

Evaluation des capacités de résistance d'*Atriplex halimus* L. face au cadmium

Assessment of *Atriplex halimus* resistance faced with cadmium

ABIR BEN HASSINE* et SADOK BOUZID

Abstract: Cadmium is a toxic element unfavorable to plant growing. Growing "in vitro" of two Tunisian ecotypes of *Atriplex halimus* was studied under concentrations of 10, 100 and 1000 μM of Cd. It was observed that over 100 μM , Cadmium acts as inhibitor when cells store proline and soluble sugars. The results are discussed according to plant resistance faced with stressfull factors.

Keywords: *Atriplex halimus*, cadmium, growing.

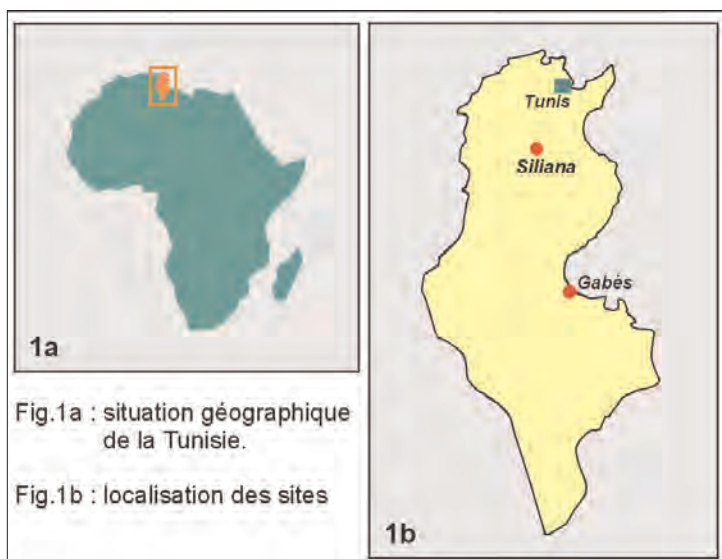
Résumé: Le cadmium est l'un des métaux lourds les plus toxiques; sa présence dans le sol cause des dégâts considérables au niveau des plantes tel que l'inhibition de la croissance, la perturbation du statut hydrique et l'apparition de nécroses. Dans ce travail, on s'intéresse à découvrir le comportement d'une halophyte *Atriplex halimus* face au cadmium. Pour cela, la croissance « in vitro » de deux écotypes a été suivie, un provenant du Nord de la Tunisie, l'autre provenant du Sud, en réponse à un apport de cadmium dans le milieu de culture. De plus, ont été effectuées des quantifications de teneurs en composés organiques accumulées en fonction des doses croissantes de cadmium (10, 100 et 1000 μM). Après un mois de traitement, la croissance des cals est inhibée en présence de 100 et 1000 μM . En présence de ces doses les cellules accumulent de plus en plus de proline et de sucres solubles totaux notamment chez les cals s'apparentant à l'écotype du Sud qui semble mieux résister à l'agent stressant. Ces accumulations sont discutées en termes de résistance au stress et de phytoremédiation.

Mots clés : *Atriplex halimus*, cals, croissance, cadmium.

INTRODUCTION

Le cadmium est l'un des plus dangereux métaux lourds, il constitue une source de pollution de plus en plus menaçante pour l'environnement [1]. Sa présence dans l'atmosphère, dans le sol ou dans l'eau, même à des concentrations très faibles, peut poser de graves problèmes de toxicité aux différents organismes vivants, notamment via la bioaccumulation au niveau de la chaîne trophique. A cause de la toxicité élevée de ces éléments, il nous semble difficile d'imaginer que des végétaux puissent trouver dans des endroits touchés par la pollution des niches écologiques acceptables. Pourtant, certaines plantes, grâce à des adaptations morphologiques et physiologiques, ont pu faire face à cette pollution en développant des mécanismes leur permettant de rejeter ou d'accumuler ces éléments toxiques. L'intérêt porté pour ces plantes ne cesse de croître, depuis quelques années, puisqu'elles représentent une solution efficace et peu coûteuse pour éliminer les éléments toxiques du sol [2]. Il s'agit de la phytoremédiation qui assure la décontamination du sol via l'utilisation de plantes vertes [3]. Bien qu'aujourd'hui, plusieurs plantes ont déjà été impliquées dans le processus de phytoremédiation, un problème se pose encore puisque la plupart de ces plantes sont des plantes cultivées, donc des glycophytes. Par conséquent, elles ne peuvent pas supporter des doses élevées de salinité, et, de ce fait, être plantées pour extraire les métaux lourds des zones touchées par la salinité. *Atriplex halimus* est une halophyte faisant partie de

*Laboratoire de biologie et physiologie végétales, département de biologie, Faculté des Sciences de Tunis, Campus Universitaire, 1060 Tunis, Tunisie
corresponding author: E-mail address: abiri@voila.fr (Abir B. Hassine)



la famille des Chénopodiacées, reconnue depuis des années déjà pour ses capacités de résistance et d'adaptation aux stress abiotiques [4]. Sa rusticité et son système racinaire développé lui permettent de se développer sur un sol pauvre en éléments minéraux essentiels et de mauvaise structure. Son système aérien forme une bonne couverture végétale à feuillage dense. Toutes ces caractéristiques nous amènent à penser qu'on peut utiliser *Atriplex halimu* dans une technique de phytoerémédiation. Pour cela, nous nous proposons, dans cette note, une

évaluation de ses capacités de résistance *in vitro* à des doses croissantes de cadmium afin de suivre sa croissance et son comportement.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Durant la période de fructification, des graines d'*Atriplex halimus* ont été collectées à partir de deux stations différentes de la Tunisie : la première se trouvant dans le nord (Siliana), la seconde au sud-est du pays (Gabès). Après décortication, 600 graines ont été stérilisées pendant 30 secondes à l'éthanol 97%(v/v), puis traitées au formaldéhyde 0,8% (v/v) pendant 40 minutes et enfin à une solution d'hypochlorite de calcium 5%(w/v) pendant 20 min. Les graines ont été par la suite bien rincées à l'eau distillée puis transférées dans des boîtes de pétri stériles tapissées de papier whatman dans une chambre de culture à l'obscurité et à une température de 28°C. 48 heures plus tard 150 hypocotyles ont été excisés sous une hotte à flux laminaire, ils ont servi d'explants pour la culture des cals. Le milieu de culture utilisé est celui de LINSMAIER et SKOOG [5] (LS) auquel on a ajouté 3% (w/v) saccharose, 0,5 mg l⁻¹ 2,4D, 1 mg l⁻¹ BA, 1 mg l⁻¹ NAA, 100 mg l⁻¹ myo-inositol et 0,1 mg l⁻¹ thiamine-HCL. Le pH du milieu a été ajusté à 5,7 avec KOH 1N avant de lui ajouter 2,5 g l⁻¹ Gelrite (Phytigel, Sigma). Finalement, le milieu a été placé dans une autoclave pendant 20min à 120°C et 150 kPa. Après deux mois de culture, les cals obtenus ont été coupés en morceaux et transférés dans des boîtes de pétri contenant le même milieu additionné ou non de doses croissantes de cadmium (dose 1: 10 μM, dose 2: 100 μM et dose 3: 1000 μM). Les cals récoltés après un mois de traitement ont servi pour doser les teneurs en proline et en sucres solubles totaux ainsi que pour calculer les taux relatifs de croissance : Relative growth rate : $RGR = \frac{\ln(PFf) - \ln(PFi)}{\Delta t}$ Avec PFf : poids de matière fraîche en fin de période de traitement ; PFi : poids de matière fraîche en début de la période de traitement ; Δt : durée du traitement.

Pour la quantification de la proline environ 400 mg de matière fraîche ont été broyés en présence d'azote liquide puis additionnés de 4 ml d'acide sulfosalicylique 3%. Après une centrifugation de 5 minutes à 8000 tours et récupération du surnageant, le dosage a été effectué selon la méthode de BATES et al., [6]. L'extraction des sucres solubles se fait par de l'éthanol (70% ou 80%) à partir de 500 mg de matière fraîche broyés en présence d'azote liquide. Le dosage est réalisé selon la méthode classique de YEMM et WILLIS [7]; utilisant le glucose comme solution standard et l'antrone comme réactif.

RESULTATS ET DISCUSSION

A très faible dose ($10\mu\text{M}$) le cadmium ne semble pas perturber la croissance des cals qui présentent des valeurs de RGR supérieures à celles des témoins chez les deux provenances (Fig .2). Pour une dose de $100\mu\text{M}$ Cd les RGR diminuent significativement ; toutefois, il existe une différence dans le comportement des deux écotypes. En effet, l'écotype du sud (Gabès) présente un RGR positif, traduisant une augmentation du poids de la matière fraîche durant le mois de traitement au cadmium ; alors que celui de la provenance nordique (Siliana) présente un RGR qui diminue considérablement jusqu'à atteindre une valeur négative prouvant une nette réduction du poids de la matière fraîche en fin du traitement (photo1).

Cependant, lorsque la concentration du milieu est de $1000\mu\text{M}$ les RGR des deux populations sont fortement abaissés indiquant que cette dose inhibe fortement la croissance des cals des deux écotypes. La diminution des RGR peut être la conséquence de la réduction du contenu en eau dans les cals due à la présence de cadmium dans le milieu de culture. Cette réaction est rencontrée chez la même espèce lors d'autres stress notamment le stress hydrique [8] ou salin [9] suggérant que l'une des premières conséquences de la présence d'un agent stressant c'est la diminution de la disponibilité de l'eau dans le milieu de culture.

En présence de cadmium dans le milieu, on enregistre une faible accumulation de proline et de sucres solubles totaux dès le début du traitement (Fig. 3). Toutefois, les teneurs accumulées deviennent de plus en plus significatives à fortes concentrations de cadmium dans le milieu. Il est à noter également que quel que soit la dose du traitement, l'accumulation des composés organiques est plus intense chez l'écotype du sud. L'accumulation des solutés organiques dans les tissus cellulaires permettrait à la plante d'assurer normalement ses fonctions physiologiques malgré la dégradation de son état interne conséquent au stress. Néanmoins, le rôle exact de chacun de ces composés a été longtemps sujet de discussion. En effet, l'accumulation de la proline dans les tissus des plantes a été lié, dans certains cas, à la diminution de la croissance et, donc, considérée comme un symptôme de destruction. Cette hypothèse n'est pas confirmée par le présent travail qui prouve que : l'écotype du sud, présentant un RGR plus élevé que celui du nord, et donc ayant une croissance plus intense, accumule plus de proline tout au long du traitement. La présence de proline chez les plantes stressées par le cadmium est donc un signe de résistance et non pas de dommages. En effet, il a été démontré que chez *A. halimus*, la proline joue un rôle essentiel dans l'ajustement osmotique notamment dans les premières heures de stress [11]. A côté de la proline, les sucres solubles totaux contribuent fortement à l'ajustement osmotique chez les plantes en conditions de stress. Ils compromettent indirectement la croissance puisque les glucides ne sont pas directement métabolisables et, d'autre part, parce qu'il est aujourd'hui clairement établi que l'accumulation des sucres solubles totaux peut modifier certains paramètres de la photosynthèse en inhibant l'expression de nombreux gènes impliqués dans l'assimilation du CO_2 [12]. A ce stade d'expérimentation, les résultats sont en faveur de l'implication de l'*Atriplex halimus* en un projet de phytoremédiation. Mais l'étude nécessitera une confirmation des résultats à l'échelle de la plante entière.

RÉFÉRENCES

- BAJJI, M; KINET, JM; LUTTS, S. 1998 - Salt stress effect on roots and leaves of *Atriplex halimus* L. and their corresponding callus cultures, *Plant Sci.* 137:131-144. [9]
- BATES, LS; WALDREN, RP; TEARE, ID. 1973 - Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil* . 39: 205-207. [6]
- BEN HASSINE, A; GHANEM, ME; BOUZID, S; LUTTS, S. 2008 - An inland and a coastal population of the Mediterranean xero-halophyte species *Atriplex halimus* L. differ in their ability to accumulate proline and glycinebetaine in response to salinity and water stress. *J. Exp. Bot.* (In press). [11]

- CHAKRAVARTY, B; SRIVASTAVA, S. 1997 - Effects of genotype and explant during in vitro response to cadmium stress and variation in protein and proline contents in linseed. *Ann. Bot.* 79: 487- 491. [10]
- HE, Z; LI, J; ZHANG, H; MA, M. 2005 - Different effects of calcium and lanthanum on the expression of phytochelatin synthase gene and cadmium absorption in *Lactuca sativa*. *Plant Sci* 168: 309- 318. [1]
- JORDAN; FL; ROBIN-ABBOTT, M; MAIER, RM; GLENN EP. 2002 - A comparison of chelator-facilitated uptake by a halophyte and a glycophyte. *Environ. Toxicol. Chem.* : 2698-2704. [3]
- KOCH, KE. 1996 - Carbohydrates-modulated gene expression in plants. *Ann. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* ; 47: 509- 540. [12]
- LE HOUÉROU, HN. 1992 - The role of saltbushes (*Atriplex spp.*) in arid land rehabilitation in the Mediterranean Basin: a review. *Agroforest. Sys.* 18: 107-148. [4]
- LINSMAIER, EM; SKOOG, F. 1965 - Organic growth factor requirements of tobacco tissues cultures. *Physiol. Plantarum.* 18: 100-127. [5]
- MC GRATH, SP; ZHAO, FJ; LOMBL, E. 2002 - Phytoremediation of metals, metalloids and radionuclides. *Adv. Agron.* 75: 1-56. [2]
- MARTINEZ, JP. 2001 - Mechanisms of resistance to water stress at plant and cellular levels in *Atriplex halimus L.* Thèse présentée en vue de l'obtention du diplôme de Faculté des Sciences Agronomiques et d'Ingénierie Biologique. Université catholique de Louvain. Louvain-la-Neuve, Belgique : 224p. [8]
- YEMM, EW; WILLIS, J. 1954 - The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. *Bioch. J.* 57 : 508-514. [7]

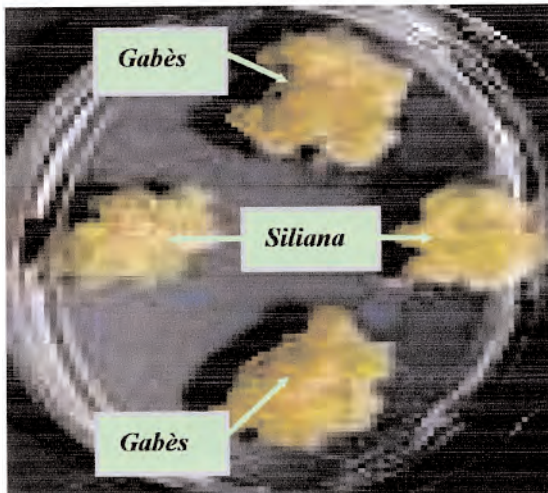


Photo 1

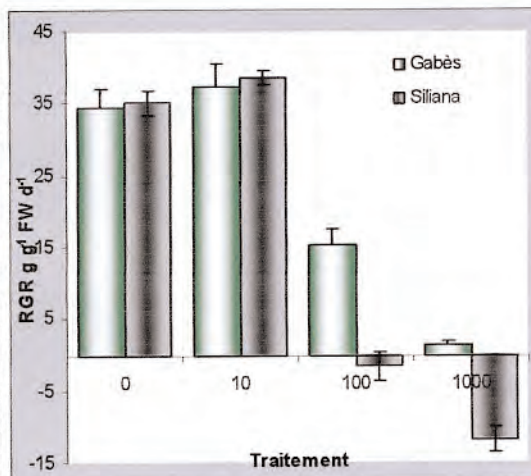


Figure 2

Photo1 : Illustration des calles des deux écotypes d'*Atriplex halimus* (Siliana) et (Gabès) obtenus après un traitement de 1 mois avec 100µM Cd.

Figure 2 : Taux relatif de croissance (RGR $\text{g g}^{-1} \text{FWd}^{-1}$) des cals issus de deux écotypes d'*Atriplex halimus* : (Siliana) et (Gabès) après 1 mois de culture dans un milieu contenant des doses croissantes de cadmium (0,10, 100 et 1000µM Cd).

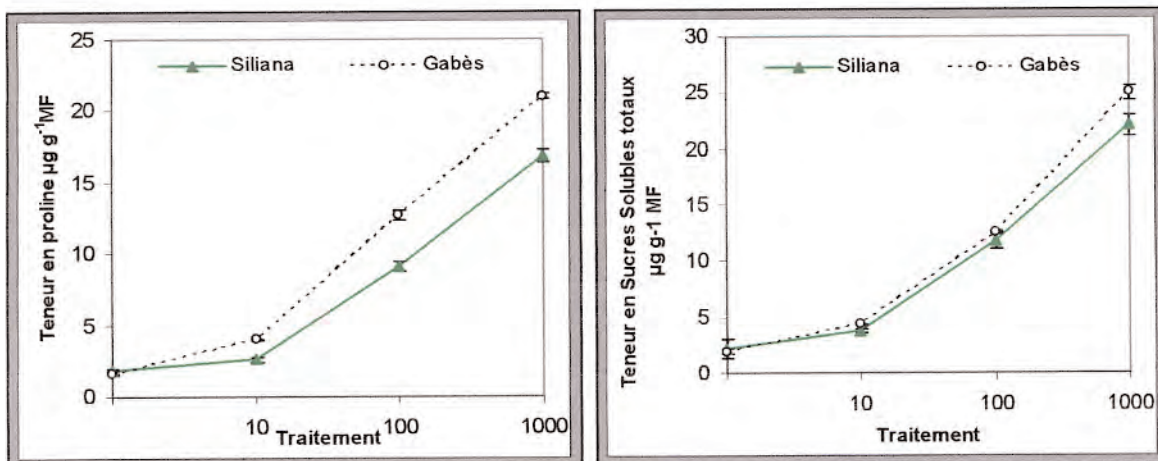


Figure 3

Figure 3 : Teneur en proline et en sucres solubles totaux ($\mu\text{g. g}^{-1} \text{MF}$) accumulées au niveau des cals de deux écotypes d'*Atriplex halimus* (Siliana) et (Gabès) après 1 mois de culture dans un milieu contenant des doses croissantes de cadmium (0,10, 100 et 1000µM Cd).