1	Effets du zinc sur les paramètres de développement de la plante	26
I.2	Effets du zinc sur les paramètres biochimiques de la plante	27
I.3	Effet du zinc sur la longueur et le poids frais des parties aériennes et racinaires de la plante	27
I.3.1	Effet du zinc sur la longueur des parties aériennes et racinaires	27
I.3.2	Effet du zinc sur le poids frais de la biomasse aérienne et racinaire	28
I.4	Effet du zinc sur la teneur en chlorophylle a (A) et b (B).....	29
I.5	Effet du zinc sur la teneur en proline	30
I.6	Effet du zinc sur la teneur en anthocyanes.....	31
I.7	Relations entre les différentes variables.....	32
II.	Discussion	33
	Conclusion et perspectives	36
	Références bibliographiques	37
	Annexes	A

Introduction

La contamination des sols par les métaux lourds est actuellement l'un des problèmes environnementaux les plus préoccupants dans le monde (Hashemi, 2012). Les sols, les eaux de surfaces et les eaux souterraines contaminées par les métaux lourds posent de sérieux problèmes de santé humaine, animale et végétale (Manousaki *et al.*, 2014). Les menaces posées par les métaux lourds sont aggravées par leur persistance à long termes dans l'environnement suite à leur caractère non-biodégradable (Yoon *et al.*, 2006). Grâce aux activités anthropiques telles que l'extraction des métaux lourds, les fonderies, l'agriculture avec l'application des boues d'épuration..., la teneur en métaux des sols ne cesse de croître plus particulièrement dans les zones environnantes des sites d'exploitation des métaux lourds. La forte implication du Maroc dans l'exploitation des métaux lourds et ses nombreux sites miniers rendent sa situation alarmante. Parmi les métaux lourds, les plus communément toxiques sont l'Arsénique (As), le Plomb (Pb), le Mercure (Hg), le Cadmium (Cd), le Chrome (Cr), le Cuivre (Cu), le Nickel (Ni), l'Argent (Ag) et le zinc (Zn) (Saghi *et al.*, 2016). Ce dernier, est à faible dose un micronutrisnt indispensable à la vie grâce à son implication dans de nombreux processus métaboliques. Cependant, à concentration élevée, il peut entraîner de nombreuses perturbations au niveau cellulaire voire tissulaire pouvant aller jusqu'à la mort de la plante. Face à cette menace constante pour la santé humaine et environnementale, il est d'une importance capitale de développer des technologies capables de limiter les effets délétères de ces métaux lourds. Cependant, les techniques conventionnelles utilisées, malgré leurs efficacités relatives s'avèrent très coûteuses, laborieuses avec des effets non négligeables sur l'environnement (Fahr, 2014). C'est ainsi que de nouvelles techniques plus efficaces, peu coûteuses, respectueuses de l'environnement dont la phytorémédiation ont été développées. Cette dernière, consiste à l'utilisation des plantes pour absorber, dégrader ou immobiliser les contaminants d'un sol. Cette approche repose essentiellement sur la capacité de la plante utilisée à accumuler voire hyper-accumuler des quantités exceptionnelles de métaux lourds dans ses organes. C'est ainsi que la Brassicacée, *Hirschfeldia incana*, (L.) Lagr.- Foss. ou Faux rapiste blanchâtre retrouvée dans des sites miniers abandonnés au Maroc est ciblée comme candidate pour la phytorémédiation. En plus de son aptitude à croître sur ces sites pollués aux métaux lourds, de nombreuses études ont rapporté qu'elle serait capable d'hyper-accumuler des concentrations exceptionnellement élevées de métaux lourds dont le zinc dans ses parties aériennes.

Ce présent travail a pour objectif général de contribuer à la caractérisation physiologique de *H. incana* (L.) pour sa tolérance au stress dû au zinc et son utilisation éventuelle dans la

phytoremédiation. Les objectifs spécifiques visés dans cette étude sont de/d' : 1) évaluer l'effet de l'excès de zinc sur la production de biomasse aérienne et racinaire chez *H. incana* et 2) déterminer l'effet de l'excès de zinc sur des paramètres biochimiques d'expression de la tolérance au zinc.

Ce présent rapport est divisé en trois parties principales à savoir une première intitulée références bibliographiques renseignant sur l'état des connaissances sur le zinc et les mécanismes physiologiques et biochimiques de tolérances des plantes au stress dû au zinc. La deuxième partie intitulée matériel et méthodes, regroupe tous les matériel et méthodes utilisés pour mener à bien les travaux. En fin, une troisième partie intitulée résultats et discussion, consacrée aux résultats obtenus et leurs discussions. Pour finir une conclusion a été tiré et des perspectives ont été dégagées.

I. Généralités sur *Hirschfeldia incana* (L.) Lagr-Foss

I.1 Position systématique et description botanique de *Hirschfeldia incana* (L.)

I.1.1 Position systématique de *H. incana* (L.)

Hirschfeldia incana (L.) est une espèce appartenant au genre *Hirschfeldia*. L'appartenance à ce genre est très controversée et même certaines formes d'espèce de ce genre seraient toujours allouées à d'autres genres et renommées (Siemens, 2011). Néanmoins, l'espèce *Hirschfeldia incana* appartient au règne végétal, au sous-règne des Plantes vascularisées, à l'embranchement des Phanérogames, au sous embranchement des Angiospermes, à la classe des Dicotylédones, à l'ordre des Brassicales, à la famille des Brassicacées et au genre *Hirschfeldia* (Fahr, 2014). Dans cette famille des Brassicacées d'environ 3800 espèces réparties dans plus de 338 genres (Al-Shehbaz *et al.*, 2006), d'après l'analyse des gènes de la phytochrome A (*PHYA*) et du gène chloroplastique *ndhF*, *H. incana* serait plus étroitement apparentée à l'espèce *Brassica oleracea* (Beilstein *et al.*, 2008; Warwick *et al.*, 2011). *H. incana* est synonyme à *Sinapis incana*, *S. geniculata*, *Brassica incana*, *B. geniculata*, *B adpressa* et *Hirschfeldia adpressa* (Parsons *et al.*, 2001). Par ailleurs, elle est plus communément connue sous le nom de « Hoary mustard » aux Etats-Unis et de « Faux rapiste blanchâtre » en France (Parsons *et al.*, 2001 ; Fahr, 2014).

I.1.2 Description botanique de *H. incana* (L.) Lagr-Foss

H. incana (L.) est une Brassicacée, annuelle ou bisannuelle, thermophile et nitrophile pouvant atteindre 1,5 m de haut. Elle est généralement ramifiée et possède une production individuelle de graines élevée (Gupta, 2013 ; Fahr, 2014). Cette plante anciennement considérée comme une herbe sauvage (Parsons *et al.*, 2001) apparaît sous forme de rosette (Planche 1A).

Les feuilles vert-grises se distinguent en deux types (Planche 1B) : des feuilles supérieures sessiles, glabres, étroitement lancéolées avec une marge dentée et des feuilles inférieures pétiolées, densément pileuses, profondément lobées avec un grand lobe terminal largement ovale et une marge grossièrement dentée. Ses fleurs (Planche 1C) sont de couleur jaune pâle et de diamètre variant de 1,2 à 1,6 cm. Elles sont constituées de 4 sépales inégaux de moins de 5 cm de long et 4 pétales de moins de 4 mm de large. Elles se forment à l'extrémité des branches en forme des grappes de fleurs. Les fruits (Planche 1E) sont des gousses cylindriques de 1,2 à 1,5 cm de long et de 1 à 1,5 cm de large, remplies de perles dont chacune est munie d'une nervure dorsale diffuse et d'un bec cylindrique. Chaque perle contient 2 à 3 graines d'environ 1 mm de diamètre de couleur brune rougeâtre (Planche 1B). Les graines

possèdent à maturité une dormance tégumentaire pouvant être levée après une période d'un mois de post-maturation. La tige de cette plante longue de 30 à 100 cm et de couleur verte grisâtre, est soit ramifiée ou non. Elle est densément couverte sur sa moitié inférieure par des poils raides blancs pointés vers le bas. Elle possède un système racinaire pivotant mince avec des ramifications latérales fibreuses dans les 30 cm supérieurs du sol (Parsons *et al.*, 2001; Fahr, 2014).

Elle boucle son cycle de vie sur un ou deux ans. Après la levée de la dormance tégumentaire, ses graines germent facilement en automne en produisant une rosette de feuilles profondément lobée. La tige apparaît au centre de cette rosette de feuilles à partir de mi-février. La floraison par contre commence en septembre et se poursuit tant que l'humidité est suffisante jusqu'en février. À cette date, les tiges meurent et ne persistent dans le sol que les racines qui attendent que les conditions environnementales (humidité surtout) redeviennent normales pour qu'elles poussent à nouveau (Parsons *et al.*, 2001 ; Fahr, 2014). *Hirschfeldia incana* est normalement une espèce à pollinisation croisée (allogame) du fait de la protogynie qui s'oppose à l'autofécondation. Cependant, certains individus de l'espèce sont capables de s'autoféconder (Siemens, 2011 ; Gupta, 2013).

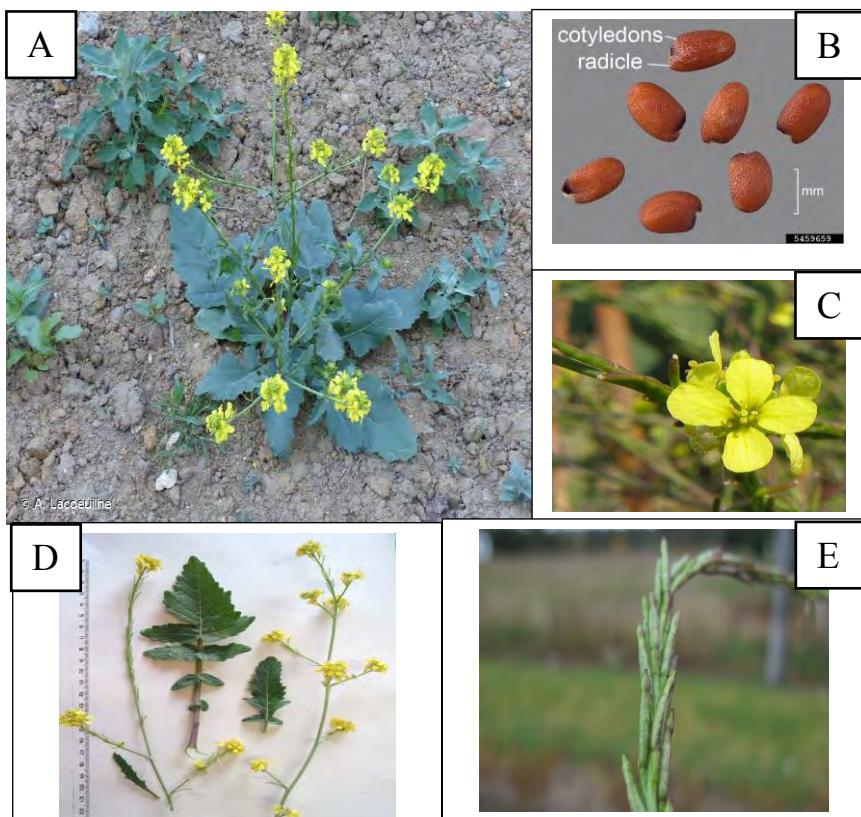


Planche 1 : Plante de *Hirschfeldia incana* et organes aériens

A : *Hirschfeldia incana* poussant sur des scories métallifères ; B : Graines de *H. incana* ; C : Fleur mature de *H. incana* ; D : Feuille et tiges portant des fleurs; E : Grappe fruit de *H. incana*

I.2 Origine, diffusion et répartition géographique

I.2.1 Origine de *H. incana* (L.)

H. incana est une espèce originaire de l'Asie occidentale et centrale, de l'Afrique du nord et a été signalée comme indigène et introduite dans certaines régions d'Europe (USDA-NRCS, 2016). Il y a toujours une controverse au sujet du statut d'indigène ou d'introduit de cette espèce en Europe. Néanmoins, il est rapporté que *H. incana* est une espèce native des régions méditerranéennes et des îles Normandes (Parsons *et al.*, 2001 ; Fahr, 2014).

I.2.2 Diffusion et répartition géographique

De son centre d'origine, *Hirschfeldia incana* s'est très largement diffusée dans le monde entier (Photo 2). Sa propagation est entièrement due aux mouvements de ses graines, généralement dans la boue adhérant au stock, aux machines, aux autres véhicules et aux vêtements. Les eaux circulantes à la surface des terres ont également participé à la diffusion de ses graines (Parsons *et al.*, 2001). Ainsi, elle a été introduite par l'homme en Amérique du Nord (particulièrement en Californie et au Mexique), en Afrique du Sud, en Nouvelle-Zélande et en Australie pendant les dernières années du 19^e siècle (Parsons *et al.*, 2001 ; Fahr, 2014). En Europe, elle s'est bien établie dans les parties ouest, centrale et sud-est (Chronopoulos *et al.*, 2005; Gupta, 2013). *Hirschfeldia incana* est une espèce bien adaptée des zones à température moyennement chaude, où elle pousse comme adventive occasionnelle sur les sols les plus fertiles des sites perturbés. Elle pousse en grandes colonies sur les bordures des routes, le long des clôtures et dans les friches agricoles (Gupta *et al.*, 2013 ; Fahr, 2014).



Photo 1 : Répartition géographique de *H. incana*

Les points rouges indiquent les lieux où est présente *H. incana*

I.3 Importance agro-écologique de *H. incana* (L.)

H. incana a pendant longtemps été considérée comme une espèce n'ayant aucune importance économique et parfois même comme une mauvaise herbe (Siemens, 2011). Cependant, elle s'est aujourd'hui révélée comme une espèce regorgeant d'importants potentiels agronomique et économique. En effet, *H. incana* est l'une des quatre espèces de Brassicacée aptes à s'hybrider spontanément avec *Brassica napus*. En raison de sa résistance à certaines maladies (*Leptosphaeria maculans* par exemple), elle a été utilisée comme donneuse de gènes de résistance (Gupta, 2013 ; Siemen, 2011). Elle a aussi été utilisée pour le transfert des gènes de la stérilité mâle cytoplasmique afin d'obtenir des lignées mâles stériles de *Brassica oleracea*. Elle est aussi identifiée comme donneuse potentielle de gènes pour développer des lignées de colza résistantes à l'éclatement (Gupta, 2013)..

I.4 Rôle potentiel de *H. incana* (L.) dans la phytorémédiation

H. incana est décrite comme une espèce pseudométallophyte du fait de son aptitude à pousser à la fois sur des sols non contaminés et sur des sols contaminés en métaux lourds (Fahr, 2014). Elle peut supporter des conditions extrêmes de toxicité en cuivre (Siemens, 2011). Des études ont rapporté qu'elle est capable d'accumuler de fortes concentrations de thallium (Madejon *et al.*, 2005), de zinc (Del Río-Celestino *et al.*, 2006) de plomb (Del Rio-Celestino *et al.*, 2006 ; Auguy *et al.*, 2013) et de cuivre (Chen *et al.*, 2015). Elle a été également décrite comme capable de croître sur des sols avec de fortes concentrations en arsénic et d'en accumuler des concentrations très élevées (Gisbert *et al.*, 2008). Del Río-Celestino *et al.* (2006), dans leurs études d'espèces de plantes efficientes pour la phytoextraction de sols pollués en Pb et en Zn, ont montré que *H. incana* est hautement plus efficiente que les autres espèces de plantes qu'ils ont étudiées, lorsque les valeurs de biomasses étaient prises en compte. Malgré ces résultats prometteurs pour l'utilisation de *H. incana* dans la phytorémédiation de sols pollués, peu de données moléculaires sont disponibles pour cette espèces (Siemens, 2011). Néanmoins, de récentes études se sont intéressées aux gènes qui seraient impliqués dans cette tolérance voire accumulation de métaux lourds. En effet, par l'approche PCR quantitative, deux gènes dont l'expression été particulièrement induite par l'exposition au plomb ont été décrits (Auguy *et al.*, 2013). En outre, la comparaison de l'expression totale des gènes en utilisant des microarray entre *Arabidopsis thaliana* (sensible au plomb) et *H. incana* ont permis d'identifier et de caractériser un ensemble de gènes spécifiques, exprimés en réponse à l'exposition au plomb (Auguy *et al.*, 2015).

II. Généralités sur le zinc

II.1 Propriétés physico-chimiques du zinc

Le Zinc, de formule chimique Zn et de numéro atomique 30, est un élément moyennement abondant dans la croûte terrestre. Il constitue le 24^e élément dans l'ordre d'abondance dans la croûte terrestre. Il est 600 fois plus abondant que le cadmium et environ 1500 fois plus abondant que le mercure. Dans le tableau de classification périodique, il fait partie des éléments du 12^e groupe (12^e colonne) et de la 4^e période (4^e ligne). Le zinc forme de nombreux sels solubles tels que les sulfates, les halogénures, l'oxyde de zinc (photo 3) et les nitrates, ainsi que d'autres composés peu ou pas solubles. Dans le sol, il est sous trois fractions différentes (Licinio, 2017). Du point de vue physique, c'est un métal brillant, gris bleuté à blanc légèrement teinté en bleu-gris. Il n'est ductile et malléable qu'entre 105 °C et 130 °C, voire 150 °C.



Photo 2 : Oxyde de zinc

II.2 Origine du zinc

II.2.1 Origines naturelles du zinc

Le zinc est un métal qui existe naturellement dans la croûte terrestre (Figure 1). Sa présence naturelle dans le sol et les sédiments est due soit à l'érosion de la roche mère qui en constitue la principale source naturelle soit par des retombées atmosphériques naturelles provenant de phénomènes tels que le volcanisme (Panfili, 2014 ; Licinio, 2017). Cependant, il peut être fortement concentré dans certains endroits en formant des gisements. Ces derniers sont soit d'origine magmatique dits primaires soit d'origine sédimentaire dits secondaires. Dans ces gisements, le zinc peut y atteindre des concentrations de l'ordre 40 à 120 mg/kg (Brignon, 2015). Il y est le plus souvent associé à d'autres minéraux tels que le plomb, le cuivre ou le fer. Les principaux gisements de minéraux de zinc se situent en Chine et en Australie. Des gisements

exploités se situent aussi au Pérou, aux Etats Unis, au Canada, au Maroc et dans d'autre pays (U.S. Geological survey, 2020).

II.2.2 Origines anthropiques du zinc

Les métaux lourds contaminant le sol sont essentiellement d'origines anthropiques (Figure 1). Selon Panfili, (2014), le zinc est essentiellement produit par les activités minières et les fonderies, par l'agriculture, par les activités domestiques et urbaines et par d'autres sources telles les industries. Les premières émissions anthropiques de zinc ont débuté involontairement avec l'extraction de divers métaux comme l'or, le cuivre... Le zinc, naturellement présent dans ces minéraux, n'était pas exploité et était donc laissé en contact avec l'environnement (Licinio, 2017). La non efficience des procédés d'extraction tels l'extraction par grillage des sphalérites produit des scories très riches en zinc (jusqu'à 20%) qui restent entasser à l'air libre sans aucune précaution. Des émissions de poussière riche en métaux tels que le zinc peuvent provenir des fonderies (Panfili, 2014). Ces diverses voies de contamination font des industries métallurgiques la plus importante source de contamination en métaux de l'environnement. A côté de cela, l'agriculture, par l'apport de divers fertilisants constitue une source anthropique importante du zinc. En effet, certains fertilisants organiques tels les fumiers en particulier les déjections de porcs et de volailles contiennent principalement le zinc et le cuivre. C'est également le cas des engrains à base de chaux, des boues urbaines et des pesticides qui sont aussi chargé en métaux lourds dont le zinc (Licinio, 2017). Le ratio d'émissions anthropiques du zinc par rapport aux émissions naturelles était estimé à 20 pour 1 vers les années 90 (Licinio, 2017).

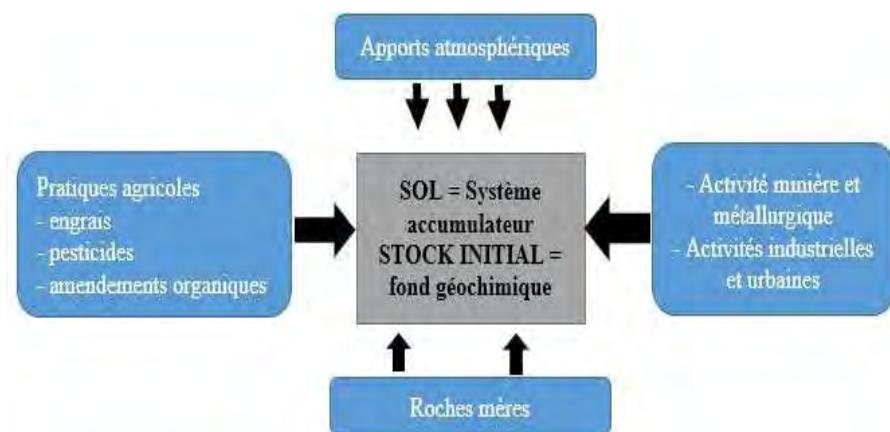


Figure 1 : Origines des métaux lourds dans le sol (Robert et Juste, 1999)

II.3 Effet du zinc sur la santé humaine

Le zinc est le deuxième oligo-élément le plus abondant dans le corps humain (après le fer) et est le plus abondant dans l'espace intracellulaire (Chasapis *et al.*, 2012; Livingstone, 2015). C'est un oligo-élément ubiquiste dans le corps avec environ 85% du zinc total du corps contenu dans les muscles et les os. Il est essentiel à la croissance normale, à l'hématopoïèse, à la fonction immunitaire et au développement neurologique pendant la petite enfance (Corniola *et al.*, 2008; Nissensohn *et al.*, 2016). Le zinc régule le pH des fluides corporels, favorise la production de collagène pour la formation de cheveux, de peau, d'ongles, contribue à améliorer la mémoire et le développement mental, maintient le fonctionnement normal de la prostate et joue un rôle important dans la sécrétion de testostérone (Bhowmik & Kumar, 2010). Vue son importance, sa carence peut entraîner des dysfonctionnements. La carence en zinc entraîne une altération de l'homéostasie en raison d'un défaut d'agrégation plaquettaire, d'une diminution du nombre de lymphocyte T, de leur réponse aux phytomitogènes. La carence est aussi associée à certaines maladies telles que les troubles gastroentériques, les maladies rénales et certains types de cancer. Chez les femmes enceintes, une carence en zinc peut entraîner une diminution des cellules cérébrales fœtales et affecter leur développement (Chasapis *et al.*, 2011). Selon Maret, (2013), la carence en zinc retarde la croissance, compromet les systèmes immunitaires et nerveux et touche pratiquement tout autre système organique. Comme la carence, l'excès de zinc peut entraîner une toxicité. En effet, un risque de toxicité peut avoir lieu lorsqu'un excès de Zn est perfusé. Il peut entraîner de manière aiguë des symptômes de nausées, de vomissement et de diarrhée (Livingstone *et al.*, 2015).

II.4 Le zinc : importance, toxicité et carence chez la plante

Le zinc est un micronutriment vital pour toutes les formes de vie (Bhowmik & Kumar, 2010). Environ 9% du protéome des eucaryotes contiennent du zinc. Il est le seul élément métallique représenté dans toutes les six classes d'enzymes (oxydoréductase, hydrolase, transférase, lyases, isomérase et ligase) (Feigl *et al.*, 2015). Du fait de l'absence d'activité oxydo-réductrice de son ion Zn^{2+} , le zinc est le candidat par excellence des protéines et enzymes dans leurs interactions avec des molécules délicates telles que l'ADN et l'ARN. Ce qui fait de lui un constituant important des ADN polymérases et des ARN polymérases (Licinio, 2017). Par son cation Zn^{2+} , le zinc joue un rôle important dans l'activation de l'enzyme-clé du cycle de Calvin et dans l'équilibre entre la liaison CO_2 et O_2 par la protéine (Rout & Das, 2002). Cependant, malgré toute son importance, à concentration élevée, le zinc devient toxique (Mateos-Naranjo *et al.*, 2018). Chez les plantes, l'inhibition de la croissance est un phénomène

généralement associé à la toxicité du zinc. En effet, la croissance des racines de jeunes plants de *Cajanus cajan* est complètement inhibée après 24h de traitement avec 7,5 mM de Zn. Ce traitement entraîne des dommages au niveau des cellules corticales des racines mais aussi des modifications majeures dans le noyau des cellules des extrémités racinaires (Rout & Das, 2002). La toxicité du zinc peut aussi être à l'origine de déséquilibres physiologiques chez la plante telles que l'induction de la déficience en ions Fe dans la plante conduisant à une défoliation (Long *et al.*, 2003). La chlorose est également un symptôme associé à la toxicité du zinc. Elle conduit en fin de compte à une inhibition de la croissance et à une diminution de la production de biomasses et peut à la longue être fatale à la plante (Rout & Das, 2002). Malgré les effets multiples de la toxicité du zinc sur la plante et ses métabolismes, elle reste largement moins répandue que ceux de sa déficience chez les plantes (Broadley *et al.*, 2007). En effet, la carence en zinc pose aussi bien des problèmes chez la plante elle-même mais également chez l'homme dont la principale source en zinc est la plante (Licinio, 2017). Comme la toxicité, la carence aussi cause une réduction de la production de biomasse mais d'autres symptômes tels que la chlorose, les taches nécrotiques, le brunissement, la déformation des feuilles. De plus, elle entraîne plusieurs changements dans les processus physiologiques tels que la réduction du taux photosynthétique, l'inhibition de la synthèse de protéines et d'amidon, la déstabilisation de la membrane, le retard de la floraison et la production de graines (Navarro-León *et al.*, 2016).

III. Mécanismes physiologiques et biochimiques induits par le zinc chez les plantes

III.1 Etudes de l'effet du stress dû au zinc sur les processus physiologiques majeurs chez les plantes

III.1.1 Effet du zinc sur la germination, la croissance et le développement

Le zinc est un micronutriment essentiel impliqué dans de nombreux processus physiologiques chez la plante tels que l'activation de plusieurs enzymes, la synthèse des protéines, des carbohydrates et dans le métabolisme des acides nucléiques et des lipides (Jain *et al.*, 2010). L'effet du zinc sur la germination, la croissance et le développement dépend, d'une part de la concentration et de la durée de contact avec le zinc (Munzuroglu & Geckil, 2002) et, d'autre part du stade de développement (Lefèvre *et al.*, 2009). Manivasagaperumal *et al.* (2011) ont rapporté que chez la grappe de haricot variété CP78, les faibles concentrations de zinc (10 à 25 mg/l) augmentaient significativement la germination des graines et la croissance des jeunes plants tandis que les fortes concentrations (50 à 200 mg/l) les inhibaient. Munzuroglu & Geckil,

(2002) avaient antérieurement rapporté que la germination et la croissance des racines, des hypocotyles et des coléoptiles chez le blé et le concombre variaient en fonction de la concentration (de 0,5 à 8,0 mM) mais aussi de la durée de contact (24h et 72h) avec le zinc. Selon Manivasagaperumal *et al.* (2011), pour la plupart des métaux lourds, les faibles concentrations entraînent une stimulation de la germination. L'effet du métal sur la germination et la croissance dépend également de l'espèce de plante. *Eruca sativa* est décrite, par Ozdener & Kutbay (2009) comme très tolérante au zinc et peut, par conséquent se développer sur des concentrations très élevées. Alfalfa (*Mecago sativa*), quant à elle, est décrite par Zhi *et al.* (2015) comme une espèce hautement tolérante au zinc et qui serait même stimulée par la présence de forte concentration de zinc (40 ppm) dans le milieu de culture. Néanmoins, pour chaque espèce de plante, il existe un certain seuil à partir duquel le zinc devient毒ique et inhibe la germination et la croissance. Selon Manivasagaperumal *et al.* (2011), l'inhibition de la germination par l'excès de zinc peut être due, d'une part, à accélération de la dégradation des réserves nutritives de la graine et, d'autre part, à l'altération des propriétés de la perméabilité sélective de la membrane cellulaire. Stanković *et al.* (2010), soutiennent que l'inhibition de la germination résulte de l'inhibition de la respiration chez l'embryon de la graine. Quant à la croissance et au développement des plantes, l'action inhibitrice des métaux lourds est plus effective car souvent dépourvu de structures protectrices (figure 2). La perturbation du métabolisme des hormones de la plante et la privation de processus photosynthétiques normaux, la nutrition minérale, les voies de transport d'eau et des produits photosynthétiques sont des mécanismes par lesquels les métaux lourds inhibent la croissance et le développement des plantes (Stanković *et al.*, 2010). Selon Jain *et al.* (2010), l'inhibition de la croissance et du développement de la plante par des doses élevées de zinc peut passer par une interférence entre le zinc et le déroulement de la séquence normale de la mitose.

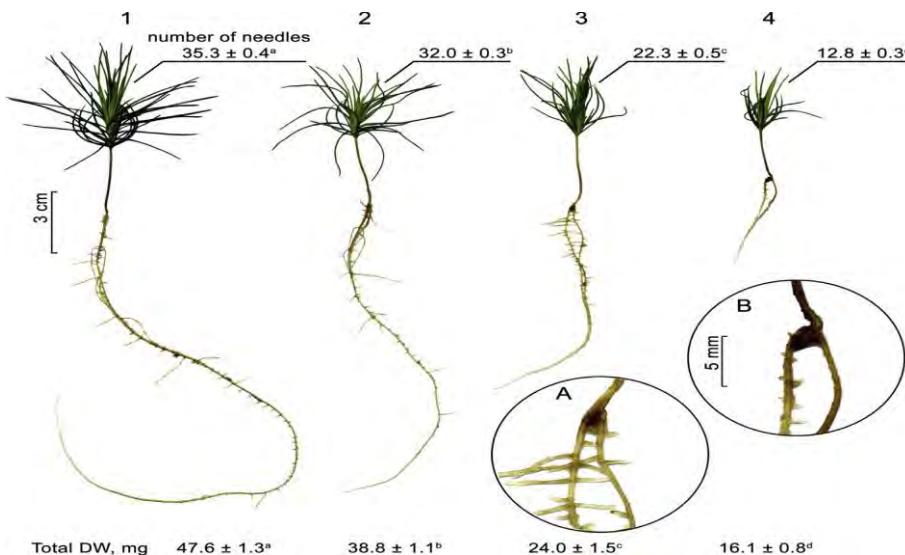


Figure 2 : Effet de l'exposition chronique à différentes concentrations de zinc sur la croissance aérienne et racinaire chez le Pin

1: 1,26 mM ZnSO₄, 2 : 50 mM ZnSO₄, 3 : 150 mM ZnSO₄, 4 : 300 mM ZnSO₄. A, B : images agrandies des racines de jeunes plants Pin, cultivées en présence de 150 mM et 300 mM ZnSO₄, respectivement. (Ivanov *et al.*, 2016).

III.1.2 Effet du zinc sur l'absorption hydrominérale, la photosynthèse et la respiration

Le zinc joue un rôle important dans plusieurs processus métaboliques des plantes. Il active les enzymes et est impliqué dans la synthèse des protéines, des acides nucléiques, des carbohydrates, de l'auxine, etc... (Stoyanova & Doncheva, 2002; Ozdener & Kutbay, 2009). Cependant, lorsque le zinc est accumulé en fortes concentrations, il peut causer l'altération de divers processus physiologiques vitaux tels que la photosynthèse, la biosynthèse de chlorophylles, le transport d'électrons photosynthétiques et l'intégrité de la membrane cellulaire. Il peut aussi affecter négativement l'absorption des autres éléments nutritifs et les activités des enzymes liées aux métabolismes des plantes (Wang *et al.*, 2009; Jain *et al.*, 2010).

➤ Effet du zinc sur l'absorption hydrominérale des plantes

De nombreuses études ont rapporté l'inhibition de l'absorption de différents éléments minéraux par les plantes lorsqu'elles sont soumises à la toxicité du zinc (Päivöke, 2003; Wang *et al.*, 2009). Selon Cayton *et al.* (1985), l'augmentation du niveau de zinc dans le milieu de culture réduit la translocation du Zn, Fe, Mg, K, P et Ca et donc cause l'accumulation de ces nutriments au niveau des racines. Ils ont aussi rapporté que le Zn interfère avec le Cu au niveau des sites primaires d'absorption pour inhiber son absorption. Ce déséquilibre provoqué par le zinc constitue l'un des symptômes de sa toxicité pour les plantes (Wang *et al.*, 2009). Le phosphore, un macroélément essentiel pour la plante, impliquée

dans le stockage et transfert de l'énergie et dans la maintenance et le transfert du code génétique (Jiang *et al.*, 2007), est significativement réduit chez les jeunes plants de Colza traités avec des concentrations de zinc comprises entre 0,28 et 1,12 mM (Wang *et al.*, 2009). Cette réduction de la teneur de phosphore a été précédemment rapportée par Päivöke, (2002) chez des jeunes plants de *Pisum sativum* lorsqu'ils sont soumis au stress dû au zinc. Cette interférence du zinc avec l'absorption du P pour les plantes entraîne l'inhibition de leur croissance (Rout & Das, 2002). L'excès de zinc entraîne une diminution de la teneur d'autres éléments nutritifs essentiels pour les plantes. Ainsi, les teneurs des plantes en Fe, Mg, Mn et Cu décroissaient sous l'effet de la toxicité du zinc (Päivöke, 2002 ; Wang *et al.*, 2009). Selon Ambler *et al.* (1970) les niveaux élevés de Zn chez le Soja interfèrent avec la translocation du Fe en inhibant la capacité réductrice des racines ($\text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{Fe}^{2+}$) ou en accentuant d'autres réactions préjudiciables à la translocation du Fe. Päivöke (2002), a aussi rapporté que l'exposition au zinc diminuait la teneur en Fe de la plante entière. Les teneurs en Mg et Mn des tiges d'*Agrostis stolonifera* diminuaient avec l'exposition au zinc (Bernhard *et al.*, 2005). La diminution de la teneur en Mg et Mn ainsi que celle du Fe est plus marquée dans les racines que dans les tiges des jeunes plants de Colza traité avec du Zn. L'acquisition d'azote inorganique par la plante est aussi affectée par les niveaux élevés de Zn (Päivöke 2002). L'excès de zinc affecte également le statut hydrique normal de la plante. En effet, les relations plante-eau sont affectées chez les jeunes plants de *Morus alba* soumises à un stress dû au zinc (Kumar Tewari *et al.*, 2008). L'application exogène de zinc a légèrement augmenté la teneur relative en eau et la succulence des feuilles chez *Morus alba*. Cependant, l'effet n'était pas significatif. En revanche, tandis que la carence en zinc diminuait le potentiel hydrique et la teneur spécifique en eau des jeunes plants, l'excès de zinc quant à lui, augmentait significativement le potentiel hydrique. Ainsi, par cette augmentation du potentiel hydrique, l'excès zinc inhibe l'absorption d'eau rendant les plantes stressées, flasques du fait de la perte de turgescence. Bonnet (2000) a également rapporté que plus les concentrations en zinc sont élevées plus la teneur en eau des feuilles de *Lolium perenne* diminuait par rapport au contrôle.

➤ Effet du zinc sur la photosynthèse et la respiration

A côté de son impact sur le statut hydrominéral de la plante, l'excès de zinc affecte également la nutrition carbonée et la respiration chez les plantes stressées. Ces perturbations peuvent soit résulter d'une action directe de l'excès de zinc sur la photosynthèse ou sur la respiration soit être une conséquence de l'altération de l'absorption du Fe. Souza *et al.* (2005) ont rapporté que l'excès de zinc chez le maïs affecte la taille, la forme et l'arrangement des

chloroplastes ainsi que l'organisation des thylakoïdes. En dehors de la structure du chloroplaste lui-même, le zinc peut affecter les pigments photosynthétiques. Les teneurs en chlorophylles (a et b) dans les feuilles sont négativement corrélées avec la teneur en zinc dans le milieu de culture et dans les feuilles et positivement corrélées avec la teneur en Fe (Rosen *et al.*, 1977). Les concentrations élevées de zinc inhibent la synthèse de ces chlorophylles (a et b) avec un effet plus drastique sur la synthèse de la chlorophylle b (Ebbs & Uchil, 2008). Cette inhibition peut s'expliquer par le fait que le zinc est impliqué dans la synthèse des chlorophylles, mais aussi que le zinc peut se substituer au Fe au niveau des sites particuliers chez des enzymes de biosynthèse de chlorophylles provoquant alors leur dysfonctionnement (Rosen, 1977 ; Candan & Tarhan, 2003). L'excès de zinc peut également affecter le transport des électrons photosynthétiques. En effet, dans les thylakoïdes d'épinard, l'excès de zinc peut affecter le transport de ces électrons en inhibant le donneur ou l'accepteur d'électrons du côté du photosystème II (De Magalhães *et al.*, 2004). L'impact de l'excès de zinc peut même aboutir à une suppression de la teneur en chlorophylles, causer la désorganisation des chloroplastes et réduire le nombre de thylakoïdes et de grana (Souza *et al.*, 2005 ; Wang *et al.*, 2009). Ces perturbations entraînent au niveau de la plante un déclin de l'efficience photosynthétique apparent et le taux maximal de photosynthèse (De Magalhaes *et al.*, 2004 ; Wang *et al.*, 2009). Au-delà de son effet délétère sur la photosynthèse, le zinc affecte également le bon fonctionnement des mitochondries. Stanković *et al.* (2010) ont rapporté que la respiration est l'un des processus physiologiques les plus sensibles à l'effet des métaux lourds. Ainsi, lorsque le zinc est présent en excès dans le cytoplasme et dans les mitochondries, il inhibe le cycle de Krebs mais aussi le transport des électrons dans le processus de phosphorylation oxydative. Cette inhibition du transport des électrons dans les mitochondries a été précédemment rapportée par Hampp & Schnabl (1975). Plus récemment, Lee, (2018) a rapporté que les concentrations élevées de zinc peuvent interrompre le cycle de Krebs et la production d'ATP mitochondrial à travers une diminution de la production de formes réduites NADPH.

III.1.3 Effet du zinc sur la senescence et l'apoptose cellulaire

Du fait de ses rôles indispensables dans les réactions biochimiques et physiologiques basiques, le zinc est un élément d'une importance essentielle pour les organismes vivants notamment pour les plantes (Stanković *et al.*, 2010). Cependant, le zinc n'est bénéfique aux plantes que dans une certaine gamme de concentrations adéquates avec l'individu qui lui est exposé. En effet, de nombreux dommages observés soit au niveau moléculaire, soit au niveau cellulaire ou soit au niveau physiologique sont attribués à l'excès de zinc chez la plante (Wang

et al., 2009). Ainsi, parmi les divers symptômes attribués à l'excès de zinc, il y a l'apparition d'organes sénescents. Chez les végétaux supérieurs la sénescence est l'étape de développement qui précède la mort des cellules, des tissus, des organes et des organismes (Combe & Escobar-Gutiérrez, 2009). Ils affirment que la sénescence débute par une désorganisation de l'ultrastructure des chloroplastes, ensuite une décoloration due à la dégradation des chlorophylles et d'autres pigments et pour finir par la déshydratation des feuilles. Ces processus bien que normaux dans la vie des plantes peuvent aussi être déclenché par l'excès de zinc pour la plante. Yadav, (2010) a rapporté que les niveaux élevés de zinc dans le sol inhibent plusieurs fonctions métaboliques de la plante entraînant une croissance retardée et causant aussi la sénescence chez la plante. Lorsque les mécanismes de défenses de la plante contre le stress métallique ne parviennent pas à lui permettre de garder son homéostasie, l'excès de zinc peut également conduire à la mort cellulaire. Selon Kösesakal & Ünal, (2012), les concentrations élevées de zinc deviennent un poison fort pour la plante et donc causant l'inhibition de sa croissance et de ses métabolismes et même la mort des organismes. D'après Chang *et al.* (2005), la mort cellulaire induite est un des symptômes de la toxicité du zinc. Chez le riz, ils ont rapporté que des doses de zinc comprises entre 5,0 et 25,0 mM induisent la mort cellulaire. Ils soutiennent également que cette mort cellulaire résulterait de l'action des espèces réactives d'oxygène produit sous l'effet de l'excès de zinc.

III.2 Mécanismes biochimiques des plantes en réponse au stress dû au Zinc

III.2.1 Synthèse de composés oxydants et d'antioxydants

III.2.1.1 La synthèse de composés oxydants : les ROS

La soumission des plantes à un stress métallique entraîne une augmentation excessive de la production des formes réactives d'oxygène (ROS) (Emamverdian *et al.*, 2015). Cette augmentation de la production de ROS conduit à un type de stress dit oxydatif. Il résulte d'un déséquilibre entre la balance des ROS et les systèmes de défense antioxydants (Austruy, 2012). Cette génération de ROS (Figure 3) constitue la première réponse de la plante lorsqu'elle est soumise à des niveaux élevés de métaux lourds (Yadav, 2010). Les ROS sont des molécules qui diminuent voire même empêchent l'oxydation d'autres substances chimiques. Elles sont produites principalement dans les chloroplastes, les mitochondries et les peroxysomes (Gill & Tuteja, 2010; Raja *et al.*, 2017). Les ROS regroupent à la fois des formes radiculaires telles l'anion superoxyde (O_2^-), le radical hydroxylé (OH^-) et des formes non radiculaires (formes moléculaires) telles l'oxygène singulet (O_2^*), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et les

hydroperoxydes (ROOH) (Koechlin-Ramonatxo, 2006; Emamverdian *et al.*, 2015). Selon Mittler, (2002), les ROS résultent typiquement de l'excitation du dioxygène (O_2) conduisant à la formation de l'oxygène singlet (O_2^*) ou du transfert d'un, de deux ou de trois électrons à l' O_2 pour former respectivement un anion superoxyde, un peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou un radical hydroxyle (OH^-). Ainsi, la production des ROS est un phénomène permanent et physiologique et donc constituent les sous-produits de processus physiologiques normaux tels la photosynthèse, la respiration mitochondriale (Koechlin-Ramonatxo, 2006; Gill & Tuteja, 2010). Le chloroplaste constitue le centre principal de production d'anion superoxyde (O_2^-), de l'oxygène singlet (O_2^*) et du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Les mitochondries sont impliquées principalement dans la production de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Les peroxysomes interviennent dans la production d'anion superoxydes (O_2^-) (Raja *et al.*, 2017). Malgré que la production de ces ROS soit la résultante de processus physiologique normale, leur surproduction est associée à divers facteurs environnementaux dont les métaux lourds induisant alors un stress oxydatif (Gill & Tuteja, 2010 ; Emamverdian *et al.*, 2015). Selon les propriétés physico-chimiques du métal, il peut favoriser soit directement la surproduction des ROS selon la réaction de Heber-Weiss et Fenton soit indirectement à travers des mécanismes multiples incluant la suppression et/ou l'inhibition d'antioxydants, la liaison aux groupes sulphydryle des protéines ou l'induction d'enzymes produisant les ROS comme le NADPH oxydase (Yadav, 2010; Hossain *et al.*, 2012; Emamverdian *et al.*, 2015). Ainsi, le zinc, un métal de transition sans activité redox, est impliqué dans l'induction de la production des ROS chez les plantes (Emamverdian *et al.*, 2015). En effet, Feigl *et al.* (2014) ont rapporté que le zinc peut causer le stress oxydatif en bloquant les groupements fonctionnels essentiels des biomolécules à cause de leur capacité à se lier fortement aux atomes d'oxygène, d'azote ou de soufre.

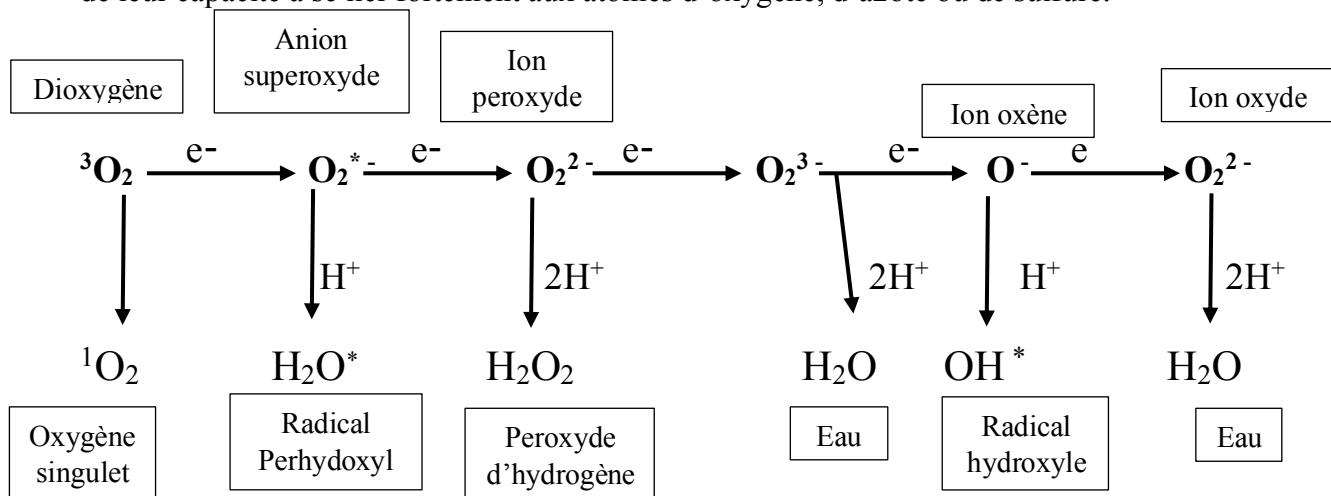


Figure 3 : Génération de différentes ROS par transfert d'énergie ou réduction monovalente séquentielle de l'oxygène triplet à l'état fondamental (Apel & Hirt, 2004)

III.2.1.2 Synthèse de composés antioxydants

Face à la surproduction des ROS, les cellules de la plante ainsi que ses organites tels que les chloroplastes, les mitochondries et les peroxysomes pour se protéger emploient des systèmes de défenses antioxydants (Gill & Tuteja, 2010 ; Raja *et al.*, 2017). Ce système de défense regroupe des antioxydants enzymatiques et des antioxydants non-enzymatiques. Les formes enzymatiques regroupent principalement les superoxydes dismutases (SOD), la catalase (CAT), l'ascorbate peroxydase (APX), monodéhydroascorbate réductase (MDHAR), déshydroascorbate réductase (DHAR) et le glutathion réductase (GR), tandis que les formes non-enzymatiques sont constituées par glutathion (GSH), acide ascorbique ou vitamine C (AsA), les caroténoïdes et les tocophérols (soluble dans les lipides) (Apel & Hirt, 2004; Gill & Tuteja, 2010). L'ensemble de ces composés antioxydants encore appelés nettoyeurs des ROS agit conjointement pour rétablir l'équilibre homéostatique dans les cellules de la plante. Néanmoins, le SOD avec ces trois types (Cu/Zn-SOD, Mn-SOD et Fe-SOD) constitue la première ligne de défense contre les ROS. Il permet la dismutation du superoxyde (O_2^-) en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (figure 4a). Il est présent chez tous les organismes aérobies et dans tous les compartiments de la cellule (Gill & Tuteja, 2010 ; Raja *et al.*, 2017). La CAT (figure 4b) intervient dans la dismutation du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en eau (H_2O) et en dioxygène (O_2). Il joue un rôle très important dans la détoxicification du peroxysome. L'APX aussi joue un rôle important dans la détoxicification de H_2O_2 (Figure 4c). Ces formes enzymatiques agissent en synergie avec des formes non-enzymatiques qui aussi jouent des rôles très importants dans la protection des cellules de la plante contre le stress oxydatif induit par les ROS. Parmi ces composés figure l'acide ascorbique (AsA) ou vitamine C. Il constitue l'antioxydant le plus abondant, le plus puissant et le plus soluble dans l'eau qui agit pour empêcher ou minimiser les dommages oxydatifs causés par les ROS. Il apparaît dans tous les tissus de la plante et est souvent plus élevé dans les cellules photosynthétiques et dans les méristèmes mais également dans certains fruits (Gill & Tuteja, 2010). Le glutathion (GSH), un métabolite crucial de la plante considéré comme l'un des plus importants défenseurs antioxydants intracellulaires de la plante contre les dommages oxydatifs induits par les ROS (Verbruggen *et al.*, 2009). C'est un antioxydant non-enzymatique. Il prend part dans le contrôle du niveau de H_2O_2 à travers le cycle AsA-GSH (Figure 4c). Il peut aussi réagir directement comme un nettoyeur de radicaux libres en réagissant avec O_2^* , O_2^- et OH^- (Hossain *et al.*, 2012).

Le GSH constitue le précurseur de protéines appelées phytochélatines (PCs) (Sinclair & Krämer, 2012).

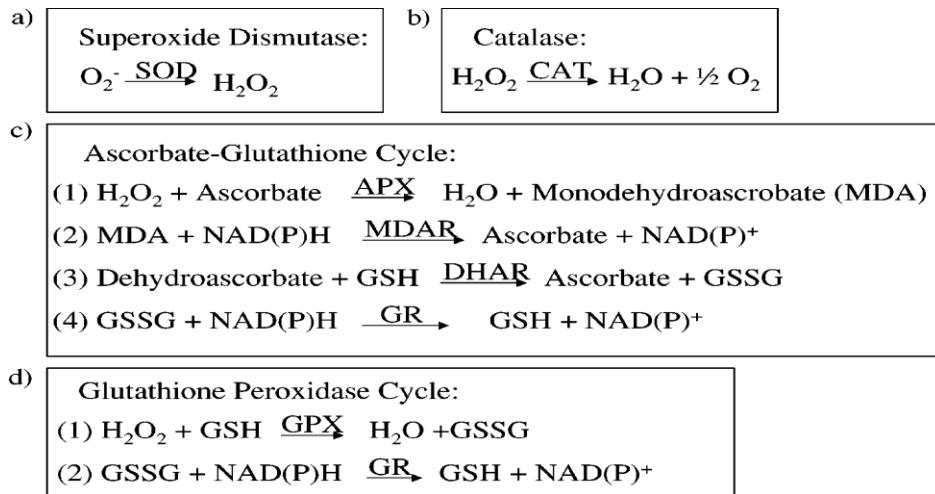


Figure 4 : Les principaux modes de nettoyage enzymatique des ROS par la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT), le cycle ascorbate-glutathion et le cycle glutathion-péroxydase (GPX) (Apel & Hirt, 2004).

III.2.2 Biomolécules impliquées dans l'hyper-accumulation des métaux lourds : cas du zinc

Pour faire face au stress métallique, différentes stratégies d'adaptation sont développées selon l'espèce de plante, son niveau de tolérance au métal, son stade de développement mais également selon le type de métal (Emamverdian *et al.*, 2015). La stratégie de tolérance la plus simplifiée développée par les plantes est l'évitement (Viehweger, 2014). Selon Hossain *et al.* (2012), il y a deux voies principales par lesquelles les plantes peuvent effectuer cette stratégie : la précipitation et la complexation. Contrairement à cette stratégie de restriction de l'absorption des métaux lourds, il existe d'autres approches développées par les plantes. Il s'agit entre autres de l'exclusion, de l'accumulation et de l'hyper-accumulation. Cette dernière est l'œuvre d'une classe très rare de plantes appelées « hyper-accumulateurs » combinant une tolérance extrêmement élevée et une accumulation foliaire des métaux lourds (Verbruggen *et al.*, 2009). Cette hyper-accumulation est possible grâce à la biosynthèse de diverses biomolécules qui interviennent soit au moment de l'absorption, de la translocation ou de la séquestration vacuolaire des métaux. Ces biomolécules incluent des protéines de faibles poids moléculaire, des acides organiques, des acides aminés et des peptides (Verbruggen *et al.*, 2009). Dans l'hyper-accumulation du zinc interviennent entre autres des métalloprotéines telles que les phytochélatines (PCs) et les métallothionines (MTs). En effet, les PCs (de formule générale (GluCys)_nGly, avec $2 \leq n \leq 11$) sont des protéines de faibles poids moléculaire synthétisées à

partir du glutathion (GSH) en présence de la phytochélatine synthétase (PCS) qui catalyse la réaction (Verbruggen *et al.*, 2008 ; Sinclair & Krämer, 2012). Elles représentent le deuxième groupe de chélateurs intracellulaires uniquement rencontrés dans le règne végétal. La biosynthèse des PCs est induite par de nombreux métaux lourds incluant Cd, Hg, Ag, Cu, Ni, Au, Pb, As, et Zn. Cependant, le Cd constitue son plus grand inducteur (Hossain *et al.*, 2012). Elles jouent un rôle important dans le maintien de l'homéostasie ionique et dans la détoxicification de l'excès de métaux dans la cellule en formant des complexes PC-métaux. Ces derniers sont par la suite séquestrés dans les vacuoles via des transporteurs de type ABC ce qui augmente la tolérance aux métaux (Viehweger, 2014). Contrairement aux PCs, les métallothinines résultent de la traduction de l'ARNm. Elles sont rencontrées dans une plus large gamme d'organismes vivants (Emamverdian *et al.*, 2015). La biosynthèse des MTs est régulée au niveau transcriptionnel et est induite par plusieurs facteurs dont les hormones, les agents cytotoxiques et les métaux lourds tels que Cd, Zn, Hg, Cu, Au, Ag, Co, Ni et Bi (Hossain *et al.*, 2012). Les MTs sont impliquées dans la détoxicification des métaux lourds en formant des complexes avec ces derniers qui seront par la suite séquestrés dans les vacuoles, entraînant un maintien de l'homéostasie des ions métalliques (Emamverdian *et al.*, 2015). D'autres biomolécules aussi jouent un rôle important dans la chélation et la détoxicification des métaux lourds. En effet, chez les espèces hyper-accumulatrices de Zn, *Noccaea caerulescens* et *Arabidopsis halleri*, les complexes Zn-citrate et Zn-malate sont les complexes ligands-métaux les plus abondants (Viehweger, 2014). La formation de ces complexes acide organique-métaux est favorisée par l'environnement acide de la vacuole. Ainsi, Verbruggen *et al.* (2009) rapporte que les acides organiques interviennent principalement dans la séquestration vacuolaire des métaux. Quant aux acides aminés en particulier l'histidine et la proline, de nombreuses études ont démontré leurs implications dans la tolérance voire hyper-accumulation des métaux chez les plantes. L'histidine est considérée comme l'acide aminé libre le plus important dans l'hyper-accumulation. Il est capable de former des complexes stables avec le Ni, Zn et Cd et est présent en concentrations élevées dans les racines des hyper-accumulateurs (Verbruggen *et al.*, 2009). Sinclair & Krämer, (2012) ont rapporté que l'histidine possède une haute affinité avec les métaux de transition. Ils ont démontré par les études de structures d'absorption des rayons X chez *N. caerulescens*, que le complexe Zn-histidine est le second complexe Zn-ligand le plus abondant. La proline aussi peut agir dans la chélation des métaux et dans la stabilisation des protéines (Emamverdian *et al.*, 2015). Ils ont rapporté que l'induction de l'accumulation de la proline est une conséquence du désordre hydrique résultant du stress métallique. Ainsi, la proline fonction comme un osmorégulateur ou osmoprotectant.

I. Matériel

I.1 Matériel végétal

Le matériel végétal est constitué de graines de *Hirschfeldia incana*. Ces graines ont été récoltées au mois de mai 2018 dans un site minier abandonné de « Kettara » situé à environ 30 km Nord-nord-Ouest de la ville de Marrakech au Maroc (Meriem Lghoul *et al.*, 2012). Les graines sont conservées à température ambiante dans le laboratoire de physiologie et de biotechnologies végétales (LPBV) de la faculté des sciences de l'université Mohamed V agdal de Rabat. Les graines peuvent être conservées dans ces conditions pendant deux (02) ans avant qu'elles ne perdent leur pouvoir germinatif. Le choix de cette espèce pour cette étude repose d'une part, sur sa proximité génétique à l'espèce modèle *Arabidopsis thaliana* (Brassicacées), ce qui facilite sa culture mais surtout son étude du point de vue génétique et, d'autre part, sur sa diversité intraspécifique : population métallique et population non métallique

II. Méthodes

II.1 Culture *in vitro*

II.1.1 Désinfection des graines

Des graines de *H. incana* sont mises dans un tube Eppendorf en présence d'eau distillée stérile et d'eau de Javel 30% (v/v). Le mélange est secoué rigoureusement pendant 30 secondes afin que toutes les graines baignent dans la solution. Il est laissé à la température ambiante sur la paillasse sous la hotte à flux laminaire pendant 10 min tout en veillant à le retourner régulièrement. Le mélange est ensuite centrifugé pendant 10 secondes entre 500 et 600 rpm afin de séparer les graines de la phase aqueuse. La phase aqueuse est éliminée en même temps que les débris et les graines immatures qu'elle contient. En guise de rinçage, de l'eau distillée stérile est ajoutée aux graines dans le tube, puis le mélange est centrifugé à nouveau afin d'éliminer l'eau et les surnageants. Cette opération de rinçage est répétée à trois reprises. Les graines ainsi désinfectées, sont conservées à – 4°C pendant 48 heures pour lever la dormance tégumentaire.

II.1.2 Mise en culture des graines

Les graines de *H. incana* préalablement désinfectées sont déposées linéairement dans des boîtes de Petri contenant le milieu Murashige et Skooge (1962) avec un pH ajusté à 5,8 et solidifié par 8 g/l d'agar. Les boîtes de Petri contenant les graines sont incubées dans un phytotron à une température de 25°C avec une intensité lumineuse de 6500 Lux et une

photopériode de 16 heures de lumière et 8 heures d'obscurité. Dans le phytotron, les boîtes de Petri sont placées de sorte que les graines soient disposées horizontalement afin de favoriser l'elongation des racines (Planche 4).



Planche 2 : Jeunes plants de *H. incana* germés dans des boîtes de Petri

II.2 Culture en hydroponie

Les jeunes plants de *H. incana* âgés de 10 jours ont été transférées des boîtes de Petri vers des pots de culture contenant une solution nutritive BD (Annexe 4) (Broughton et Dilworth, 1971) (Planche 6). Chaque pot possède six (06) trous et dans chaque trou, sont placées deux jeunes plants. Les pots sont ensuite mis dans la chambre de culture avec une température de 25°C et une photopériode de 16 heures de lumière et de 8 heures d'obscurité. Pour maintenir l'humidité relativement haute, les pots sont entourés de film alimentaire (Planche 6A) pendant trois (03) jours avant que ce dernier soit progressivement enlevé (Planche 6B). Les jeunes plants sont maintenus sur ce milieu BD pendant 15 jours. Cependant, au bout de chaque semaine, le milieu est renouvelé.



Planche 3 : Culture des jeunes plants de *H. incana* en hydroponie dans la chambre de culture

A : Pots avec film alimentaire ; B : Pots sans film alimentaire

II.3 Mesure des paramètres de croissance et caractérisation biochimique

L'effet de l'excès de zinc sur les paramètres de développement (longueur et poids frais de la biomasse aérienne et racinaire) et physiologiques (teneur en chlorophylle a, b et totale, en proline et en anthocyanine) a été mesuré. A cet effet, après une période d'acclimatation de deux (02) semaines en culture hydroponique, les jeunes plants sont soumis à différents niveaux de traitement. Trois niveaux de traitement au zinc ($0 \mu\text{M}$, $300 \mu\text{M}$ et $500 \mu\text{M}$) sont ajoutés à la solution nutritive BD. Pour chaque concentration, une série de trois pots contenant chacun trois (03) jeunes plants ont été utilisés. Les jeunes plants sont maintenus sous traitement pendant 15 jours avant d'être récoltées pour les différentes analyses. Le milieu est renouvelé au bout d'une semaine et pour chaque série de pots, la même concentration de zinc est ajoutée comme précédemment.

II.3.1 Récolte et conditionnement des jeunes plants

Après deux semaines de culture sur le milieu BD avec les différentes concentrations de zinc apportées, les jeunes plants sont toutes récoltées. Les jeunes plants de chaque niveau de traitement sont regroupés et puis subdivisées en trois lots afin d'obtenir trois répétitions. Après la mesure des paramètres de développement, les parties racinaires de chaque jeune plant sont éliminées. Ainsi, la biomasse aérienne de chaque répétition est mise dans un flacon bien numéroté puis plongé dans de l'azote liquide. Après environ trois minutes, le contenu de chaque flacon est récupéré puis broyé dans un mortier en présence d'azote liquide. Le broyat réparti

dans des tubes bien numéroté est conservé à -20°C jusqu'à son utilisation pour le dosage des taux de chlorophylles (a et b), de proline et d'anthocyanes.

II.3.2 Mesure des paramètres de développement

Il s'agit ici de mesurer d'abord la longueur des parties aériennes et racinaires de chaque jeune plant et ensuite de peser les poids frais de ces deux parties. Ainsi, à l'aide d'un logiciel spécifique (ImageJ), la longueur des parties aériennes et racinaires de chaque jeune plant est mesurée. Elles sont ensuite séparées et puis pesées à l'aide d'une balance de précision.

II.3.3 Caractérisation biochimique

II.3.3.1 Dosage des chlorophylles a et b

Pour chaque concentration, environ 100 mg de broyat sont pesés puis mis dans un tube Eppendorf. Le broyat est ensuite homogénéisé en présence de 1 mL d'acétone à 80%. Le mélange obtenu est centrifugé pendant 1 min à 10 000 rpm pour permettre la récupération de la phase aqueuse. La lecture est faite à l'aide d'un spectrophotomètre à deux longueurs d'onde (645 nm et 663 nm) après étalonnage de l'appareil avec la solution témoin d'acétone à 80 %. Le taux de chlorophylles a et b sont calculés à l'aide de l'équation suivante (Bassa *et al.*, 2012) :

$$\text{Chl a} = 0.999A663 - 0.0989A645 \quad \text{Chl b} = -0.328A663 + 1.77A645$$

II.3.3.2 Dosage de la proline

La méthode décrite par Bates *et al.* (1973) est utilisée pour doser la teneur en proline de chaque échantillon. D'abord, 100 mg de broyat de chaque échantillon sont pesés puis homogénéisés dans 2 ml d'acide sulfosalicylique 3 %. Après agitation du mélange au vortex, il est centrifugé à 10000 rpm pendant 5 minutes et à température ambiante. Ensuite, le surnageant obtenu est recueilli dans un tube à essai auquel est ajoutés 2 ml d'acide acétique glacial et 2 ml de réactif à la nynhidrine (1,25 g de Ninhydrine ; 30 ml d'acide acétique ; 20 ml de H₃PO₄). Ce mélange est porté à ébullition pendant 1 heure au bain-marie à 90°C ; une coloration rose apparaît. Après refroidissement des tubes, le mélange est extrait en ajoutant 2 ml de toluène et en mélangeant pendant 15 à 20 secondes. En fin, la phase toluénique est prélevée et son absorbance est lue à λ= 520 nm en utilisant le toluène comme blanc. La concentration en proline exprimée en mg par mg de matière fraîche est calculée selon la formule suivante :

$$Q \text{ proline mg/g de MF} = A * V / M * K$$

A : absorbance ; V : volume du filtrat en mL; K : pente de la gamme étalon

La valeur de la pente de la gamme étalon (k) est calculée à partir de la courbe standard (Figure 5) de proline tracée à partir de concentrations connues de proline comprises entre 50 et 250 (nM).

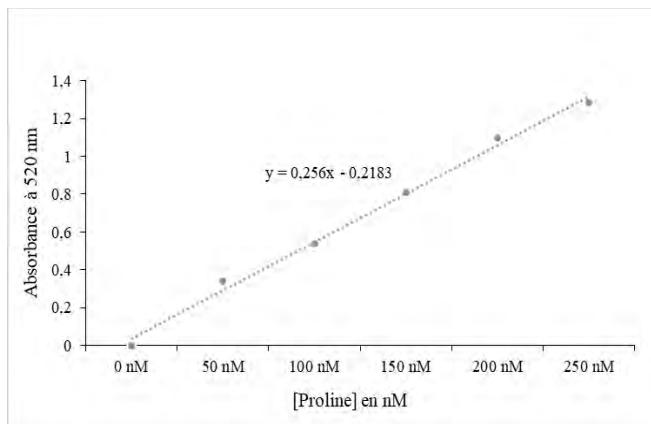


Figure 5 : Courbe de calibration standard de la proline construite à partir de concentration connue

II.3.3.3 Dosage des anthocyanes

Pour doser les anthocyanes, 10 à 15 mg du broyat de chaque niveau de traitement au zinc sont pesés et mis dans un tube Eppendorf. Le broyat est ensuite homogénéisé dans la solution d'extraction (contenant : 18% de propanol, 1% HCL, 81% H₂O). Les échantillons sont ensuite incubés 3 min à 90°C puis centrifugés à 10 000 rpm pendant 2 min. Le surnageant est ainsi récupéré dans un nouveau tube. Le taux d'anthocyanes est déterminé par spectrophotométrie. L'absorbance du surnageant est mesurée à $\lambda= 535$ et à 650 nm, en prenant la solution d'extraction comme blanc. La teneur en anthocyanes exprimée en absorbance par mg de matière fraîche est donnée par l'équation suivante (Fahr *et al.*, 2015).

$$T\text{-Ant (A/mg)} = A_{535} - A_{650} \quad)$$

T= teneur ; Ant = Anthocyanes ; A = Absorbance

II.4 Analyses statistiques

Les données collectées sont analysées à l'aide du logiciel R version 3.5.1 (2018-07-02). D'abord une analyse de la variance (ANOVA) à un facteur a été effectuée. Avant de lancer l'ANOVA, le test de Shapiro-Wilk (1965) a été appliqué pour vérifier si les données suivent une distribution normale suivi du test de Bartlett pour vérifier l'égalité des variances. Lorsque l'effet du facteur étudié est significatif, le test de comparaison multiple de Tukey a été réalisé

pour comparer les moyennes. Le logiciel SPSS version 23 a été utilisée pour l'étude de la corrélation entre les différentes variables.

I. Résultats

I.1 Effets du zinc sur les paramètres de développement de la plante

Le tableau 1 illustre l'effet variable des différents traitements de zinc apportés sur la longueur (Photo 7) et le poids frais des parties aériennes et racinaires. Nous observons que pour la longueur des parties aériennes et racinaires, l'effet du traitement au zinc est très hautement significatif. Pour le poids frais, nous constatons que l'effet délétère de l'excès de zinc est plus significatif sur le poids frais de la biomasse aérienne que pour le poids frais de la biomasse racinaire. Pour chacun des paramètres mesurés, l'effet d'au moins un traitement diffère de celui des autres.

Tableau 1 : Effets des trois traitements de zinc sur les paramètres de croissance mesurés

Sources de variabilité	DI	LPA	LPR	PBA	PBR
Traitements	2	16,35***	318,2***	0,4358 **	0,018578 *
Résidus	13	0,29	5,7	0,0317	0,002387

Traitements= différentes concentrations de zinc (0 µM ; 300 µM et 500 µM) ; DI= Degré de liberté ; LPA= Longueur de la partie racinaire ; LPR= Longueur de la partie aérienne ; PBA= Poids de la biomasse aérienne ; PBR= Poids de la biomasse racinaire



Photo 3 : Aspect des jeunes plants de *H. incana* soumises à différentes concentrations de zinc

A : Jeunes plants non traités (témoins) ; B : Jeunes plants soumises à 300 µM de zinc et C : Jeunes plants soumis à 500 µM de zinc

I.2 Effets du zinc sur les paramètres biochimiques de la plante

Le tableau 2 nous présente l'effet des différents traitements de zinc apportés sur les paramètres biochimiques étudiés. Nous observons que les différents traitements de zinc appliqués n'ont aucun effet significatif sur la teneur en Chl-a et en anthocyanes des jeunes plants traités. En revanche, pour la teneur en Chl-b et en proline, les traitements de zinc entraînent des effets significatifs. Les traitements de zinc apportés n'affectent pas la teneur en Chl-a et anthocyanes, tandis que les teneurs en chlorophylle b et en proline sont significativement affectées au moins par un des trois niveaux de traitements (0µM, 100µM et 300µM).

Tableau 2 : Effet des trois traitements de zinc sur les paramètres biochimiques mesurés

Sources de variabilité	Dl	Chl-a	Chl-b	Proline	Anthocyanes
Traitements	2	1,174e-06 ns	1,501e-05 *	1,167e-05 **	8,533e-07 ns
Résidus	6	1,026e-06	2,566e-06	5,620e-07	4,189e-07

Traitements= différentes concentrations de zinc (0 µM ; 300 µM et 500 µM) ; Dl= Degré de liberté ; Chl-a= Chlorophylle a ; Chl-b= Chlorophylle b

I.3 Effet du zinc sur la longueur et le poids frais des parties aériennes et racinaires de la plante

I.3.1 Effet du zinc sur la longueur des parties aériennes et racinaires

La figure 6 illustre l'effet du zinc sur la longueur des parties aériennes (A) et racinaires (B) de la plante. Nous constatons qu'aussi bien pour la partie aérienne (Figure 6A) que pour la partie racinaire (Figure 6B), il existe une diminution significative de la longueur chez les jeunes plants traités avec 300 µM et 500 µM de zinc par rapport à celle des jeunes plants non traitées (0 µM de Zn). Cette réduction de la longueur est au moins de l'ordre 53,11% et 47,68% respectivement pour la partie aérienne et racinaire des jeunes plants traités par rapport à celles non traitées. Cependant, entre les jeunes plants traités avec 300 µM et 500 µM de Zn, aucune différence significative n'est observée. L'excès de zinc inhibe l'élongation des parties aériennes et racinaires des plantes. L'effet ainsi observé peut être qualifié d'effet métal car ne dépendant que de la présence du métal mais pas de la dose apportée.

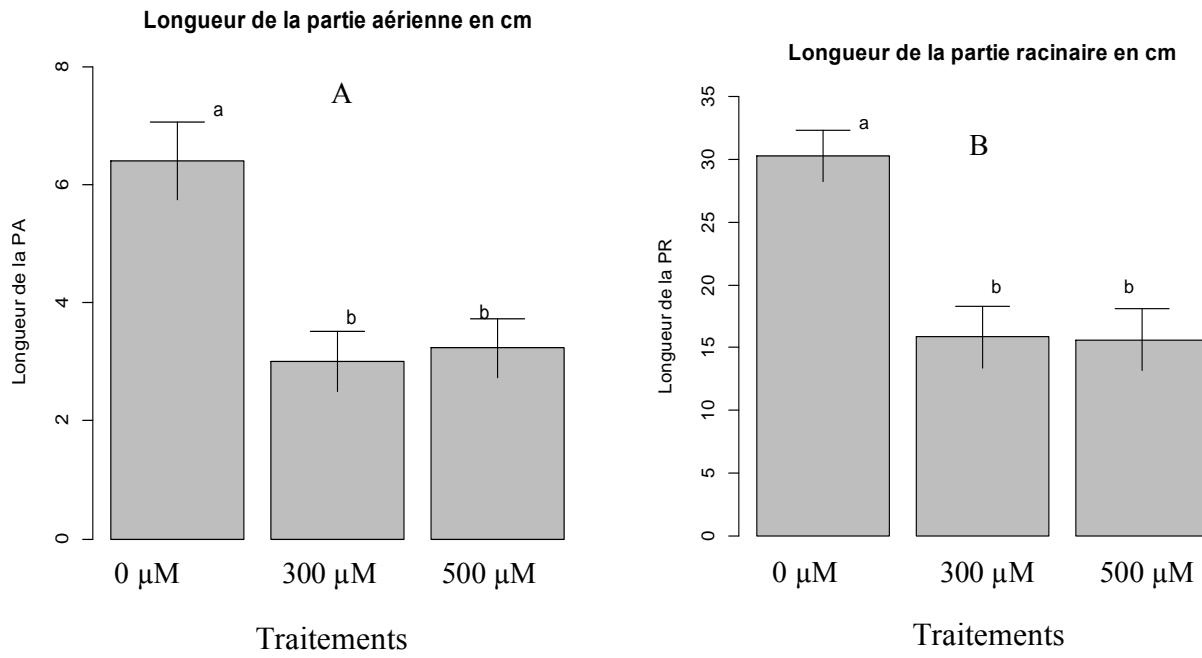


Figure 6 : Longueur (en cm) de la partie aérienne (A) et racinaire (B) de *H. incana* cultivée en hydroponie pendant 15 jours en présence de différents niveaux de traitement au zinc

Les différentes lettres (a et b) indiquent qu'il y a une différence significative ($p < 0.05$).

I.3.2 Effet du zinc sur le poids frais de la biomasse aérienne et racinaire

La figure 7 représente l'effet du zinc sur le poids frais de la biomasse aérienne et racinaire. Nous observons que le poids frais de la biomasse aérienne (Figure 7A) et racinaire (Figure 7B) diminue significativement chez les jeunes plants traités respectivement avec 300 μM et 500 μM de zinc comparé à celui des jeunes plants non traitées (0 μM de zinc). La diminution du poids frais est beaucoup plus marquée au niveau de la biomasse racinaire avec une réduction d'au moins 69% chez les jeunes plants traitées (300 μM et 500 μM de zinc) par rapport aux jeunes plants non traitées (0 μM de zinc), tandis que pour le poids de la biomasse aérienne la réduction est d'au moins de 55.7%. Cependant aucune différence significative n'est notée entre les jeunes plants traités malgré la différence de concentrations des traitements reçus. L'apport de concentrations élevées de zinc entraîne une diminution du poids frais de la biomasse aérienne et racinaire chez *H. incana*. L'effet observé peut être qualifié d'effet métal car il est observé avec l'apport du métal et ne varie pas en fonction de la dose apportée.

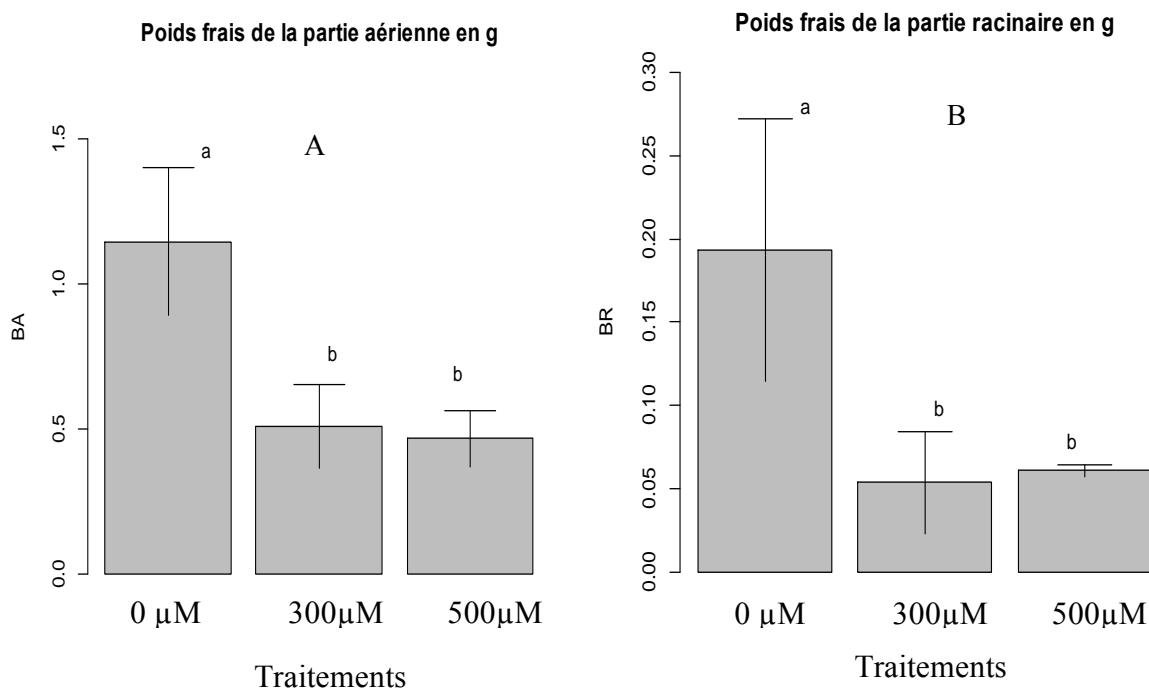


Figure 7 : Poids frais (en g) de la biomasse aérienne (A) et racinaire des jeunes plants de *H. incana* cultivées en hydroponie pendant 15 jours en présence de différents niveaux de traitement au zinc

Les différentes lettres (a et b) indiquent qu'il y a une différence significative ($p < 0.05$) ; BA : Biomasse aérienne ; Biomasse racinaire

I.4 Effet du zinc sur la teneur en chlorophylle a (A) et b (B)

La figure 8 traduit l'effet du Zn sur la teneur en chlorophylle a et b chez des jeunes plants de *H. incana*. Sur cette figure, nous constatons que le traitement avec 300 μM et 500 μM de Zn n'affecte pas significativement la teneur en chlorophylle a (Figure 8A) de *H. incana*. En revanche, ces mêmes traitements entraînent une réduction de la teneur en chlorophylle b (Figure 8B) d'environ de 17% par rapport aux non traitées. Cette diminution de la teneur en chlorophylle b observée, est significative à p -Value $> 0,5$, chez jeunes palnts traités avec 500 μM de zinc comparés au témoins. La chlorophylle b est donc plus sensible aux effets de l'excès du zinc que la chlorophylle a.

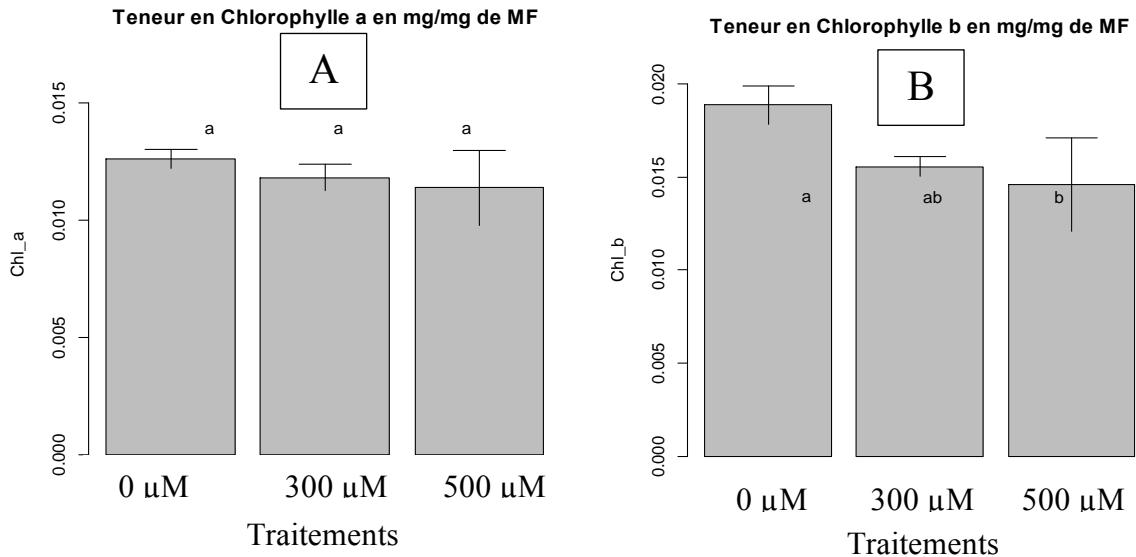


Figure 8 : Teneur en chlorophylles a (A) et b (B) (mg/mg de matière fraîche) des feuilles de jeunes plants de *H. incana* cultivée en hydroponie pendant 15 jours en présence de différents niveaux de traitements au zinc

Les différentes lettres (a et b) indiquent qu'il y a une différence significative ($p < 0.05$)

Chl-a= Chlorophylle a ; Chl-b= Chlorophylle b et Chl-totale= Chlorophylle totale

I.5 Effet du zinc sur la teneur en proline

La figure 9 représente l'effet du zinc sur la teneur en proline des jeunes plants de *H. incana* cultivées pendant 15 jours dans un milieu BD supplémenté avec différentes concentrations de zinc (0 μ M, 300 μ M et 500 μ M). Nous constatons que le traitement des jeunes plants avec 300 μ M et 500 μ M de Zn entraîne une augmentation significative de leur teneur en proline par rapport aux témoins (0 μ M de zinc). La teneur en proline chez les jeunes plants traités avec le zinc (300 μ M et 500 μ M) augmente d'au moins 70,83% par rapport à celle des jeunes plants non traités (0 μ M). Cependant, aucune différence significative ne s'observe entre les jeunes plants traités avec 300 μ M et 500 μ M de zinc. Le traitement des jeunes plants de *H. incana* par des concentrations de 300 μ M et 500 μ M de zinc entraîne une augmentation significative de la teneur en proline.

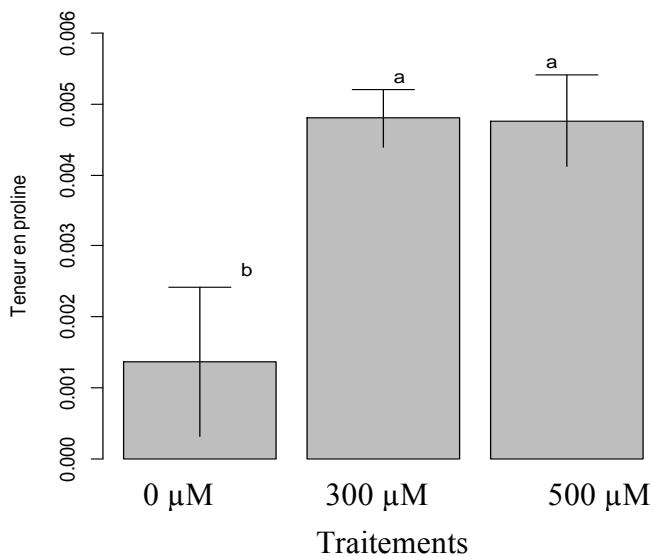


Figure 9 : Teneur en proline des jeunes plants de *H. incana* cultivée en hydroponie pendant 15 jours en présence de différents niveaux de traitements au zinc

Les différentes lettres (a et b) indiquent qu'il y a une différence significative ($p<0.05$)

I.6 Effet du zinc sur la teneur en anthocyanes

La figure 10 représente les résultats du dosage des anthocyanes chez les jeunes plants de *H. incana* cultivées pendant 15 jours sur un milieu BD supplémenté avec des concentrations de zinc (0 μM , 300 μM et 500 μM). Nous observons que le traitement des jeunes plants de *H. incana* pendant 15 jours en présence de 300 μM et de 500 μM n'entraîne aucune différence significative ($p<0,05$) de la teneur en anthocyanes par rapport aux jeunes plants non traitées (0 μM de zinc). Les concentrations de 300 μM et 500 μM de zinc sont insuffisantes pour induire un effet significatif par rapport aux témoins (0 μM). Par conséquent, comme les anthocyanes sont des indicateurs de stress donc l'absence d'effet significatif après traitement des jeunes plants implique qu'elles sont tolérantes à ces concentrations apportées.

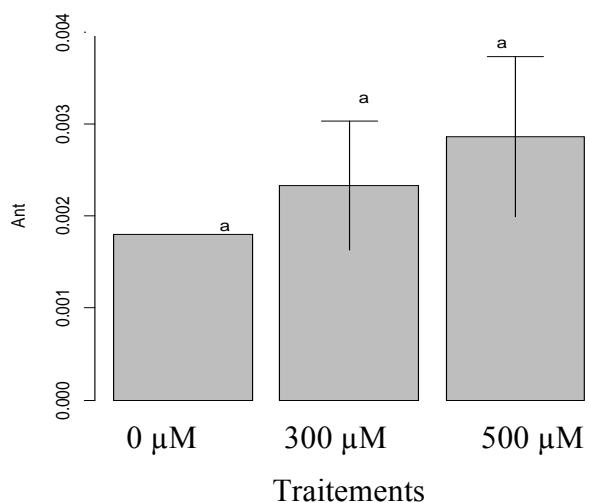


Figure 10 : Teneur en anthocyane (Absorbance/mg de matières fraîches) des jeunes plants de *H. incana* cultivée en hydroponie pendant 15 jours en présence de différents niveaux de traitements au zinc.

Les différentes lettres (a et b) indiquent qu'il y a une différence significative ($p<0.05$) ; Ant = Anthocyane

I.7 Relations entre les différentes variables

Le tableau 3 illustre les relations entre les différentes variables mesurées chez les jeunes plants de *H. incana* cultivées en hydroponie pendant 15 jours en présence de différentes concentrations de zinc (0 μM , 300 μM et 500 μM). Nous observons que les couples de variables LPA/LPR, LPA/BA, LPR/BA et LPR/BR sont tous corrélés positivement au moins au seuil α égal à 0,05. En revanche, les couples de variables Pro/LPA, Pro/LPR, Pro/BA et Pro/BR présentent une corrélation négative au moins à α égal à 0,05.

Tableau 3 : Relation entre les différentes variables mesurées

Variables	Chl_a	Chl_b	Pro	Ant	LPA	LPR	BA	BR
Chl_a	1							
Chl_b	0,994	1						
Pro	-0,945	-0,975	1					
Ant	-0,971	-0,939	0,839	1				
LPA	0,963	0,987	-0,998*	-0,87	1			
LPR	0,95	0,978	-1,000**	-0,846	0,999*	1		
BA	0,961	0,986	-0,999*	-0,867	1,000**	0,999*	1	
BR	0,929	0,964	-0,999*	-0,814	0,995	0,998*	0,995	1

Chl-a = Chlorophylle a ; Chl-b = Chlorophylle b ; Pro = Proline ; LPA= Longueur de la partie aérienne ; LPB= Longueur de la partie racinaire ; BA= Biomasse aérienne et BR= Biomasse racinaire ; * = Significatif à p-Value =0,05 ; ** = très significatif à p-Value = 0,01

II. Discussion

Les résultats de cette étude montrent que le traitement des jeunes plants de *H. incana* pendant 15 jours avec 300 µM et 500 µM de zinc entraîne une réduction significative de la longueur et du poids frais des parties aériennes et racinaires par rapport au contrôle (0 µM de zinc) avec un effet plus marqué au niveau des racines. Ces réductions observées pourraient être causées par la perturbation de la multiplication cellulaire et du métabolisme cellulaire induite par l'excès de zinc. De nombreuses études ont rapporté l'effet inhibiteur des métaux lourds en particulier celui des métaux non-essentiels sur la croissance des plantes. Cependant, du fait du caractère essentiel du zinc pour le développement des plantes, la majorité des études réalisées sur les effets de la nutrition en zinc concernent les effets de la carence en cet élément (Muschitz, 2009). Néanmoins, il existe des études qui confirment ou infirment les résultats de cette étude. En effet, les études réalisées par Prasad *et al.* (1999) sur une Brassicacée, *Brassica juncea*, soutiennent l'effet délétère de l'excès de zinc sur la croissance et le développement des plantes. Liu *et al.* (2014), ont rapporté que le traitement des jeunes plants de *Phyllostachys pubescens* en hydroponie pendant 30 jours avec des concentrations de zinc supérieures ou égales à 200 µM entraîne une réduction du poids sec d'au moins de 36,25% par rapport au contrôle. En outre, Singh *et al.* (2014), à travers l'évaluation de la capacité phytoextractante du zinc de *Vigna unguiculata* ont rapporté que l'excès de zinc ($\geq 250 \mu\text{M}$) entraîne une réduction considérable de longueur et du poids total de la plante. Les travaux récents de Feigl *et al.* (2016) sur *Brassica juncea* et *Brassica napus* ont également démontré les effets délétères de l'excès de zinc sur le développement des jeunes plants. En effet, ils ont rapporté une diminution très significative du poids frais et sec de la biomasse chez les jeunes plants traités avec des concentrations de zinc supérieures ou égales à 50 µM comparé au contrôle. Cependant, le seuil de tolérance au zinc varie considérablement en fonction de l'espèce. En effet, chez *Noccea caerulescens*, une espèce hyper-accumulatrice du zinc, le traitement avec des concentrations de zinc comprises entre 100 et 200 µM entraînait une croissance plus élevée par rapport au témoin. La réduction du poids sec des racines par rapport au témoin n'était significative que lorsque les jeunes plants étaient traitées avec des concentrations de zinc supérieures ou égales à 800 µM (Kozhevnikova *et al.*, 2017).

La photosynthèse est un processus complexe qui peut être affecté par différents facteurs environnementaux notamment par la présence d'éléments traces métalliques (Fahr, 2014). La teneur en chlorophylle est un indicateur commun de la photosynthèse qui reflète directement le

statut de croissance de la plante (Peng *et al.*, 2015). Ainsi, pour évaluer l'état physiologique des jeunes plants après traitement avec différentes concentrations de zinc, la teneur en chlorophylle a et b a été quantifiée. Les résultats montrent que la teneur en Chlorophylle a chez les jeunes plants traités avec 300 µM et 500 µM de zinc est similaire à celui du non traitées (0 µM). En revanche, une diminution significative de la teneur en chlorophylle b a été enregistrée chez les jeunes plants traités avec 500 µM de zinc par rapport à ceux non traités (0 µM). Cet effet du zinc, uniquement observé chez la teneur en chlorophylle b, pourrait s'expliquer, d'une part, par le fait que cette dernière est le plus sensible au effet du zinc. D'autre part, par le fait que 500 µM de zinc constitue une concentration à laquelle est sensible *H. incana*, d'où l'apparition de feuilles nécrosées. Contrairement à ces résultats, de nombreuses études rapportent une diminution de la teneur en chlorophylle en fonction de l'augmentation de la concentration du zinc. En effet, Cherif *et al.* (2010), ont rapporté que le traitement des jeunes plants de tomate avec des concentrations de zinc supérieures ou égales à 50 µM entraînait une diminution significative de la teneur en chlorophylle a et b par rapport au contrôle. Ils ont observé que le traitement des jeunes plants avec 150 µM de zinc pendant 7 jours entraînait une réduction de la teneur en chlorophylle a et b de 47,29 % et 29,32 % respectivement comparé aux témoins. Ces constats sont soutenus par Park *et al.* (2012) suite à leurs travaux sur deux écotypes d'*Arabidopsis thaliana* (Columbia-0 et Wassilewskija) où ils ont observé une réduction significative des teneurs en chlorophylle a et b chez les jeunes plants traités avec 250 µM de zinc comparé au contrôle. Le traitement des jeunes plants de *Phyllostachys pubescens* avec des concentrations de zinc supérieures à 400 mg.kg⁻¹ entraîne une réduction de la teneur en chlorophylle a et b de 68,88 % et 72 % respectivement par rapport au contrôle (Peng *et al.*, 2015).

Les anthocyanes sont des pigments hydrosolubles rencontrés dans tous les tissus végétaux (Chalker-Scott, 1999). Elles sont connues pour être synthétisées en réponse à différents stress environnementaux (Fahr, 2014). Pour évaluer l'état de stress des jeunes plants de *H. incana* cultivés en présence de différentes concentrations de zinc pendant 15 jours, leur teneur en anthocyanes ont été dosée. Aucune variation significative de la teneur en anthocyanes n'est observée entre les jeunes plants traités avec 300 µM et 500 µM de zinc ceux non traités (0 µM). Comme les anthocyanes sont produites en réponse aux stress métalliques ((Baek *et al.*, 2012) alors ces résultats seraient dus à l'insuffisance de ces concentrations de zinc utilisées à provoquer un état de stress chez *H. incana*. Ces résultats sont infirmés par de nombreuses études démontrant une augmentation significative de l'accumulation des anthocyanes en fonction de

l'augmentation de la concentration de zinc. En effet, les travaux effectués par Baek *et al.* (2012) ont montré une augmentation significative de l'accumulation des anthocyanes dans les feuilles d'*Arabidopsis thaliana* cultivés en présence de zinc. Des résultats similaires ont aussi été observés chez des jeunes plants de tomate cultivés en présence de concentrations croissantes de zinc où la teneur en anthocyanes augmentait graduellement en fonction de la concentration de zinc (Kösesakal & Ünal, 2012). Néanmoins, il existe des résultats concordant avec les résultats de cette étude. En effet, les études réalisées par Pongrac *et al.* (2009) sur deux espèces de *Thlaspi* (*Thlaspi caerulescens* et *T. praecox*) n'ont montré aucune augmentation significative de la teneur en anthocyanes malgré l'augmentation de la concentration de zinc jusqu'à 500 mg.kg⁻¹. Des observations pareilles ont été faites chez Wassilewskija, un écotype d'*Arabidopsis thaliana*. En effet, Park *et al.*, (2012) n'ont observé aucune augmentation significative de la teneur en anthocyanes chez les jeunes plants traités avec 500 µM de zinc comparé à ceux non traités (0 µM).

La proline est un acide aminé qui agit comme un osmolyte métabolique et compatible (Emamverdian *et al.*, 2015). Elle joue un rôle significatif dans l'ajustement osmotique et dans la protection de la structure cellulaire chez des plantes soumises à différents stress dont le stress métalliques (Singh *et al.*, 2014). Dans cette étude, la teneur en proline des jeunes plants traités ou non avec du zinc a été estimée. Les résultats ont alors montré une augmentation significative de l'accumulation de la proline en fonction de la concentration de zinc dans la solution nutritive. Cette augmentation de l'accumulation de la proline serait probablement due à la perturbation du statut hydrique des jeunes plants induite par l'excès de zinc. L'augmentation de l'accumulation de la proline en fonction du stress métallique notamment, le stress induit par le zinc a été rapportée par de nombreuses études. En effet, la culture en hydroponie de *vigna unguiculata* a montré une augmentation significative de l'accumulation de la proline en fonction de la concentration de zinc mais aussi en fonction de la durée du stress (Singh *et al.*, 2014). Ce constat est soutenu par d'autres travaux dont ceux réalisés par Dai *et al.* (2015). Ils ont rapporté une augmentation significative de l'accumulation de la proline aussi bien dans les feuilles, la tige et les racines des jeunes plants de quatre cultivars d'Alfalfa (*Medicago sativa*) soumis à différentes concentrations de zinc.

Conclusion et perspectives

Cette étude a porté sur la caractérisation physiologique et biochimique de la tolérance au stress dû au zinc chez des jeunes plants de *H. incana* cultivés en hydroponie. Elle a permis d'évaluer l'effet de l'excès de zinc sur le développement et la croissance. En effet, elle a permis de voir que l'excès de zinc inhibe l'elongation racinaire et caulinaire. Elle a également permis de voir que l'excès de zinc entraînait une diminution du poids frais des parties aériennes et racinaires. En outre, l'étude a permis d'illustrer certains mécanismes biochimiques de tolérance à l'excès de zinc chez les jeunes plants de *H. incana*. En effet, elle a montré que l'excès de zinc n'influence pas la teneur en chlorophylle a, ainsi que la teneur en anthocyanes qui est indicateur de l'état de stress de la plante. En revanche, elle a rapporté que la teneur en proline augmentait graduellement en fonction de la concentration de zinc dans la solution nutritive. Compte tenu des divers rôles de la proline dans la réponse au stress métallique, alors, il est évident que la tolérance au zinc observée chez *H. incana* soit en partie due à cette accumulation de la proline. Ces résultats biochimiques indiquent que malgré la diminution de la croissance aérienne et racinaire, *H. incana* est capable de tolérer des concentrations élevées de zinc. Par conséquent, elle constitue une bonne candidate pour la phytorémédiation des sols pollués par le zinc.

Ainsi, en vue d'une caractérisation physiologique et moléculaire plus exhaustive des mécanismes de tolérance voir d'hyper-accumulation du zinc, il serait important de faire d'autres études supplémentaires à savoir :

- Evaluer l'effet de concentrations plus élevées de zinc sur la croissance et le développement de *H. incana* ;
- Déterminer la teneur en sucres solubles, en acides aminés libres, en acides organiques chez les jeunes plants de *H. incana* traitées avec un excès de zinc ;
- Evaluer l'activité des antioxydants enzymatiques et non enzymatiques chez les jeunes plants soumis au stress dû au zinc ;
- Identifier les gènes impliqués dans l'absorption racinaire, la translocation et la séquestration vacuolaire du zinc et leur rôle exact dans ce processus.

Références bibliographiques

- Al-Shehbaz I.A., Beilstein M.A., Kellogg E.A. (2006) – Systematics and phylogeny of the Brassicaceae (Cruciferae): an overview. *Plant Systematics and Evolution*, **259**, 89–120.
- Ambler J.E., Brown J.C., Gauch H.G. (1970) – Effect of Zinc on Translocation of Iron in Soybean Plants. *PLANT PHYSIOLOGY*, **46**, 320–323.
- Apel K., Hirt H. (2004) – REACTIVE OXYGEN SPECIES: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annual Review of Plant Biology*, **55**, 373–399.
- Argüello J.M., Eren E., González-Guerrero M. (2007) – The structure and function of heavy metal transport P1B-ATPases. *BioMetals*, **20**, 233–248.
- Auguy F., Fahr M., Moulin P., Brugel A., Laplaze L., Mzibri M.E., Filali-Maltouf A., Doumas P., Smouni A. (2013) – Lead Tolerance and Accumulation in *Hirschfeldia incana*, a Mediterranean Brassicaceae from Metalliferous Mine Spoils (A Rahman, Ed.). *PLoS ONE*, **8**, e61932.
- Austruy A. Aspects physiologiques et biochimiques de la tolérance à l'arsenic chez les plantes supérieures dans un contexte de phytostabilisation d'une friche industrielle. , 329.
- Baek S.-A., Han T., Ahn S.-K., Kang H., Cho M.R., Lee S.-C., Im K.-H. (2012) – Effects of Heavy Metals on Plant Growths and Pigment Contents in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Pathology Journal*, **28**, 446–452.
- Bates L.S., Waldren R.P., Teare I.D. (1973) – Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*, **39**, 205–207.
- Beilstein M.A., Al-Shehbaz I.A., Mathews S., Kellogg E.A. (2008) – Brassicaceae phylogeny inferred from phytochrome A and ndhF sequence data: tribes and trichomes revisited. *American Journal of Botany*, **95**, 1307–1327.
- Bernhard R., Verkleij J.A.C., Nelissen H.J.M., Vink J.P.M. (2005) – Plant-specific responses to zinc contamination in a semi-field lysimeter and on hydroponics. *Environmental Pollution*, **138**, 100–108.
- Bhalla P.L., Singh M.B. (2008) – Agrobacterium-mediated transformation of *Brassica napus* and *Brassica oleracea*. *Nature Protocols*, **3**, 181–189.
- Bhowmik D., Kumar K.P.S. (2010) – A potential medicinal importance of zinc in human health and chronic disease. , 8.
- Bonnet M. (2000) – Effects of zinc and influence of *Acremonium lolii* on growth parameters, chlorophyll a fluorescence and antioxidant enzyme activities of ryegrass (*Lolium perenne* L. cv Apollo). *Journal of Experimental Botany*, **51**, 945–953.
- Broadley M.R., White P.J., Hammond J.P., Zelko I., Lux A. (2007) – Zinc in plants. *New Phytologist*, **173**, 677–702.
- Candan N., Tarhan L. Changes in Chlorophyll-Carotenoid Contents, Antioxidant Enzyme Activities and Lipid Peroxidation Levels in Zn-Stressed *Mentha pulegium*. *Antioxidant Enzyme*..., 10.
- Cayton M.T.C., Reyes E.D., Neue H.U. (1985) – Effect of zinc fertilization on the mineral nutrition of rices differing in tolerance to zinc deficiency. *Plant and Soil*, **87**, 319–327.
- Chalker-Scott L. (1999) – Environmental significance of anthocyanins in plant stress responses. , 9.

- Chang H.-B., Lin C.-W., Huang H.-J. (2005) – Zinc-induced Cell Death in Rice (*Oryza Sativa L.*) Roots. *Plant Growth Regulation*, **46**, 261–266.
- Chasapis C.T., Loutsidou A.C., Spiliopoulou C.A., Stefanidou M.E. (2012) – Zinc and human health: an update. *Archives of Toxicology*, **86**, 521–534.
- Chen J., Shafi M., Li S., Wang Y., Wu J., Ye Z., Peng D., Yan W., Liu D. (2015) – Copper induced oxidative stresses, antioxidant responses and phytoremediation potential of Moso bamboo (*Phyllostachys pubescens*). *Scientific Reports*, **5**.
- Cherif J., Derbel N., Nakkach M., Bergmann H. von, Jemal F., Lakhdar Z.B. (2010) – Analysis of in vivo chlorophyll fluorescence spectra to monitor physiological state of tomato plants growing under zinc stress. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, **101**, 332–339.
- Chronopoulos G., Theocharopoulos M., Christodoulakis D. (2005) – Phytosociological study of *Hirschfeldia incana* (L.) Lagraze-Fossat (Cruciferae) communities in mainland Greece. *Acta Botanica Croatica*, **64**, 75–114.
- Combe L., Escobar-Gutiérrez A.J. (2009) – Sénescence d'un pied de maïs : évolution de la floraison à la récolte - Botany.
- Corniola R.S., Tassabehji N.M., Hare J., Sharma G., Levenson C.W. (2008) – Zinc deficiency impairs neuronal precursor cell proliferation and induces apoptosis via p53-mediated mechanisms. *Brain Research*, **1237**, 52–61.
- Dai H.-P., Shan C.-J., Zhao H., Li J.-C., Jia G.-L., Jiang H., Wu S.-Q., Wang Q. (2015) – The difference in antioxidant capacity of four alfalfa cultivars in response to Zn. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **114**, 312–317.
- Del Río-Celestino M., Font R., Moreno-Rojas R., De Haro-Bailón A. (2006) – Uptake of lead and zinc by wild plants growing on contaminated soils. *Industrial Crops and Products*, **24**, 230–237.
- Emamverdian A., Ding Y., Mokhberdoran F., Xie Y. (2015) – Heavy Metal Stress and Some Mechanisms of Plant Defense Response. *The Scientific World Journal*, **2015**, 1–18.
- Fahr M. (2014) – Étude physiologique et moléculaire de la tolérance et l'accumulation du Pb chez une population métallique et une population non métallique d'*Hirschfeldia incana* (Brassicacée récoltée au Maroc) : Perspectives pour la phytoremédiation. Mohamed V Agdal de Rabat (Maroc).
- Feigl G., Lehota N., Molnár Á., Ördög A., Rodríguez-Ruiz M., Palma J.M., Corpas F.J., Erdei L., Kolbert Z. (2015) – Zinc induces distinct changes in the metabolism of reactive oxygen and nitrogen species (ROS and RNS) in the roots of two *Brassica* species with different sensitivity to zinc stress. *Annals of Botany*, **116**, 613–625.
- Gill S.S., Tuteja N. (2010) – Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, **48**, 909–930.
- Gisbert C., Almela C., Vélez D., López-Moya J.R., de Haro A., Serrano R., Montoro R., Navarro-Aviñó J. (2008) – Identification of as Accumulation Plant Species Growing on Highly Contaminated Soils. *International Journal of Phytoremediation*, **10**, 185–196.
- Gupta S.K. (2013) – *Biotechnology of Crucifers*. Springer Science & Business Media.

- Hampp R., Schnabl H. (1975) – Effect of aluminium ions on $^{14}\text{CO}_2$ -fixation and membrane system of isolated spinach chloroplasts. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, **76**, 300–306.
- Hashemi S.A. (2012) – Phytoremediation of lead in urban polluted soils in the north of Iran. *Toxicology and Industrial Health*, **28**, 470–473.
- Hassan Z., Aarts M.G.M. (2011) – Opportunities and feasibilities for biotechnological improvement of Zn, Cd or Ni tolerance and accumulation in plants. *Environmental and Experimental Botany*, **72**, 53–63.
- Hossain M.A., Piyatida P., da Silva J.A.T., Fujita M. (2012) – Molecular Mechanism of Heavy Metal Toxicity and Tolerance in Plants: Central Role of Glutathione in Detoxification of Reactive Oxygen Species and Methylglyoxal and in Heavy Metal Chelation. *Journal of Botany*, **2012**, 1–37.
- Hussain D., Haydon M.J., Wang Y., Wong E., Sherson S.M., Young J., Camakaris J., Harper J.F., Cobbett C.S. (2004) – P-Type ATPase Heavy Metal Transporters with Roles in Essential Zinc Homeostasis in Arabidopsis. *The Plant Cell*, **16**, 1327–1339.
- Ivanov Y.V., Kartashov A.V., Ivanova A.I., Savochkin Y.V., Kuznetsov V.V. (2016) – Effects of zinc on Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) seedlings grown in hydroculture. *Plant Physiology and Biochemistry*, **102**, 1–9.
- Jain R., Srivastava S., Solomon S., Shrivastava A.K., Chandra A. (2010) – Impact of excess zinc on growth parameters, cell division, nutrient accumulation, photosynthetic pigments and oxidative stress of sugarcane (*Saccharum* spp.). *Acta Physiologiae Plantarum*, **32**, 979–986.
- Jiang H.M., Yang J.C., Zhang J.F. (2007) – Effects of external phosphorus on the cell ultrastructure and the chlorophyll content of maize under cadmium and zinc stress. *Environmental Pollution*, **147**, 750–756.
- Koechlin-Ramonatxo C. (2006) – Oxygène, stress oxydant et supplémentations antioxydantes ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, **20**, 165–177.
- Kösesakal T., Ünal M. (2012) – Plant growth in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Fresenius Environmental Bulletin*, **21**, 11.
- Kozhevnikova A.D., Seregin I.V., Gosti F., Schat H. (2017) – Zinc accumulation and distribution over tissues in *Noccaea caerulescens* in nature and in hydroponics: a comparison. *Plant and Soil*, **411**, 5–16.
- Kumar Tewari R., Kumar P., Nand Sharma P. (2008) – Morphology and physiology of zinc-stressed mulberry plants. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, **171**, 286–294.
- Lee S.R. (2018) – Critical Role of Zinc as Either an Antioxidant or a Prooxidant in Cellular Systems. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, **2018**, 1–11.
- Lefèvre I., Marchal G., Corréal E., Zanuzzi A., Lutts S. (2009) – Variation in response to heavy metals during vegetative growth in *Dorycnium pentaphyllum* Scop. *Plant Growth Regulation*, **59**, 1–11.
- Licinio A. (2017) – Phyto-extraction du zinc et de l'arsenic par différentes espèces de plantes.
- Lin Y.-F., Aarts M.G.M. (2012) – The molecular mechanism of zinc and cadmium stress response in plants. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **69**, 3187–3206.

- Liu D., Chen J., Mahmood Q., Li S., Wu J., Ye Z., Peng D., Yan W., Lu K. (2014) – Effect of Zn toxicity on root morphology, ultrastructure, and the ability to accumulate Zn in Moso bamboo (*Phyllostachys pubescens*). *Environmental Science and Pollution Research*, **21**, 13615–13624.
- Livingstone C. (2015) – Zinc: Physiology, Deficiency, and Parenteral Nutrition. *Nutrition in Clinical Practice*, **30**, 371–382.
- Lone J.A., Gupta S.K., Wani S.H., Sharma M., lone R.A., Shikari A.B. (2017) – Efficient Callus Induction and Regeneration in *Brassica juncea* for Environment Friendly Agriculture. , 7.
- Long X.X., Yang X.E., Ni W.Z., Ye Z.Q., He Z.L., Calvert D.V., Stoffella J.P. (2003) – Assessing Zinc Thresholds for Phytotoxicity and Potential Dietary Toxicity in Selected Vegetable Crops. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, **34**, 1421–1434.
- Madejon P., Murillo J.M., Maranon T., Valdés B., Rossini Oliva S. (2005) – Thallium Accumulation in Floral Structures of *Hirschfeldia incana* (L.) Lagrèze-Fossat (Brassicaceae). , 1058–1064.
- de Magalhães C.C.P., Cardoso D., dos Santos C.P., Chaloub R.M. (2004) – Physiological and photosynthetic responses of *synechocystis aquatilis* f. *aquatilis* (cyanophyceae) to elevated levels of zinc. *Journal of Phycology*, **40**, 496–504.
- Manivasagaperumal R., Balamurugan S., Thiagarajan G., Sekar J. (2011) – Effect of Zinc on Germination, Seedling Growth and Biochemical Content of Cluster Bean (*Cyamopsis tetragonoloba* (L.) Taub). , 5.
- Manousaki E., Galanaki K., Papadimitriou L., Kalogerakis N. (2014) – Metal Phytoremediation by the Halophyte *Limoniastrum monopetalum* (L.) Boiss: Two Contrasting Ecotypes. *International Journal of Phytoremediation*, **16**, 755–769.
- Mateos-Naranjo E., Pérez-Romero J.A., Redondo-Gómez S., Mesa-Marín J., Castellanos E.M., Davy A.J. (2018) – Salinity alleviates zinc toxicity in the saltmarsh zinc- accumulator *Juncus acutus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **163**, 478–485.
- Mittler R. (2002) – Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, **7**, 405–410.
- Moreira A., Moraes L.A.C., dos Reis A.R. (2018) – Chapter 5 - The Molecular Genetics of Zinc Uptake and Utilization Efficiency in Crop Plants. In: *Plant Micronutrient Use Efficiency* (eds Hossain MA, Kamiya T, Burritt DJ, Phan Tran L-S, Fujiwara T), pp. 87–108. Academic Press.
- Munzuroglu O., Geckil H. (2002) – Effects of Metals on Seed Germination, Root Elongation, and Coleoptile and Hypocotyl Growth in *Triticum aestivum* and *Cucumis sativus*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **43**, 203–213.
- Muschitz A. (2009) – Réponses physiologiques de végétaux supérieurs aux stress métalliques. , 234.
- Navarro-León E., Albacete A., Torre-González A. de la, Ruiz J.M., Blasco B. (2016) – Phytohormone profile in *Lactuca sativa* and *Brassica oleracea* plants grown under Zn deficiency. *Phytochemistry*, **130**, 85–89.
- Nissensohn M., Sánchez-Villegas A., Fuentes Lugo D., Henríquez Sánchez P., Doreste Alonso J., Peña Quintana L., Ruano C., Lowe N.L., Hall Moran V., Skinner A.L.,

- Warthon-Medina M., Serra-Majem L. (2016) – Effect of Zinc Intake on Growth in Infants : A Meta-analysis. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **56**, 350–363.
- Ozdener Y., Kutbay H.G. (2009) – TOXICITY OF COPPER, CADMIUM, NICKEL, LEAD AND ZINC ON. *Fresenius Environmental Bulletin*, **18**, 7.
- Päivöke A.E.A. (2003) – Mineral elements and phytase activity in *Pisum sativum* grown at different Zn supply levels in the greenhouse. *Environmental and Experimental Botany*, **49**, 285–294.
- Panfili F. (2004) – Etude de l'évolution de la spéciation du zinc dans la phase solide d'un sédiment de curage contaminé, induit par phytostabilisation. , 227.
- Park W., Han K.-H., Ahn S.-J. (2012) – Differences in root-to-shoot Cd and Zn translocation and by HMA3 and 4 could influence chlorophyll and anthocyanin content in *Arabidopsis* Ws and Col-0 ecotypes under excess metals. *Soil Science and Plant Nutrition*, **58**, 334–348.
- Parsons W.T., Parsons W.T., Cuthbertson E.G. (2001) – *Noxious Weeds of Australia*. Csiro Publishing.
- Peng D., Shafi M., Wang Y., Li S., Yan W., Chen J., Ye Z., Liu D. (2015) – Effect of Zn stresses on physiology, growth, Zn accumulation, and chlorophyll of *Phyllostachys pubescens*. *Environmental Science and Pollution Research*, **22**, 14983–14992.
- Pongrac P., Zhao F.-J., Razinger J., Zrimec A., Regvar M. (2009) – Physiological responses to Cd and Zn in two Cd/Zn hyperaccumulating *Thlaspi* species. *Environmental and Experimental Botany*, **66**, 479–486.
- Prasad K.V.S.K., Pardha Saradhi P., Sharmila P. (1999) – Erratum to “Concerted action of antioxidant enzymes and curtailed growth under zinc toxicity in *Brassica juncea*.” *Environmental and Experimental Botany*, **42**, 243.
- Raja V., Majeed U., Kang H., Andrabi K.I., John R. (2017) – Abiotic stress : Interplay between ROS, hormones and MAPKs. *Environmental and Experimental Botany*, **137**, 142–157.
- Remon E. (2006) – Tolérance et accumulation des métaux lourds par la végétation spontanée des friches métallurgiques : vers de nouvelles méthodes de bio-dépollution. , 167.
- Rosen J.A., Pike C.S., Golden M.L. (1977) – Zinc, Iron, and Chlorophyll Metabolism in Zinc-toxic Corn. *PLANT PHYSIOLOGY*, **59**, 1085–1087.
- Rout G., Das P. Effect of Metal Toxicity on Plant Growth and Metabolism: I. Zinc . , 10.
- Saghi A., Rashed Mohassel M.H., Parsa M., Hammami H. (2016) – Phytoremediation of lead-contaminated soil by *Sinapis arvensis* and *Rapistrum rugosum*. *International Journal of Phytoremediation*, **18**, 387–392.
- Siemens J. (2011) – Hirschfeldia. In: *Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources* (ed Kole C), pp. 171–176. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
- Sinclair S.A., Krämer U. (2012) – The zinc homeostasis network of land plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, **1823**, 1553–1567.
- Singh J., Hembram P., Basak J. (2014) – Potential of < i>Vigna unguiculata</i> as a Phytoremediation Plant in the Remediation of Zn from Contaminated Soil. *American Journal of Plant Sciences*, **05**, 1156–1162.

- Souza J.F., Dolder H., Cortelazzo A.L. (2005) – Effect of Excess Cadmium and Zinc Ions on Roots and Shoots of Maize Seedlings. *Journal of Plant Nutrition*, **28**, 1923–1931.
- Stanković M., Topuzović M., Marković A., Pavlović D., Delić G., Bojović B., Branković S. (2010) – Influence of Zinc (ZN) on Germination of Wheat (*Triticum Aestivum L.*). *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, **24**, 236–239.
- Stoyanova Z., Doncheva S. (2002) – The effect of zinc supply and succinate treatment on plant growth and mineral uptake in pea plant. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, **14**, 111–116.
- U.S. Geological Survey, 2020, Mineral commodity summaries 2020 : U.S. Geological Survey, 200 p., <https://doi.org/10.3133/mcs2020>
- Verbruggen N., Hermans C., Schat H. (2009) – Molecular mechanisms of metal hyper-accumulation in plants: Tansley review. *New Phytologist*, **181**, 759–776.
- Viehweger K. (2014) – How plants cope with heavy metals. *Botanical Studies*, **55**.
- Wang C., Zhang S.H., Wang P.F., Hou J., Zhang W.J., Li W., Lin Z.P. (2009) – The effect of excess Zn on mineral nutrition and antioxidative response in rapeseed seedlings. *Chemosphere*, **75**, 1468–1476.
- Warwick S.I., Sauder C.A., Al-Shehbaz I.A. (2011) – Systematic position of *Ivania*, *Scoliaxon*, and *Phravenia* (Brassicaceae). *TAXON*, **60**, 1156–1164.
- Yadav S.K. (2010) – Heavy metals toxicity in plants: An overview on the role of glutathione and phytochelatins in heavy metal stress tolerance of plants. *South African Journal of Botany*, **76**, 167–179.
- Yoon J., Cao X., Zhou Q., Ma L.Q. (2006) – Accumulation of Pb, Cu, and Zn in native plants growing on a contaminated Florida site. *Science of The Total Environment*, **368**, 456–464.
- Zhi Y., Deng Z., Luo M., Ding W., Hu Y., Deng J., Li Y., Zhao Y., Zhang X., Wu W., Huang B. (2015) – Influence of Heavy Metals on Seed Germination and Early Seedling Growth in *ⁱ_{sativa}</i> Mill. *American Journal of Plant Sciences*, **06**, 582–590.*

Annexes

Annexe 1 : Composition de la solution nutritive de Broughton Dillworth (BD)

Macro-éléments	M	mg/l
CaCl ₂ , 2H ₂ O	2 M	294
KH ₂ PO ₄	1 M	136
MgSO ₄	0,5 M	123
K ₂ SO ₄	0,5 M	87
MnSO ₄	2m M	0,34
Fe,EDTA		
Na ₂ EDTA		7,45
FESO ₄		5,57
Oligo-éléments		
H ₃ BO ₃	4 mM	0,247
ZnSO ₄ , 7H ₂ O	1 mM	0,288
CuSO ₄ , 5H ₂ O	0,4 mM	0,100
CoSO ₄ , 7H ₂ O	0,2 mM	0,056
NA ₂ MoO ₄ , 2H ₂ O	0,2 Mm	0,048

Annexe 2 : Poster

Contribution à l'étude des mécanismes physiologiques et moléculaires de tolérance au stress dû au zinc chez *Hirschfeldia incana* (L.) LAGR.-FOSS

Souleymane COULIBALY^{1,2}; Habiba BALAFREJ¹; Diégane DIOUF¹; Rajaa LAYACHF²
¹Département de biologie végétale de l'université Cheikh Anta Diop de Dakar BP : 5005
²Laboratoire de physiologie et des biotechnologies végétales de l'université Mohamed V Agdal de Rabat (Maroc)

• **Introduction**
Le zinc (Zn) joue un rôle important dans la croissance et le développement optimal des plantes (Martinka *et al.*, 2014), cependant à forte dose, il devient un élément toxique aussi bien pour la flore, la faune que pour l'homme. En réponse à son effet toxique, de nombreuses approches dont la phytorémédiation ont été élaborées pour la décontamination des sols et/ou eau pollués. Celle-ci repose sur l'aptitude de la plante utilisée à extraire ou à réduire la mobilité des polluants présents dans son rhizosphère. C'est ainsi que des études sont menées pour confirmer les capacités de *Hirschfeldia incana* rencontrée sur des sites hautement pollués par les métaux.

• **Objectifs**
 Évaluer l'effet de l'excès de zinc sur la production de biomasse aérienne et racinaire chez *H. incana*
 Déterminer l'effet de l'excès de zinc sur certains paramètres biochimiques chez *H. incana*

• **Matériel et méthodes**
Matériel végétal Mise en culture des graines sur le milieu MS

Chambre de culture
Graine de *H. incana*
Avant traitement Application des traitements 15 jours
0 µM 300 µM 500 µM
Récolte des jeunes plants après traitements

Phytotron
Désinfection des graines Transfert

Culture hydroponique sur le milieu BD

Récolte des jeunes plants après traitements
Version 2.2.1

Analysse des données

• **Résultats**
Effet du zinc sur la longueur et le poids frais des parties aériennes et racinaires

Effet du zinc sur la teneur en chlorophylle, en proline et en anthocyanines

• **Conclusion**
Cette étude a permis de confirmer malgré les effets délétères de l'excès de zinc sur l'elongation racinaire et caulinaire et sur le poids frais des parties racinaires et aériennes que *H. incana* est tolérante à l'excès de zinc. Elle a également permis de montrer l'implication de la proline dans cette tolérance.
En perspective, il serait important d'étendre cette étude sur le volet moléculaire afin de déterminer les gènes responsables de cette tolérance au stress zinc.

• **Références bibliographiques**
Martinka, M., Vaculík, M. et A. Lux (2014). Réponses des cellules végétales au cadmium et au zinc. Dans la biologie cellulaire appliquée aux plantes (pp. 209-246). Springer, Berlin, Heidelberg.

• **Remerciement**
Ce travail a été rendu possible grâce au programme de mobilité intitulé TAFAHUM de TISESCO