

## **Effets du Cadmium Sur la Production de Superoxyde D'oxygène et Sur la Réponse Antioxydante dans Les Feuilles de *Vicia Faba***

**Dalila Souguir**

*Institut National de Recherche en Génie Rural, Eau et Forêts (INRGREF)  
Rue Hédi Karray, Manzeh IV BP 10; 2080-Ariana, Tunisie.*

E-mail: [souguir.dalila@yahoo.com](mailto:souguir.dalila@yahoo.com)

Tel: (00216) 71 719 630

**Mohamed Hachicha**

*Institut National de Recherche en Génie Rural, Eau et Forêts (INRGREF)  
Rue Hédi Karray, Manzeh IV BP 10; 2080-Ariana, Tunisie.*

E-mail: [hachicha.mohamed@iresa.agrinet.tn](mailto:hachicha.mohamed@iresa.agrinet.tn)

**Gérard Ledoigt**

*Clermont Université, Université Blaise Pascal, UMR 547 PIAF/INRA  
BP 80026, 63171 Aubière cedex, France*

E-mail: [Gerard.LEDOIGT@univ-bpclermont.fr](mailto:Gerard.LEDOIGT@univ-bpclermont.fr)

**Pascale Goupil**

*Clermont Université, Université Blaise Pascal  
UMR 547 PIAF/INRA, BP 80026, 63171 Aubière cedex, France*

E-mail: [Pascale.Goupil@univ-bpclermont.fr](mailto:Pascale.Goupil@univ-bpclermont.fr)

**Ezzeddine El Ferjani**

*Laboratoire de Physiologie et Génétique des Plantes à Intérêt Agronomique  
Faculté des Sciences de Bizerte, 7021-Jarzouna, Tunisie*

E-mail: [ezzferjani2002@yahoo.fr](mailto:ezzferjani2002@yahoo.fr)

### **Abstract**

Antioxidant activities were monitored in response to cadmium stress in *Vicia faba* leaves. A metal accumulation was recorded in the leaf tissues at 24 h of treatment with 50, 100 and 200  $\mu\text{M}$  of  $\text{CdCl}_2$ . At this stage (24 h), the production of  $\text{O}_2^-$  increased and reached the control at the end of the experiment. The dismutation of  $\text{O}_2^-$  to  $\text{H}_2\text{O}_2$  is attributed to SOD, which showed an earlier increase (12 h) of its activity. The APX activity increased only at 12 h and those of CAT and GPX showed no changes compared to controls. It seems that the  $\text{H}_2\text{O}_2$  produced is not sufficient to activate these enzymes.

**Keywords:** Antioxidant activities,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; Leaves; Oxygen superoxide; *Vicia faba*.

## 1. Introduction

Le cadmium est un métal lourd relativement rare dans l'écosystème (McBride, 1995). Il fait partie des polluants les plus toxiques et les plus mobiles dans le système sol-plante. Sa présence dans l'atmosphère, dans le sol ou dans l'eau peut poser de graves problèmes de toxicité aux différents organismes vivants, notamment via la bioaccumulation au niveau de la chaîne trophique (Grant et al., 1995). La présence de cadmium dans les sols est attribuée aux retombées atmosphériques de fonderies de zinc, raffineries, incinérateurs ainsi qu'aux combustions de charbon, à divers déchets urbains et à l'utilisation de fertilisants en agriculture (Sanità di Toppi and Gabbrielli, 1999; Roth et al., 2006). En Tunisie, une nouvelle stratégie a été adoptée visant à utiliser des eaux usées traitées (EUT) en agriculture. Cependant, vue leur richesse en métaux lourds, l'utilisation à long terme de ces eaux peut constituer une source de contamination des sols par ces éléments notamment le Cadmium (Mapanda et al., 2005 ; Rusan et al., 2007). Les sols faiblement pollués par ce métal contiennent des concentrations comprises entre 0,04 et 0,32 mM du cadmium. Les sols modérément à fortement contaminés atteignent quant à eux des concentrations supérieures à 0,32 mM et pouvant aller jusqu'à 1 mM (Sanità di Toppi and Gabbrielli, 1999). L'exposition des plantes aux métaux lourds induit un stress oxydatif généralement associé à une production accrue d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) toxiques, tels que l'anion superoxyde ( $O_2^-$ ) et le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ). Une production transitoire de ROS accompagne toujours, chez les plantes, les processus physiologiques normaux tels que la respiration et la photosynthèse (Asada et Takahashi, 1987). Bien que quelques ROS peuvent agir comme molécules signal, en modifiant l'expression de certains gènes et en modulant l'activité de protéines spécifiques de défense (Souguir et al., 2011), tous les ROS, à hautes concentrations, peuvent être extrêmement nuisibles pour les organismes. Ils peuvent induire une oxydation des protéines, des lipides et des acides nucléiques, conduisant à des altérations des structures cellulaires et à la mutagenèse (Halliwell and Gutteridge, 1999 ; Benavides et al., 2005 ; Dietz, 2005). Pour pouvoir survivre et se protéger contre les dommages oxydatifs engendrés par ces espèces, certaines plantes peuvent mettre en œuvre des mécanismes de défense variés, enzymatiques et non enzymatiques. Les premiers jouent un rôle important dans le piégeage des ROS via une série de réactions complexes. Ces réactions incluent la dismutation de  $O_2^-$  en  $H_2O_2$ , par les superoxydes dismutases (SOD), et par la suite la détoxification de cette dernière forme par diverses enzymes telles que la catalase (CAT), la glutathion peroxydase (GPX) et l'ascorbate peroxydase (APX) à travers le cycle d'ascorbate-gluthation.

Vue que l'accumulation de métaux lourds, dont le cadmium, dans les sols et leur transfert aux plantes sont problématiques cause de leur toxicité, nous nous sommes intéressés à étudier l'incidence de trois doses du cadmium (50, 100 et 200  $\mu$ M), durant une cinétique de 0, 12, 24 et 48 h sur des plantules de *Vicia faba*. La cinétique ainsi que les concentrations ont été choisies à partir des essais préliminaires relatifs à l'effet du cadmium sur la division cellulaire et l'induction des micronoyaux (Souguir et al., 2011).

## 2. Matériels et Méthodes

### 2.1. Germination des Graines et Culture Hydroponique

Les graines de *Vicia faba* (variété : Aguadulce) sont triées et désinfectées par un lavage à l'eau de Javel (10 %) pendant 20 min, puis rincées abondamment à l'eau distillée pour lessiver les produits de conservation ayant adhéré à la graine.

Pour faciliter et homogénéiser leur germination, les graines sont placées dans de l'eau distillée pendant une nuit. Elles sont ensuite, mises à germer entre deux couches de coton imbibé continuellement par de l'eau distillée. La germination se fait à l'obscurité et à une température de  $24 \pm 2$  °C.

Après 4 jours de germination, les plantules sont repiquées en sceaux contenant un milieu nutritif hydroponique continuellement aéré (Souguir et al., 2008). Les solutions nutritives sont renouvelées tous les 2 jours et la culture se déroule en salle climatisée sous conditions contrôlées : 16 h de lumière/8 h d'obscurité, à une température 25 °C/20 °C et à une humidité relative de 65 (± 5)%. L'intensité lumineuse au niveau des plantules, assurée par des lampes de mercure, est de 150  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

## 2.2. Traitement Métallique et Récolte des Plantules

Les plantules de *Vicia faba* âgées de 12 jours sont traitées par le cadmium (50, 100 et 200  $\mu\text{M}$ ) ajouté dans la solution nutritive sous forme de  $\text{CdCl}_2$ . Pour chaque traitement, 3 répliquas sont réalisés. Les plantules sont récoltées après 12, 24 et 48 h du traitement.

## 2.3. Dosage du Cadmium

Les feuilles sont déshydratées à 60 °C puis placées dans des piluliers en verre contenant l'acide nitrique à 65% pendant 15 jours. Le dosage du cadmium a été effectué par spectrophotométrie d'absorption atomique (Perkin Elmer-model 2380).

## 2.4. Dosage du Superoxyde d'oxygène ( $\text{O}_2^-$ )

La production de l'anion superoxyde d'oxygène est déterminée par le XTT ( sodium, 3-[phenylamino-carbonyl]-3,4-tetrazolium]-bis (4-methoxy-6-nitro) benzene-sulfonic acid hydrate) selon Able et al. (1998). Le matériel végétal (1g) est broyé dans un tampon d'extraction composé de 50 mM Tris-HCl (pH 7,5). L'extrait est centrifugé pendant 20 min à 14000xg. Le surnageant est récupéré par la suite pour servir au dosage du superoxyde d'oxygène. Le milieu réactionnel comporte le tampon d'extraction, l'extrait protéique et le XTT (0,5 mM). La réduction de XTT est déterminée à 470 nm en utilisant un coefficient d'extinction molaire  $\epsilon = 21,6 \text{ mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ .

## 2.5. Détermination des Activités Antioxydantes

**Extraction et dosage des protéines:** Les feuilles sont broyées à froid, dans un tampon d'extraction formé par 50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$  (pH 7), 5 mM Ascorbate de sodium et 0, 2 mM EDTA. Après centrifugation à 12000xg pendant 15 min, le surnageant recueilli contient les protéines solubles. Il servira pour le dosage des protéines et pour l'activité SOD. Le dosage des protéines est réalisé selon la méthode de Bradford (1976)

**Détermination de l'activité SOD:** Selon Mishra et Fridovich (1972), l'adrénaline (épinéphrine), en présence de l'anion superoxyde  $\text{O}_2^-$  s'oxyde spontanément en adrénochrome; composé coloré qui absorbe à 490 nm. Les SOD, dont le rôle est de réduire l'anion  $\text{O}_2^-$  inhibent ainsi cette réaction (Polle et al., 1989). Le dosage de l'activité SOD se fait en suivant l'évolution de la densité optique à 490 nm d'un milieu contenant 62,5 mM bicarbonate de sodium/Carbonate de sodium (pH 10,4), 125  $\mu\text{M}$  EDTA et de la catalase. Le milieu réactionnel ne contenant pas l'extrait protéique est additionné d'une aliquote de solution d'adrénaline.

**Détermination de l'activité CAT:** L'activité de la catalase est mesurée par la diminution de la densité optique à 240 nm selon Aebi (1984). Le milieu réactionnel est formé par du  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$  (25 mM; pH 7) et du  $\text{H}_2\text{O}_2$  (30 mM).

**Détermination de l'activité GPX:** L'activité est déterminée selon la méthode de Fielding et Hall (1978). Elle est mesurée par l'augmentation de l'absorbance à 470 nm. Le milieu réactionnel est formé par du  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$  (25 mM; pH 7), du  $\text{H}_2\text{O}_2$  (30 mM) et de gaïacol (9 mM).

**Détermination de l'activité APX:** Le milieu réactionnel est formé par du  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$  (50 mM; pH 7), de l'EDTA (0,1 mM), du  $\text{H}_2\text{O}_2$  (5 mM) et d'Ascorbate de sodium (0,5 mM). La réaction est suivie par la variation de l'absorbance à 290 nm suite à l'ajout de l'extrait protéique. L'activité de l'enzyme est calculée selon le coefficient d'extinction molaire  $\epsilon = 2,8 \text{ mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ .

## 2.6. Analyse Statistique

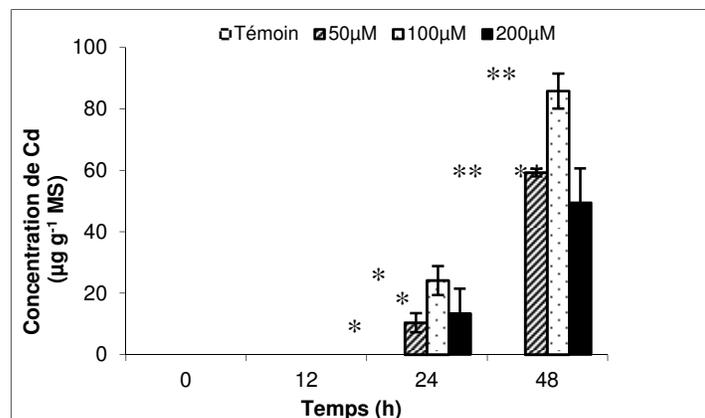
Les expériences sont répétées trois fois et les résultats présentés sont exprimés sous la forme de moyenne  $\pm$ SD calculés au seuil de probabilité inférieur ou égal à 95%. La signification de différences entre les plantes témoins et traitées au cadmium est déterminé selon le test de Student.

## 3. Résultats

### 3.1. Accumulation du Cadmium dans les Feuilles de *Vicia Faba*

La teneur endogène en cadmium dans les tissus foliaires a augmenté significativement ( $p < 0,05$ ) dès 24 h du traitement (figure 1). A ce stade, les feuilles ont enregistré des concentrations de 10, 24 et 13  $\mu\text{g g}^{-1}\text{MS}$  du métal en présence, respectivement, de 50, 100 et 200  $\mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$  dans la solution nutritive. En prolongeant la durée du traitement (48 h), l'accumulation est plus importante. Cependant, les plantules traitées avec la plus forte concentration de ce métal (200  $\mu\text{M}$ ) ont montré l'accumulation la plus faible par rapport aux autres traitées.

**Figure 1:** Teneur en cadmium au niveau des feuilles de *Vicia faba*. Chaque valeur représente la moyenne de 6 mesures individuelles  $\pm$ SD. \*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,01$  par rapport au control.



### 3.2. Effet du Cadmium sur la Production de Superoxyde d'oxygène ( $\text{O}_2^-$ )

Le dosage de superoxyde d'oxygène dans les tissus foliaires de fève a révélé une production significative ( $p < 0,05$ ) de cet anion dans les plantules traitées par rapport à celles témoins après 24 h d'exposition au cadmium (Tableau 1). L'augmentation est d'environ 70% par rapport au témoin en présence de 50 et 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$  et 30% en présence de 200  $\mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$  dans la solution nutritive. Elle diminue au-delà de 24 h pour rejoindre celle du témoin.

**Tableau 1:** Effets de différentes concentrations du cadmium sur la production de superoxyde d'oxygène ( $\text{O}_2^-$ ) dans les feuilles de fève cultivée sur solution nutritive enrichie en  $\text{CdCl}_2$ . Chaque valeur représente la moyenne de 6 mesures individuelles  $\pm$ SD. \*  $p < 0,05$  par rapport au control.

	$\text{O}_2^-$ ( $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{protéines}$ )			
		12 h	24 h	48 h
Témoin		0,44 $\pm$ 0,12	0,52 $\pm$ 0,07	0,49 $\pm$ 0,09
$\text{CdCl}_2$	50 $\mu\text{M}$	0,49 $\pm$ 0,05	0,91 $\pm$ 0,10*	0,56 $\pm$ 0,01
	100 $\mu\text{M}$	0,36 $\pm$ 0,02	1,04 $\pm$ 0,07*	0,52 $\pm$ 0,02
	200 $\mu\text{M}$	0,46 $\pm$ 0,06	0,69 $\pm$ 0,05*	0,58 $\pm$ 0,06

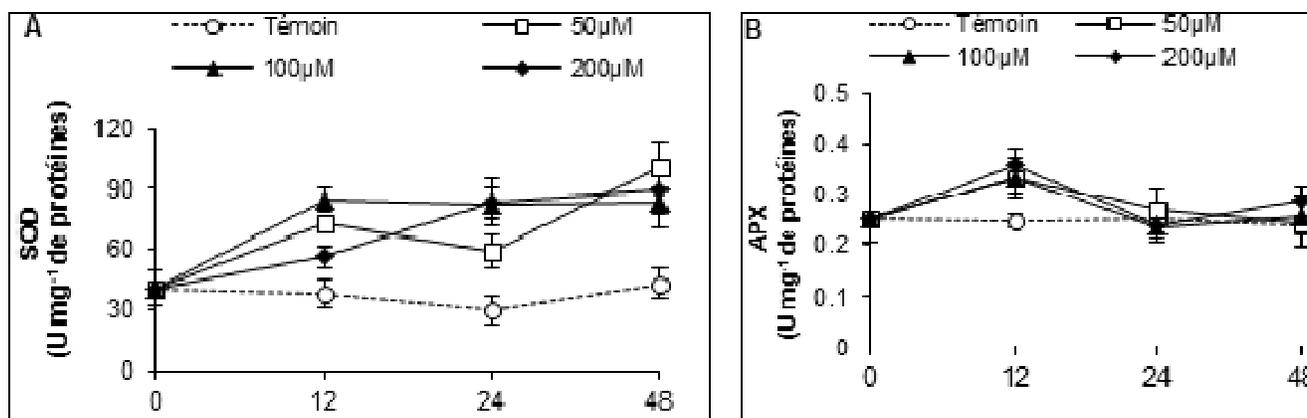
### 3.3. Effet du Cadmium sur les Activités Antioxydantes

Dans les feuilles, l'addition du cadmium dans la solution nutritive a entraîné des perturbations de l'activité SOD (figure 2A). En effet, une augmentation significative ( $p < 0,05$ ) et précoce (12 h) de l'activité de cette enzyme a été enregistrée quel que soit le traitement. A 48 h, cette augmentation atteint 136% en présence de 50  $\mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$  et environ 100% en présence des plus fortes concentrations du métal (100 et 200  $\mu\text{M}$ ). L'APX a été stimulée seulement à 12 h du traitement puis son activité a rejoint celle du témoin (figure 2B). Concernant la CAT, l'analyse de l'effet de différentes doses sur l'activité de cette enzyme a montré le maintien d'une activité équivalente à celle du témoin dans la partie aérienne de la plante (figure 2C). De même pour la GPX, un niveau d'activité inchangé par rapport au témoin a été enregistré durant le traitement (figure 3D).

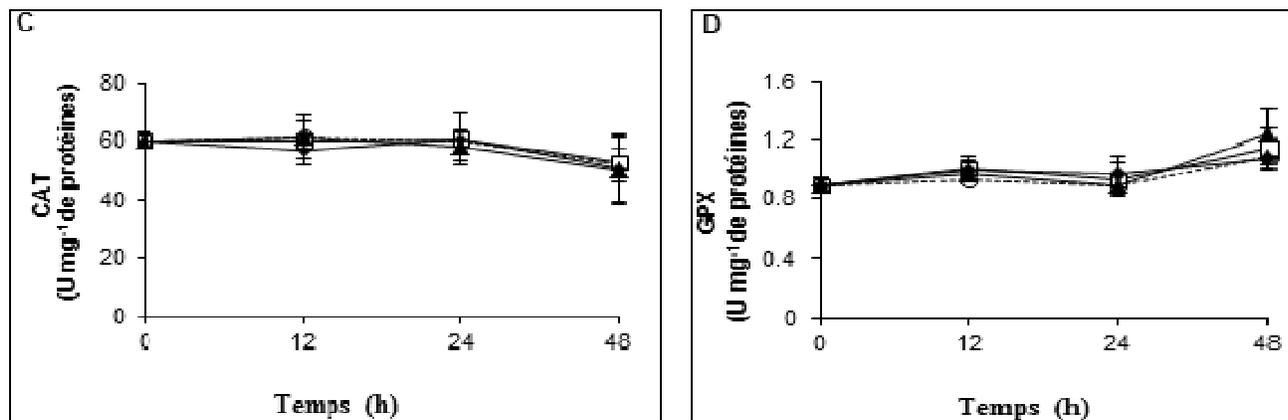
## 4. Discussion

Le cadmium est un élément non nécessaire pour les plantes et il est hautement toxique. La sensibilité à l'égard de ce métal varie suivant les espèces et même les cultivars d'une même espèce (Inouhe et al., 1994; Fodor, 2002; Lindberg et Greger, 2002). Le suivi de l'accumulation du cadmium dans les tissus foliaires de fève, une plante très consommée en Tunisie, a révélé une augmentation des teneurs endogènes de ce métal dès 24 h du traitement en présence de 50, 100 et 200  $\mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$ . En prolongeant le traitement, l'accumulation du cadmium dans les tissus foliaires a augmenté. Cependant, la plus faible teneur est notée en présence de la plus forte concentration du métal (200  $\mu\text{M}$ ). Ceci pourrait être expliqué par une manifestation de la plante après une longue exposition à des fortes concentrations du métal qui se résume, probablement en une forte rétention des ions métalliques par les racines (Souguir et al., 2011). Ces dernières limitent au maximum l'exportation des polluants métalliques vers les organes aériens. L'importance de la racine en tant que site d'accumulation privilégiée du cadmium comparativement aux autres parties de la plante a été beaucoup documentée (Dixit et al., 2001; Sandalio et al., 2001; Mishra et al., 2006; Yannarelli et al., 2006; Lin et al., 2007; Liu et al., 2007). En effet, la racine constitue la voie principale par laquelle les ions métalliques transitent de la solution du sol vers le tissu végétal. Le transport membranaire du cadmium dans les cellules est réalisé par des transporteurs d'autres ions divalents en particulier du fer et du zinc (Benavides et al., 2005, Cosio et al., 2004; Clemens, 2006; Nakanishi et al., 2006). Après l'entrée dans le cytosol, le cadmium, qui présente une forte affinité pour les thiolates, est en grande partie chélaté par le glutathion ou par des peptides dérivés du glutathion: les phytochélatines mais aussi par des acides organiques comme le citrate (Clemens, 2006). La plus grande partie du cadmium accumulé reste dans les racines et seules de petites quantités sont transportées vers les parties aériennes.

**Figure 2:** Activités de superoxyde dismutase SOD (A), ascorbate peroxydase APX (B), catalase CAT (C), gaïacol peroxydase GPX (D) dans les feuilles de fève cultivée sur solution nutritive enrichie en  $\text{CdCl}_2$ . Chaque valeur représente la moyenne de 6 mesures individuelles  $\pm$ SD.



**Figure 2:** Activités de superoxyde dismutase SOD (A), ascorbate peroxydase APX (B), catalase CAT (C), gaïacol peroxydase GPX (D) dans les feuilles de fève cultivée sur solution nutritive enrichie en CdCl<sub>2</sub>. Chaque valeur représente la moyenne de 6 mesures individuelles ±SD. - continued



L'accumulation du métal dans les feuilles de fève s'est accompagnée par une production accrue de O<sub>2</sub><sup>-</sup> à 24 h du traitement chez les plantules cultivées dans des solutions nutritives enrichies par 50, 100 et 200 µM de CdCl<sub>2</sub>. Au-delà de 24 h, la production de cet anion diminue jusqu'à rejoindre celle du témoin. La production de O<sub>2</sub><sup>-</sup> a été aussi enregistrée dans les racines de blé en présence du cuivre (Sgherri et al., 2007).

Pour faire face au stress, les plantes vont mobiliser des systèmes antioxydants. Ceux-ci peuvent être enzymatique et/ou non-enzymatique et la coopération entre ces antioxydants joue un rôle important dans l'élimination des ROS et le maintien du statut redox de la plante (Cho et Seo, 2005). Dans le cas de la réponse enzymatique, l'élimination de O<sub>2</sub><sup>-</sup> est assurée spontanément par la superoxyde dismutase (SOD), une enzyme permettant la dismutation de cet anion en peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Dans notre étude, l'activité SOD est très précoce (12 h) et elle a précédé l'accumulation importante du cadmium et celle de O<sub>2</sub><sup>-</sup> dans les tissus foliaires de fève. La stimulation de la SOD en présence du cadmium a été beaucoup documentée (Shah et al., 2001 ; Gill et al., 2012 ; Parlak and Yilmaz, 2013). L'activité précoce de la SOD (12 h) pourrait être due à une expression des gènes codant pour les différents isoformes de cette enzyme (Kima et al., 2010). Cette expression est en relation probable avec l'accumulation des molécules signales dans la racine de *Vicia*, organe qui a accumulé plus le métal (Souguir et al., 2011) et parmi ces molécules, le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. En effet, dans une étude antérieure de Souguir et al. (2011), une production accrue de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans les racines de fève a été notée dès 12 h du traitement par 50, 100 et 200 µM de CdCl<sub>2</sub>. Le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est une molécule capable de traverser les membranes cellulaires (Bienert et al. 2006) et diffuse rapidement de cellule à cellule comme elle peut être transportée sur de longues distances à partir de ses sites d'origine dans la plante. Ainsi, le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> possède toutes les caractéristiques d'une molécule de signalisation intercellulaire (Neill et al., 2002) et sa production est stimulée en présence de différents types de stress environnementaux (Cheng and Song, 2006). En plus, plusieurs études ont indiqué que H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> peut agir comme un signal local et systémique régulant directement l'expression de nombreux gènes. Certains d'entre eux sont impliqués dans les réponses aux pathogènes, tandis que d'autres sont évoqués au cours de l'adaptation des plantes aux stress abiotiques (Desikan et al 2001; Wang et al. 2006; Vandenbroucke et al. 2008). Récemment, Vergara et al. (2012), ont montré que le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et l'éthylène agissent comme des molécules de signalisation activant des gènes codant pour des enzymes antioxydantes chez la vigne. L'augmentation de l'activité de la SOD à 24 h du traitement pourrait être expliquée par la production concomitante de O<sub>2</sub><sup>-</sup> à ce stade de l'expérimentation.

En présence du cadmium, l'activité SOD va engendrer une accumulation de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> suite à la dismutation de O<sub>2</sub><sup>-</sup>. La détoxification de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> peut être envisagée par plusieurs enzymes dont l'APX,

la CAT et la GPX. La réponse de ces enzymes diffère selon la concentration du métal, l'espèce végétale et la durée du traitement (Lin et al., 2007, Schützendübel et al., 2001; Fornazier et al., 2002 ; Singh et al., 2006). Chez la fève, l'APX a montré une stimulation de son activité. Cette stimulation a été observée seulement à 12 h du traitement. Par la suite l'activité de cette enzyme demeure inchangée par rapport aux témoins. L'APX, ayant plus d'affinité pour le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que la CAT et la GPX (Wang et al., 1999), semble être activée en présence des faibles teneurs en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La stimulation de l'APX en présence d'un stress métallique, a été beaucoup documentée (Sharma and Dubey, 2005 ; Gupta et al., 2009). Dans notre étude, le traitement cadmique n'a eu aucun effet sur les activités CAT et GPX durant l'expérimentation. La quantité de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans les feuilles de fève semble ne pas être suffisante pour stimuler ou inhiber les activités de ces deux enzymes. Une absence, une diminution ou une stimulation de l'activité CAT ont été enregistrées chez d'autres espèces végétales sous différents types de stress (Benavides et al., 2000 ; Lin et al., 2000 ; Boscolo et al., 2003 ; Parlak and Yilmaz, 2013; Saraf, 2013). De même pour la GPX, sa réponse diffère selon l'espèce végétale et le type de stress (Jouili et El Ferjani, 2004; Mishra et al., 2006; Singh et al., 2006 ; Lin et al., 2007; Bouazizi et al., 2007). D'autres auteurs ont suggéré que le rôle de cette enzyme dans la détoxification des ROS est plus important que celui de la CAT (Ali et al., 2006).

## 5. Conclusion

Il semble qu'à ce niveau du traitement cadmique (48 h) et malgré le passage du cadmium dans ses tissus, les feuilles de *Vicia* n'ont pas montré une activation de ses enzymes antioxydantes surtout celle intervenant dans l'élimination de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> témoignant (i) d'une faible accumulation des ROS dans les tissus foliaires, (ii) ou d'une manifestation de système de détoxification non-enzymatique suite à une synthèse du glutathion et d'ascorbate (Foyer and Noctor, 2011). Une connaissance de ce type de réponse au stress nous permet de mieux comprendre la cinétique de réactions se déroulant dans la cellule en cas de ce type de stress.

## Références

- [1] Able, A.J. Guest D.I. and Sutherland, M.W, 1998. "Use of a new tetrazolium-based assay to study the production of superoxide radicals by tobacco cell cultures challenged with a virulent zoospores of *Phytophthora parasitica* var *nicotianae*". *Plant Physiology* 117, pp. 491-499.
- [2] Aebi, H, 1984. "Catalase *in vitro*". *Methods in Enzymology* 105, pp. 121-126.
- [3] Ali, M.B., Hahn, E.J. and Paek, K.Y, 2006. Antioxidative responses of *Echinacea angustifolia* cultured roots to different levels of CO<sub>2</sub> in bioreactor liquid cultures. *Enzyme and Microbial Technology* 39, pp. 982-990.
- [4] Asada, K. and Takahashi, M. 1987. "Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis". In *Photoinhibition*, D.J. C. Kyle Osmond, C.J. Arntzen, (Eds.), Elsevier, New York, pp. 227-297.
- [5] Benavides, M.P., Gallego, S.M. Tomaro, M.L, 2005. "Cadmium toxicity in plants". *Brazilian Journal of Plant physiology* 17, pp. 21-34.
- [6] Bienert, G.P., Schjoerring, J.K. and Jahn, T.P, 2006. Membrane transport of hydrogen peroxide". *Biochemistry and Biophysics Acta* 1758, pp. 994-1003.
- [7] Boscoloa, P.R.S., Menossib, M. and Jorge, R.A, 2003. "Aluminum-induced oxidative stress in maize". *Phytochemistry* 62, pp. 181-189.
- [8] Bouazizi, H. Jouili, H. and El Ferjani, E, 2007. "Copper-induced oxidative stress in maize shoots (*Zea mays* L.): H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation and peroxidases modulation". *Acta Biologica Hungarica* 58 (2), pp. 209-218.

- [9] Bradford, M.M. 1976. "A rapide and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the pdncipfe of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, pp. 248-254.
- [10] Cheng, Y.L. and Song C.P, 2006. "Hydrogen peroxide homeostasis and signaling in plant cells". *Science in China Series C: Life Sciences* 49, pp. 1-11.
- [11] Cho, U.H. and Seo, N.H, 2005. "Oxidative stress in *Arabidopsis thaliana* exposed to cadmium is due to hydrogen peroxide accumulation. *Plant Science* 168 (1), pp. 113-120.
- [12] Clemens, S, 2006. "Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants". *Biochimie* 88, pp. 1707-1719.
- [13] Cosio, C., Vollenweider, P. and Keller, C, 2005. "Localization and effects of cadmium in leaves of a cadmium-tolerant willow (*Salix viminalis* L.), I. Macrolocalization and phytotoxic effects of cadmium". *Environmental and Experimental Botany* 58, pp. 64-74.
- [14] Desikan, R. Mackerness, S., Hancock, J.T. and Neill, S.J, 2001. "Regulation of the *Arabidopsis* transcriptome by oxidative stress". *Plant Physiology* 127, pp. 159-172.
- [15] Dietz, K.J, 2005. "Plant thiol enzymes and thiol homeostasis in relation to thiol-dependent redox regulation and oxidative stress". In N. Smirnoff (Eds.), *Antioxidants and reactive oxygen species in plants*. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK, pp. 197-214.
- [16] Dixit, V., Pandey V. and Shyam, R, 2001. "Differential oxidative responses to cadmium in roots and leaves of pea (*Pisum sativum* L. Cv. Azad)". *Journal of Experimental Botany* 52, pp. 1101-1109.
- [17] Fielding, J.L. and Hall, J.L, 1978. "A biochemical and cytochemical study of peroxidase activity in roots of *Pisum sativum*". *Journal of Experimental Botany* 29, pp. 979-986.
- [18] Fodor, F, 2002. "Physiological responses of vascular plants to heavy metals". In M.N.V. Prasad K. Strzalka (Eds.), *Physiology and Biochemistry of Metal Toxicity and Tolerance in Plants*. Kluwer Academic Publishers, Netherlands, pp. 149-177.
- [19] Fornazier, R.F., Ferreira, R.R., Pereira, G.J.G., Molina, S.M.G., Smith, R.J., Lea, P.J. and Azevedo, R.A, 2002. "Cadmium stress in sugar cane callus cultures: effect on antioxidant enzymes". *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 71, pp. 125-131.
- [20] Foyer, C.H. and Noctor, G, 2011. "Ascorbate and Glutathione: The Heart of the Redox Hub". *Plant Physiology* 155, pp. 2-18.
- [21] Gill, S.S., Khan, N.A. and Tuteja, N, 2012. "Cadmium at high dose perturbs growth, photosynthesis and nitrogen metabolism while at low dose it up regulates sulfur assimilation and antioxidant machinery in garden cress (*Lepidium sativum* L.)". *Plant Science* 182, pp.112- 120.
- [22] Grant, C.A., Bailey, L.D., Selles, F. and Uckley, W.T, 1995. "Cadmium accumulation in crops. Canadian Network of Toxicology Centres National Workshop on Cadmium Transport into Plants" Workshop Proceedings, Ottawa, pp. 55-71.
- [23] Gupta, D.K., Nicoloso, F.T., Schetinger, M.R.C., Rossato, L.V., Pereira, L.B., Castro, G.Y., Srivastava, S. and Tripathi, R.D, 2009. "Antioxidant defense mechanism in hydroponically grown *Zea mays* seedlings under moderate lead stress". *Journal of Hazardous Materials* 172, pp. 479-484.
- [24] Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C, 1999. "Free Radicals in Biology and Medecine". 3<sup>rd</sup> ed., Oxford University Press, New York, pp. 286.
- [25] Inouhe, M., Ninomiya, S., Tohoyama, H., Joho, M. and Murayama, T, 1994. "Different characteristics of roots in the cadmium-tolerance and Cd-binding complex formation between mono- and dicotyledonous plants". *Journal of Plant Research*. 107, pp. 201-207.
- [26] Jouili, H. and El Ferjani, E. 2004. "Effect of copper excess on superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in sulflower seedlings (*Helianthus annus* L.)". *Acta Physiology Plantarum* 26, pp. 29-35.

- [27] Kima, Y.I., Kima, H.J., Kwona, Y.M. Kang Y.J., Lee I.H., Jind, B.R. Hane, Y.S. Cheonf, H.M. Ha N.G. and Seo, S.J, 2010. "Modulation of MnSOD protein in response to different experimental stimulation in *Hyphantria cunea*". *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 157, pp. 343-350.
- [28] Lin, C.C. and Kao, C.H, 2000. "Effect of NaCl on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> metabolism in rice leaves". *Plant Growth Regulation*. 30, pp. 151-155.
- [29] Lin, R., Wang, W., Luo, Y., Du W., Guo, H. and Yin, D, 2007. "Effects of soil cadmium on growth, oxidative stress and antioxidant system in wheat seedlings (*Triticum aestivum* L.)". *Chemosphere* 69, pp. 89-98.
- [30] Lindberg, S. and Greger, M, 2002. "Plant genotypic differences under metal deficient and enriched conditions". In M.N.V. Prasad, K. Strzalka (Eds.), *Physiology and Biochemistry of Metal Toxicity and Tolerance in Plants*, Kluwer Academic Publishers, Netherlands, pp. 357-393.
- [31] Liu, D. Jiang, W. and Gao, X, 2007. "Effects of cadmium on root growth, cell division and nucleoli in root tip cells of garlic". *Biology Plantarum* 47, pp.79-83.
- [32] Mapanda, F., Mangwayana, E.N., Gillera, K.E. and Nyamangara, J, 2005. "The effect of long-term irrigation using wastewater on heavy metal contents of soils under vegetables in Harare, Zimbabwe". *Agriculture, Ecosystems and Environment* 107, pp.151-165.
- [33] McBride, M.B, 1995. "Toxic metal accumulation from agricultural use of sludge. Are US EPA regulations protective?" *Journal of Environmental Quality* 25, pp. 1025-1032.
- [34] Mishra, H.P. and Fridovich, I, 1972. "The role of superoxide anion in the autooxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase". *The Journal of Biological Chemistry* 247, pp. 3170-3175.
- [35] Mishra, S., Srivastava, S., Tripathi, R.D., Govindarajan, R., Kuriakose, S.V. and Prasad, M.N.V, 2006. "Phytochelatin synthesis and response of antioxidants during cadmium stress in *Bacopa monnieri* L". *Plant Physiology and Biochemistry* 44, pp. 25-37.
- [36] Nakanishi H., Ogawa, I., Ishimaru, Y., Mori, S. and Nishizawa, N.K, 2006+. "Iron deficiency enhances cadmium uptake and translocation mediated by the Fe<sup>2+</sup> transporters OsIRT1 and OsIRT2 in rice". *Soil Science Plant Nutrition* 52, pp. 464-469.
- [37] Neill, S.J., Desikan, R., Clarke, A., Hurst, R.D. and Hancock, J.T, 2002. Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants". *Journal of Experimental Botany* 53, pp.1237-1247
- [38] Parlak, K.U. and Yilmaz, D.D, 2013. "Ecophysiological tolerance of *Lemna gibba* L. exposed to cadmium". *Ecotoxicology and Environmental Safety* 91, pp. 79-85.
- [39] Polle, A., Krings, B. and Rennenberg, H, 1989. "Superoxide dismutase activity in needles of Norwegian trees (*Picea Abies* L.)". *Plant Physiology* 90, pp. 1310-1315.
- [40] Roth, U., von Roepenack-Lahaye, E., and Clemens, S. 2006. "Proteome changes in *Arabidopsis thaliana* roots upon exposure to Cd<sup>2+</sup>". *Journal of Experimental Botany* 57, pp. 4003-4013.
- [41] Rusan, M.J.M., Hinnawi, S. and Rousan, L, 2007. "Long term effect of wastewater irrigation of forage crops on soil and plant quality parameters". *Desalination* 215, pp. 143-152.
- [42] Sandalio, L.M. 2004. "Cadmium induced subcellular accumulation of O<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in pea leaves". *Plant Cell Environment* 27, pp. 1122-1134.
- [43] Sanità di Toppi, L. and Gabbrielli, R, 1999. "Response to cadmium in higher plants". *Environmental and Experimental Botany* 41, pp.105-130.
- [44] Saraf, N, 2013. "Enhancement of Catalase Activity under Salt Stress in Germinating Seeds of *Vigna radiate*". *Asian Journal of Biomedical and Pharmaceutical Science* 3, pp. 6-8.
- [45] Schützendübel, A., Schwanz, P., Teichmann, T., Gross, K., Langenfeld-Heyser, R., Goldbold, D.L. and Polle, A, 2001. "Cadmium induced changes in antioxidative systems, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> content and differentiation in pine (*Pinus sylvestris*) roots". *Plant Physiology* 127, pp. 887-892.

- [46] Sgherri, C., Quartacci, M.F. and Navari-Izzo, F, 2007. "Early production of activated oxygen species in root apoplast of wheat following copper excess". *Journal of Plant Physiology* 164, pp. 1152-1160.
- [47] Shah, K., Kumar, R.G., Verma, S., Dubey, R.S, 2001. "Effect of cadmium on lipid peroxidation, superoxide anion, generation and activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings". *Plant Science* 161, pp. 1135-1114.
- [48] Sharma, P. and Dubey, R.S, 2007. "Involvement of oxidative stress and role of antioxidative defense system in growing rice seedlings exposed to toxic concentrations of aluminum". *Plant Cell Reports* 26, pp. 2027-2038.
- [49] Singh, M.P., Mathur, M.M.K., Saxena, D.K. and Chowdhuri, D.K, 2009. "Induction of hsp70, hsp60, hsp83 and hsp26 and oxidative stress markers in benzene, toluene and xylene exposed *Drosophila melanogaster*: Role of ROS generation". *Toxicology and Applied Pharmacology* 235, pp. 226-243.
- [50] Souguir, D., El Ferjani, E., Ledoigt, G. and Goupil, P, 2008. "Exposure of *Vicia faba* and *Pisum sativum* to copper-induced genotoxicity". *Protoplasma* 233, pp. 203-207.
- [51] Souguir, D., El Ferjani, E., Ledoigt, G. and Goupil, P, 2011." Sequential effects of cadmium on genotoxicity and lipoperoxidation in *Vicia faba* roots". *Ecotoxicology* 20, pp. 329-336.
- [52] Vandenbroucke, K., Robbens, S., Vandepoele, K., Inze, D., Van de Peer, Y. and Breusegem Van, F, 2008. "Hydrogen peroxide-induced gene expression across kingdoms: a comparative analysis". *Molecular Biology and Evolution* 25, pp. 507-516.
- [53] Vergara, R., Parada, F., Rubia, S. and Pérez, F.J, 2012. "Hypoxia induces H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production and activates antioxidant defense system in grapevine buds through mediation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and ethylene". *Journal of Experimental and Botany* 63, pp. 4123-4131.
- [54] Wang, J. Zhang, H. and Allen, R.D, 1999. "Over expression of an Arabidopsis peroxisomal ascorbate peroxidase gene in tobacco increases protection against oxidative stress". *Plant Cell Physiology* 40, pp. 725-732.
- [55] Wang, P.C., Du, Y.Y., An, G.Y. Zhou, Y. Song C.R. 2006. "Analysis of global expression profiles of Arabidopsis genes under abscisic acid and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> applications". *Journal of Integrative Plant Biology* 48, pp. 62-74
- [56] Yannarelli, G.G., Fermández-Alvarez, A.J., Santa-Cruz, D.M., Tomaro, M.L, 2006. "Glutathione reductase activity and isoforms in leaves and roots of wheat plants subjected to cadmium stress". *Phytochemistry* 68, pp. 505-512.