



HAL
open science

Adaptation aux métaux lourds d'une Fabacée (légumineuse): réponses phonologique et moléculaire au plomb du *Lathyrus sativus* L.

Judicaëlle Brunet

► **To cite this version:**

Judicaëlle Brunet. Adaptation aux métaux lourds d'une Fabacée (légumineuse): réponses phonologique et moléculaire au plomb du *Lathyrus sativus* L.. Biologie végétale. Université Paris-Est, 2008. Français. NNT : 2008PEST0057 . tel-02069090

HAL Id: tel-02069090

<https://theses.hal.science/tel-02069090>

Submitted on 15 Mar 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE PARIS EST
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES



THESE

Pour obtenir le grade de : Docteur de l'Université Paris Est
Spécialité : Sciences de l'Univers et de l'Environnement

Présentée par :

Judicaëlle BRUNET

Adaptation aux métaux lourds d'une Fabacée (légumineuse) :
Réponses phénologique et moléculaire au plomb
du *Lathyrus sativus* L.



Soutenu le 19 décembre 2008

Direction de thèse : Mme Y. Zuily-Fodil, Professeur à l'Université Paris Est-Créteil
et Mme A. Repellin, Maître de conférences à l'Université Paris Est-Créteil

Equipe d'Ecophysiologie Moléculaire (LEPM), UMR-IRD 137 BIOSOL

Jury

M. P. Dizengremel, Professeur, Université Henri Poincaré Nancy 1	Président
Mme H. Sallanon, Professeur, Université d'Avignon et Pays de Vaucluse	Rapporteur
M. G. Potters, Maître de conférences, Université de Antwerpen, Belgique	Rapporteur
M. T. Sterckeman, HDR, INPL-INRA, Université Nancy	Examinateur
Mme Y. Zuily-Fodil, Professeur, Université Paris Est-Créteil	Examinatrice
Mme A. Repellin, Maître de conférences, Université Paris Est-Créteil	Examinatrice

REMERCIEMENTS

Avant de présenter les résultats de ce travail, je voudrais remercier tous ceux qui, d'une manière ou d'une autre, ont contribué à sa réalisation :

Le Pr. Yasmine Zuily-Fodil et le Dr. Anne Repellin, mes directrices de thèse, pour leur disponibilité, leur soutien et leur encadrement efficace tout au long de ces trois années ;

Le Dr. Chantal Passaquet pour sa gentillesse, son écoute et le temps qu'elle a accordé à mes nombreuses sollicitations scientifiques, techniques et autres,

Le Dr Gilles Varrault, du CERÈVE, pour sa disponibilité et la formation qu'il m'a apportée sur les analyses des métaux ;

Le Dr Patrick Ausset, du LISA, pour l'utilisation de son microscope électronique à balayage ;

Le Dr. Daniel Laffray pour son aide précieuse en physiologie végétale et en dépannage de toutes sortes ;

Les Drs Dominique Contour-Ansel et Maria Helena Cruz de Carvalho pour leur soutien moral et scientifique ;

Les Drs Anh Pham Thi et Agnès d'Arcy Lameta pour leurs conseils avisés et leur expérience ;

Fryni Grekis pour son aide administrative et ses conseils sur le Grèce ;

Ulrike, Biet et Georges mes collègues en thèse avec qui j'ai partagé de très bons moments et dont les échanges scientifiques et personnels m'ont beaucoup apporté et encouragé.

A tous ceux qui se reconnaîtront, nous nous retrouvons rapidement pour notre prochain « Tea time » (ou « quart d'heure culturel ») : Chantal avec le

chocolat, Ulrike le thé et ses crayons mâchouillés, Biet sa lecture de l'horoscope, Georges son humour...

Je tiens également à remercier les membres de mon jury pour le temps qu'ils m'ont accordé malgré leur charge de travail.

Un merci tout particulier à toute ma famille qui m'a soutenue et encouragée depuis toujours, dans mes études et dans la vie en général.

Merci à Romain de m'avoir supportée et encouragée ces dernières semaines où ma thèse a dû passer en priorité.

ABBREVIATIONS

ABA	acide abscissique
ABC	ATP-binding cassette
AP	aspartique protéase
APX	ascorbate peroxydase
CAT	catalase
CDF	cation diffusion facilitator
CNGC	cyclic nucleotide gated channel
CP	cystéine protease
DHAR	déhydroascorbate réductase
EDTA	ethylene diamine tetraacetic acid
GR	glutathion réductase
GSH	glutathion
GSHS	glutathion synthase
GST	glutathion S-transférase
H-EDTA	hydroxyethylene diamine tetraacetic acid
HSP	heat shock protein
IPTG	isoprpyl-beta-D-thiogalactoside
MDHAR	monodéhydroascorbate réductase
MT	métallothionéine
NRAMP	natural resistance associated macrophage protein
Pb(NO ₃) ₂	nitrate de plomb
PC	phytochélatine synthase
PLD α	phospholipase D α
pUBQ	polyubiquitine
ROS	reactive oxygen species, espèces activées de l'oxygène
RWC	relative water content, contenu relatif en eau
SOD	superoxide dismutase
TI	tolerance index, indice de tolérance
ZIP	ZRT, IRT-like protein

LISTE DES ILLUSTRATIONS

FIGURES

Figure 1 : Forme chimique du complexe Pb-EDTA.

Figure 2 : Structure d'une ATPase de type P.

Figure 3 : Structure putative des transporteurs de type CNGC chez les plantes.

Figure 4 : Structure des transporteurs protéiques ZIP.

Figure 5 : Organisation des domaines putatifs des transporteurs de type ABC, des sous familles PDR et ATM.

Figure 6 : Structure des protéines NRAMP.

Figure 7 : Structure putative de la protéine MTP1 d'*Arabidopsis thaliana*.

Figure 8 : Structure type des protéines CAX.

Figure 9 : Schéma récapitulatif des transporteurs de métaux lourds dans une cellule végétale.

Figure 10 : Le cycle ascorbate-glutathion chez les plantes.

Figure 11 : Diagramme des différentes étapes de la réaction 5' RACE.

Figure 12 : Diagramme des différentes étapes de la réaction 3' RACE.

Figure 13 : Principe de la chambre à pression de Scholander.

Figure 14 : Potentiel hydrique moyen chez le *Lathyrus sativus* en fonction de la durée de la sécheresse.

Figure 15 : Croissance de la racine principale et de la tige de *Lathyrus sativus* L. lignée 'Bangladesh' en fonction de la dilution du milieu de culture Hoagland et du temps.

Figure 16 : Croissance de la racine principale et de la tige de *Lathyrus sativus* L. lignée 'Raipur' en fonction de la dilution du milieu de culture Hoagland et du temps.

Figure 17 : Représentation schématique de la protéine produite par le gène *CNGC*. La région indiquée entre les deux flèches correspond à la séquence protéique déduite de la séquence d'ADNc isolée chez le *Lathyrus sativus*.

Figure 18 : Contenu en Pb dans les plantes de *Lathyrus sativus*, cultivées pendant 8 et 14 jours dans du milieu Hoagland (1/10) sans phosphate additionné ou non de Pb et EDTA.

Figure 19 : Quantification des transcrits d'ARNm de *LsCNGC*, *LsCP*, *LshGSHS* et *LsGR* par PCR en temps réel dans les racines et feuilles de plantes de *Lathyrus sativus*, cultivées, huit jours, dans du milieu Hoagland (1/10) sans phosphate additionné ou non de Pb et EDTA.

Figure 20 : Assemblage des trois fragments isolés de la cystéine protéase de *Lathyrus sativus*.

Figure 21 : Séquence nucléotidique et séquence d'acides aminés déduite de l'ADNc complet de *Lathyrus sativus LsCP1* codant une cystéine protéase putative.

Figure 22 : Comparaison de la séquence en acides aminés de la cystéine protéase de *Lathyrus sativus LsCP1* avec les séquences homologues d'autres espèces.

Figure 23 : Schéma de la cystéine protéase *LsCP1* isolée chez *Lathyrus sativus*.

Figure 24 : Schéma représentant la structure de la protéine codée par le gène de GCN. Les flèches représentent le fragment isolé chez le *Lathyrus sativus LsGCN*.

Figure 25 : Quantification des transcrits d'ARNm de *LsGCN* par RT-PCR en temps réel dans les racines et feuilles de plantes de *Lathyrus sativus*, cultivées, huit jours, dans du milieu Hoagland (1/10) sans phosphate additionné ou non de Pb et EDTA.

Figure 26 : Schématisation des réponses des plantes de *Lathyrus sativus* à la présence de nitrate de plomb dans le milieu de culture hydroponique.

TABLEAUX

Tableau 1 : Concentration de Pb dans le sol de différents sites contaminés ou non par des métaux lourds.

Tableau 2 : Quantité de Pb accumulée dans les différents organes de plantes cultivées sur un substrat solide.

Tableau 3 : Quantité de Pb accumulée dans les différents organes de plantes cultivées en culture hydroponique.

Tableau 4 : Effet de l'ajout d'EDTA sur la disponibilité du Pb dans le sol et sur son absorption.

Tableau 5 : Conditions de culture des plantes de *Lathyrus sativus* en milieu hydroponique suivant l'expérience menée.

Tableau 6 : Fréquence des mesures de longueur des racines et des tiges de *Lathyrus sativus* dans les différentes cultures.

Tableau 7 : Culture hydroponique chez les Fabacées (légumineuses).

Tableau 8 : Morphologie des plantes de *Lathyrus sativus* lignée 'Bangladesh' en culture hydroponique avec trois dilutions de milieu Hoagland différentes, à différents temps de culture.

Tableau 9 : Descriptif de la morphologie des plantes de *Lathyrus sativus* lignée 'en culture hydroponique avec trois dilutions de milieu Hoagland différentes, à différents temps de culture.

Tableau 10 : RWC des feuilles de *Lathyrus sativus* lignée 'Bangladesh' après 11 et 18 jours de culture hydroponique pour différentes concentrations de milieu Hoagland.

Tableau 11 : RWC des feuilles de *Lathyrus sativus* lignée 'Raipur' après 11 et 18 jours de culture hydroponique pour différentes concentrations de milieu Hoagland.

Tableau 12 : Contenu en Pb dans les racines de plantes cultivées en culture hydroponique.

Tableau 133 : Modulation des expressions, mesurées en PCR en temps réel, des gènes de CP, AP, APXc, APXc, HSP70, GSHS, GST, GR, PCS et PLD α dans les racines, tiges et feuilles de *Lathyrus sativus* cultivés en présence de 0.5 mM Pb(NO₃)₂ par rapport aux témoins

Tableau 14 : Longueur maximale des racines et tiges de *Lathyrus sativus* cultivées dans du milieu Hoagland (1/10) sans phosphate additionné ou non de Pb(NO₃)₂.

Tableau 15 : Indices de tolérance (%) des plantes de *Lathyrus sativus* cultivées dans du milieu

Hoagland (1/10) sans phosphate additionné ou non de Pb et d'EDTA.

Tableau 16 : Contenu relatif en eau dans les feuilles de *Lathyrus sativus* cultivées dans du milieu Hoagland (1/10) sans phosphate additionné ou non de Pb et d'EDTA.

Tableau 17 : Pourcentage d'identité entre la séquence nucléotidique partielle de 721 pb d'un ADNc de cystéine protéase putative de feuilles de *Lathyrus sativus* et les séquences correspondantes d'ARNm d'autres espèces végétales.

Tableau 18 : Pourcentage d'identité entre la séquence nucléotidique partielle de la région 5' d'un ADNc de cystéine protéase putative de feuilles de *Lathyrus sativus* et les séquences correspondantes d'ARNm d'autres espèces végétales.

Tableau 19 : Pourcentage d'identité entre la séquence nucléotidique partielle de la région 3' d'un ADNc de cystéine protéase putative de feuilles de *Lathyrus sativus* et les séquences correspondantes d'ARNm d'autres espèces végétales.

Tableau 20 : Pourcentage d'identité entre la séquence nucléotidique *LsCPI* de cystéine protéase de *Lathyrus sativus* et les séquences d'ARNm d'autres espèces végétales.

Tableau 21 : Pourcentage d'identité et de similarité entre la séquence protéique LsCPI de cystéine protéase de *Lathyrus sativus* et les séquences les plus proche d'autres espèces végétales.

Tableau 22 : Fréquence des différentes bases dans la séquence *LsCPI*.

Tableau 23 : Pourcentage d'identité et de similarité entre en acides aminés de LsGCN d'une protéine de type ABC de *Lathyrus sativus* et les séquences les plus proche d'autres espèces végétales.

PLANCHES

Planche I : Planche descriptive de *Lathyrus sativus* L. : tige, fleur, gousse et graine.

Planche II : *Lathyrus sativus* lignée locale 'Bangladesh' et 'Raipur'.

Planche III : Fleurs de *Lathyrus sativus* lignées 'Raipur' et 'Bangladesh'.

Planche IV : Gousses de *Lathyrus sativus* lignées 'Raipur' et 'Bangladesh'.

Planche V : Plantes de *Lathyrus sativus* après 36 jours de culture.

Planche VI : Effets de la contrainte hydrique sur les feuilles de la lignée 'Raipur' et 'Bangladesh' de *Lathyrus sativus* 29 jours après la suspension d'arrosage.

Planche VII : Système utilisé pour la culture hydroponique.

Planche VIII : Morphologie des plantes de *Lathyrus sativus* L. lignée 'Bangladesh' après 4 jours de culture hydroponique dans les différents milieux de culture.

Planche IX : Morphologie des plantes de *Lathyrus sativus* L. lignée 'Bangladesh' après 7 jours de culture hydroponique dans les différents milieux de culture.

Planche X : Morphologie des plantes de *Lathyrus sativus* L. lignée 'Bangladesh' après 18 jours de culture hydroponique dans les différents milieux de culture.

Planche XI : Morphologie des plantes de *Lathyrus sativus* L. lignée 'Raipur' après 4 jours de culture hydroponique dans les différents milieux de culture.

Planche XII : Morphologie des plantes de *Lathyrus sativus* L. lignée 'Raipur' après 4 jours de culture hydroponique dans les différents milieux de culture.

Planche XIII : Morphologie des plantes de *Lathyrus sativus* L. lignée 'Raipur' après 18 jours de culture hydroponique dans les différents milieux de culture.

Planche XIV : Observation au microscope électronique à balayage d'une feuille de *Lathyrus sativus* lignée 'Bangladesh'.

Planche XV : Observation au microscope électronique à balayage d'un stomate et des cirres présents sur une feuille de *Lathyrus sativus* lignée 'Bangladesh'.

Planche XVI : Observation au microscope électronique à balayage d'une feuille de *Lathyrus sativus* lignée 'Raipur'.

Planche XVII : Observation au microscope électronique à balayage d'un stomate et des cirres présents sur une feuille de *Lathyrus sativus* lignée 'Raipur'.

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 : Maria Helena Cruz de Carvalho, Judicaëlle Brunet, Jérémie Bazin, Ilse Kranner, Agnès d'Arcy-Lameta, Yasmine Zuily-Fodil and Dominique Contour-Ansel, (Homo)glutathione synthetase expression is related to drought-tolerance in cowpea, soumis dans PPB.

Annexe 2 : Marqueurs de taille.

Annexe 3 : Détails sur le vecteur de clonage plasmidique pGEM-TEasy et son mode de fonctionnement

Annexe 4 : Milieux de culture bactérien

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE.....	1
PARTIE 1 : ETAT DES CONNAISSANCES	3
1. <i>Pollutions par les métaux lourds : le cas du plomb.....</i>	4
1.1. Caractéristiques du plomb.....	4
1.2. Origines des pollutions par le plomb	5
1.3. Disponibilité du plomb dans le sol.....	7
1.4. Effets toxiques du plomb sur les êtres vivants	7
2. <i>Dépollution des sols pollués par le plomb.....</i>	8
2.1. Les différentes techniques de dépollution des sols	8
2.2. La phytoremédiation	9
2.2.1. Les techniques de phytoremédiation utilisées en cas de pollution par le plomb....	9
2.2.2. Avantages et limites de l'utilisation des plantes phytoremédiatrices.....	11
2.2.3. Caractéristiques des plantes accumulatrices et hyperaccumulatrices.....	11
2.3. Les systèmes de culture utilisés pour l'étude de l'absorption et de l'accumulation du plomb par les plantes.....	14
3. <i>Les mécanismes d'absorption et d'accumulation du plomb</i>	14
3.1. Absorption et transport des ions Pb²⁺	14
3.1.1. Les chélateurs externes	15
3.1.2. Les chélateurs internes.....	16
3.2. Les transports transmembranaires.....	19
3.2.1. Les transporteurs de la membrane plasmique	20
3.2.2. Transporteurs de la membrane plasmique et du tonoplaste	23
3.2.3. Autres transporteurs du tonoplaste : les antiports cation/H⁺	26
4. <i>Les mécanismes de tolérance des plantes au plomb.....</i>	28
4.1. Effets du plomb sur la plante.....	28
4.2. Stratégies développées par les végétaux pour limiter les effets délétères du plomb	30
4.2.1. La stratégie d'évitement	30
4.2.2. La protection et la tolérance vis à vis des métaux lourds	31
5. <i>Lathyrus sativus L.</i>	35
5.1. Description	35
5.1.1. Classification botanique et origine.....	35
5.1.2. Morphologie.....	36

5.2.	Composition du <i>Lathyrus sativus</i> L.	37
5.2.1.	Valeur nutritive	37
5.2.2.	Les protéines toxiques et anti-nutritionnelles	37
5.2.3.	Fixation de l'azote	38
5.3.	Les capacités de résistance à la sécheresse du <i>Lathyrus sativus</i> L.	38
5.4.	Le <i>Lathyrus sativus</i> et les métaux lourds.....	38
PARTIE 2 : MATERIELS ET METHODES		40
1.	<i>Matériel végétal</i>	41
1.1.	Culture du <i>Lathyrus sativus</i> L.....	41
1.1.1.	Germination.....	41
1.1.2.	Conditions de culture	41
1.1.3.	Précautions adoptées relatives au plomb	43
1.1.4.	Milieus de culture et traitements.....	43
1.1.5.	Modélisation des formes chimiques	43
1.2.	Echantillonnage du matériel végétal.....	43
2.	<i>Analyses morphologiques et physiologiques</i>	44
2.1.	Croissance des racines et des tiges	44
2.2.	Indice de tolérance.....	44
2.3.	Contenu relatif en eau	45
3.	<i>Analyses moléculaires</i>	45
3.1.	Broyage des échantillons	45
3.2.	Extraction des ARN totaux.....	45
3.3.	Dessin des amorces pour l'isolement des ADNc d'intérêt.....	46
3.4.	Isolement des ADNc partiels et complets.....	47
3.4.1.	Transcription inverse.....	47
3.4.2.	Polymerase Chain Reaction (PCR).....	47
3.4.3.	Réaction de RT-PCR.....	48
3.4.4.	Purification des produits PCR (amplicons)	48
3.4.5.	Analyses des produits PCR (amplicons).....	48
3.5.	Amplification de l'extrémité 5' et 3' de l'ADN complémentaire.....	49
3.5.1.	Amplification de l'extrémité 5' de l'ADNc.....	49
3.5.2.	Amplification de l'extrémité 3' de l'ADNc.....	51
3.6.	Clonage des produits d'amplification	53
3.6.1.	Ligation de produits d'amplification PCR dans un vecteur de clonage plasmidique	53

3.6.2.	Préparation des bactéries compétentes pour la transformation	53
3.6.3.	Transformation de bactéries compétentes par choc thermique	53
3.6.4.	Préparation de l'ADN plasmidique	54
3.6.5.	Séquençage d'ADN.....	54
3.6.6.	Analyse des séquences nucléotidiques	54
3.7.	Etudes de l'expression des gènes d'intérêt par les techniques de PCR semi quantitative et quantitative (PCR en temps réel ou qPCR).....	55
3.7.1.	Préparations faites avant les réactions d'amplification	55
3.7.2.	Choix du gène de référence.....	55
3.7.3.	Optimisation des réactions de PCR semi-quantitative.....	55
3.7.4.	La réaction de PCR en temps réel	56
4.	<i>Analyse des éléments chimiques contenus dans les tissus de plantes de Lathyrus sativus...</i>	57
4.1.	Minéralisation des tissus végétaux	57
4.1.1.	Minéralisation sous pression et par chauffage.....	57
4.1.2.	Minéralisation par chauffage	57
4.2.	Analyses élémentaires quantitatives	58
5.	<i>Microscopie électronique à balayage</i>	58
PARTIE 3 : RESULTATS.....		59
<i>Chapitre I : Mise au point d'un nouveau système expérimental pour la culture hydroponique de Lathyrus sativus L.</i>		<i>60</i>
1.	Introduction	61
2.	Mise au point du protocole de germination des graines de <i>Lathyrus sativus</i>	62
3.	Phénologie du <i>Lathyrus sativus</i> et ses réponses à la contrainte hydrique	62
3.1.	Conditions expérimentales	62
3.1.1.	Conditions de culture du <i>Lathyrus sativus</i>	62
3.1.2.	Mesure du potentiel hydrique foliaire	63
3.1.3.	Induction du déficit hydrique	64
3.1.4.	Prélèvement des échantillons	64
3.2.	Résultats	65
3.2.1.	Potentiel hydrique foliaire de base (Ψ_w) des plantes de <i>Lathyrus sativus</i> L. lignées 'Bangladesh' et 'Raipur' témoins et soumises à la sécheresse.....	65
3.2.2.	Morphologie et cycle de développement des plantes témoins lignées 'Bangladesh' et 'Raipur'	66
3.2.3.	Phénologie des deux lignées de <i>Lathyrus sativus</i> L. ('Bangladesh' et 'Raipur') en réponse à la contrainte hydrique	67

3.3. Discussion.....	69
4. Mises au point de la culture hydroponique	70
4.1. Les milieux de culture	70
4.2. Résultats : Développement des plantes en fonction des milieux de culture	71
4.2.1. Croissance et morphologie des plantes de <i>Lathyrus sativus</i> de la lignée ‘Bangladesh’	71
4.2.2. Croissance et morphologie des plantes de <i>Lathyrus sativus</i> de la lignée ‘Raipur’, lors de la culture hydroponique	79
4.2.3. Etude physiologique des deux lignées de <i>Lathyrus sativus</i> cultivées en hydroponie	85
4.3. Discussion.....	86
5. Etude ultrastructurale des feuilles de <i>Lathyrus sativus</i>	87
6. Mise au point des systèmes de culture en présence de plomb	90
 <i>Chapitre II : Article n°1 Etude de l’accumulation de plomb par le système racinaire des plantes de Lathyrus sativus L.</i>	92
1. Expérimentation.....	93
2. Discussion.....	94
 <i>Chapitre III : article n°2 : Réponse induite dans des plantes de Lathyrus sativus L. par l’accumulation de plomb dans les racines</i>	102
1. Expérimentation.....	104
2. Discussion.....	104
 <i>Chapitre IV : Article n°3 : Etude de l’effet de l’EDTA (chélateur) sur l’accumulation de plomb lors d’une exposition longue (14 jours) chez le Lathyrus lignée ‘Bangladesh’</i>	129
1. Expérimentation.....	131
2. Principaux résultats	132
3. Discussion.....	138
 <i>Chapitre V : Projet d’article n°4 : Caractérisation d’un ADNc complet de cystéine protéase isolé de feuilles de Lathyrus sativus L.</i>	141
1. Introduction.....	142
2. Isolement d’un l’ADNc complet codant une cystéine protéase putative chez <i>Lathyrus sativus</i>	143
2.1. Isolement d’une région de l’ADNc d’une cystéine protéase chez <i>Lathyrus sativus</i>	143
2.2. Isolement de la région 5’ de l’ADNc <i>LsCP</i> de <i>Lathyrus sativus</i> codant pour une cystéine protéase putative	144

2.3.	Isolement de la région 3' de l'ADNc <i>LsCP</i> de <i>Lathyrus sativus</i> codant pour une cystéine protéase putative	145
2.4.	Assemblage de trois fragments d'ADNc de cystéine protéase putative de feuilles de <i>Lathyrus sativus</i>	146
2.5.	Analyse structurale de l'ADNc complet <i>LsCPI</i>	150
3.	Caractéristiques de la séquence nucléotidique <i>LsCPI</i> codant une cystéine protéase putative chez <i>Lathyrus sativus</i>	152
3.1.	Détermination de séquences spécifiques	152
3.2.	Cartographie de restriction	152
3.3.	Analyse de la fréquence des bases	152
4.	Caractéristiques de la séquence protéique <i>LsCPI</i> de cystéine protéase de <i>Lathyrus sativus</i>	153
4.1.	Structure générale de la <i>LsCPI</i>	153
4.2.	Recherche d'un peptide signal	154
4.3.	Recherche des sites de glycosylation et de phosphorylation	154
4.4.	Recherche d'un peptide de transit chloroplastique	155
5.	Discussion	155
	<i>Chapitre VI : Etude préliminaire : Isolement d'un ADNc partiel codant une protéine de type ABC et ses réponses chez des plantes de Lathyrus sativus L. exposées au plomb</i>	157
1.	Introduction	158
2.	Isolement d'un ADNc partiel correspondant une partie de la séquence d'une protéine de type ABC	159
3.	Expression du gène codant pour une protéine GCN	160
3.1.	Expérimentation	160
3.2.	Résultats	161
3.3.	Discussion	161
	PARTIE 4 : DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES	163
	REFERENCES	175
	ANNEXES	200

INTRODUCTION GENERALE

Un des problèmes majeurs en environnement est la contamination de l'atmosphère, des eaux et des sols par de nombreux éléments et composés toxiques comme le plomb. Sur le territoire français uniquement, 751 sites contaminés par le plomb ont été recensés en 2007 (source BASOL <http://basol.ecologie.gouv.fr/>). Ces contaminations découlent, dans leur immense majorité, des activités humaines. L'exploitation de divers types de gisements en sous-sol aboutit à l'accumulation de plomb en surface. A ceci s'ajoute la pollution due aux rejets industriels atmosphériques ou solides contenant du plomb. Ainsi les sols, l'air et les eaux sont concernés. Chez l'homme, l'intoxication par le plomb provoque le saturnisme, une maladie aux conséquences graves.

En 2007, le gouvernement a mis en place un texte ministériel relatif aux modalités de gestion et de réaménagement des sites pollués, qui précise comment identifier et gérer un site (potentiellement) pollué.

Différentes techniques de décontamination des sols sont disponibles, les plus couramment utilisées relèvent de la physico-chimie. Elles permettent de traiter le sol pollué sur site ou *ex situ* grâce à des techniques faisant intervenir des produits chimiques, comme des chélateurs et des méthodes physiques telles que le pompage ou le chauffage. Depuis peu, des techniques basées sur l'emploi de microorganismes ou de plantes ont été mises au point pour la dépollution des sols et des eaux. Ces techniques de « bioremédiation » sont moins invasives et moins coûteuses que les techniques physico-chimiques mais elles impliquent l'identification des espèces bactériennes ou végétales aux capacités particulières. En ce qui concerne les plantes il s'agit de « phytoremédiation ». Pour être utilisées dans ce cadre, les plantes doivent tolérer la présence du contaminant présent parfois en concentration élevée. De plus, pour certaines applications, elles doivent être capables d'accumuler le polluant dans leurs racines ou dans leurs parties aériennes.

Des telles espèces végétales sont connues pour certains éléments métalliques toxiques tels que le nickel ou le cadmium. En ce qui concerne le plomb, peu d'espèces tolérant et/ou accumulant cet élément ont été identifiées.

Lathyrus sativus est une Fabacée (légumineuse) ubiquiste, cultivée de nos jours principalement en Inde, au Bangladesh et en Ethiopie. A moindre échelle, sa culture se fait

également sur le pourtour méditerranéen. Cette espèce végétale présente de formidables capacités de résistance à de nombreuses contraintes abiotiques telles qu'une forte salinité du sol, l'inondation et la sécheresse. En conséquence, ce travail a été mené afin d'une part d'étudier divers aspects des réponses de cette espèce végétale à la présence de plomb et d'autre part de déterminer si elle présente le potentiel suffisant pour être incluse dans des systèmes phytoremédiateurs.

PARTIE 1 :
ÉTAT DES CONNAISSANCES

1. Pollutions par les métaux lourds : le cas du plomb

Actuellement, dans l'environnement une importante gamme de contaminants existe, tels que les métaux lourds, les substances combustibles, les déchets dangereux, les explosifs et les produits pétroliers. Ils se divisent en deux catégories : les composés organiques et inorganiques.

Les contaminants inorganiques majeurs sont les métaux lourds. Ils représentent un problème différent des contaminants organiques : contrairement à ces derniers, ils ne peuvent pas être dégradés par les microorganismes, ils doivent être « immobilisés » ou extraits.

Il existe plusieurs définitions du terme « métal lourd », ou élément trace métallique (ETM) : il s'agit en général d'éléments métalliques naturels, caractérisés par une masse volumique élevée, supérieure à 5 g/cm^3 (Morlot, 1996). Quarante et un métaux correspondent à cette définition générale. D'autres définitions existent, les métaux lourds peuvent concerner les éléments métalliques compris entre le cuivre et le plomb dans la classification périodique des éléments (excluant alors le fer, le chrome) ; il peut aussi s'agir de tous les éléments métalliques à partir de la quatrième période de la classification des éléments.

Cependant l'appellation « métal lourd » est une appellation courante qui n'a ni fondement scientifique, ni application juridique (rapport d'information au Sénat français N° 261, déposé le 5 avril 2001 : <http://www.senat.fr/rap/100-261/100-261.html>).

En se basant sur la première définition, les métaux lourds les plus fréquents sont le cadmium (Cd), le chrome (Cr), le cuivre (Cu), le plomb (Pb), l'arsenic (As), le nickel (Ni) et le zinc (Zn). Ils contaminent de nombreux sites à travers le monde. Ils proviennent de la combustion des charbons, pétroles, ordures ménagères, de l'épandage de boues sur les sols agricoles et de certains procédés industriels (métallurgie des métaux non ferreux notamment) (Chaney *et al.*, 1997).

1.1. Caractéristiques du plomb

Le plomb est un élément chimique classé dans les « métaux pauvres » : ayant un point de fusion bas ($600,61 \text{ °K}$). Il appartient à la catégorie des métaux lourds car sa densité (ou masse volumique) est de $11,3 \text{ g.cm}^{-3}$. Sa masse atomique est de $207,2 \text{ u}$ (unité de masse atomique), son rayon atomique de 180 pm et son volume molaire de $18,26 \cdot 10^{-6} \text{ m}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$. Il existe sous deux états d'oxydation : 2 et 4. Sept isotopes du Pb (^{202}Pb , ^{204}Pb , ^{205}Pb , ^{206}Pb , ^{207}Pb , ^{208}Pb ,

^{210}Pb) existent mais seulement quatre se retrouvent à l'état naturel : ^{204}Pb (1,4 %), ^{206}Pb (26,1 %), ^{207}Pb (22,1 %), ^{208}Pb (52,4 %).

1.2. Origines des pollutions par le plomb

Les pollutions de l'eau, de l'air et du sol peuvent être dues à des sources de plomb (Pb) naturelles ou anthropiques.

A l'état naturel, le Pb se retrouve dans l'environnement sous forme de galène (sulfure de Pb), de cérusite (carbonate de Pb), et d'anglésite (sulfate de Pb). La forme la plus abondante est la galène et la cérusite et l'anglésite apparaissent lors de l'oxydation de la galène. Des gisements de Pb se retrouvent à travers le monde et notamment en France, ce minéral étant toxique, il peut participer à la pollution des sols dans ces conditions (<http://www.mineralinfo.org/Substance/Plomb/Plomb.htm>).

Certaines activités humaines induisent une contamination par le Pb de l'atmosphère, de l'eau et du sol (<http://chimie.ineris.fr/fr/lespdf/metodexpchron/plomb2.pdf>). La pollution de l'air par le Pb a considérablement diminué depuis l'arrêt des essences plombées, cependant elle atteignait néanmoins 387 tonnes en 2002 (Source CITEPA traitement OPECST). A ce jour, les principales sources de contaminations en Pb sont les rejets anthropiques. Ils proviennent principalement des industries qui extraient et purifient le Pb naturel et qui recyclent les composants contenant du Pb comme les batteries et leurs retombées atmosphériques contaminent les sols. A ceci s'ajoute les déchets industriels et la détérioration des peintures extérieures à base de Pb. Des rejets provenant des industries sidérurgiques ainsi que les réseaux de canalisations de distribution d'eau anciennes, contenant du Pb, contaminent les eaux. Dans les sols des concentrations en Pb supérieures à 110 mg par kg de sol traduisent l'existence d'une source polluante à proximité (Juste *et al.*, 1995) (Tableau 1).

Tableau 14 : Concentration de Pb dans le sol de différents sites contaminés ou non par des métaux lourds.

Nom du site	Localisation	Etat du site	Quantité totale de Pb dans le sol µg Pb/g de masse sèche de sol	Référence
Felixstowe	Suffolk, UK	site non contaminé	26	(Ye <i>et al.</i> , 1997)
Wisbech	Norfolk, UK	site non contaminé	55	(Ye <i>et al.</i> , 1997)
Mai Po World Wildlife Fund Reserve	Hong Kong	site non contaminé	32	(Ye <i>et al.</i> , 1997)
site E	districte de Sai Yok, province de Kanchanaburi, Thaïlande	site non contaminé	55.3	(Tanhan <i>et al.</i> , 2007)
sol agricole	faubourg de Hangzhou, province de Zhejiang, Chine	site considéré comme non contaminé par l'auteur	187.2	(Islam <i>et al.</i> , 2007)
Sheffield	South Yorkshire, UK	site contaminé par des eaux de drainage enrichis en métaux provenant d'usines d'usines de couverts de cuisine	434	(Ye <i>et al.</i> , 1997)
Cavendish Mill	Derbyshire, UK	site contaminé par des eaux de drainage enrichis en métaux provenant "fuorspar tailings dam"	18894	(Ye <i>et al.</i> , 1997)
Shaoguan	Guangdong Province, PR Chine	site contaminé par les effluents provenant d'une mine de Zn et de Pb	5686	(Ye <i>et al.</i> , 1997)
Plombière	Belgique	site contaminé par le travail d'une ancienne mine de Pb	10277	(Ye <i>et al.</i> , 1997)
Bo Ngam	districte de Thongphapum, province de Kanchanaburi, Thaïlande	site contaminé par une mine de Pb	de 39979.3 à 164332.7	(Tanhan <i>et al.</i> , 2007)
site minier	province de Zhejiang, Chine	site contaminé par une mine de Pb et de Cu	10167.0	(Islam <i>et al.</i> , 2007)

1.3. Disponibilité du plomb dans le sol

Dans le sol, le Pb peut se retrouver sous forme ionique, dissout, ou lié plus ou moins fortement aux particules (Raskin et Ensley, 2000). L'accumulation de Pb, provenant des retombées atmosphériques, ou de déchets contaminés déposés sur le sol, se fait principalement dans les horizons de surface (Sterckeman *et al.*, 2000) et plus précisément dans les horizons riches en matières organiques. Les teneurs en Pb diminuent, ensuite, plus en profondeur (de Abreu *et al.*, 1998). Ceci s'explique par le fait que le Pb est peu mobile. Etant principalement associé aux argiles, aux oxydes, aux hydroxydes de fer et d'aluminium et à la matière organique, il n'est mobile que lorsqu'il forme des complexes organiques solubles et/ou que le sol a dépassé sa capacité de sorption pour le Pb (Morlot, 1996; Raskin et Ensley, 2000).

Etant donné que le Pb se lie facilement aux particules du sol, les quantités de Pb accumulées dans les sols diffèrent selon la composition, notamment en argile, sable et matière organiques du sol. Le pH du sol est également un facteur déterminant puisque une variation de pH modifie les liaisons du Pb aux différents éléments présent dans le sol. Par exemple, dans un sol où le pH est compris entre 5,5 et 7,5 la solubilité du Pb est contrôlée par les phosphates et les carbonates avec lesquels il précipite, et très peu de Pb est libre (Pb^{2+}). Plus le pH est acide moins ces liaisons se font donc plus le Pb est disponible et plus le pH est basique plus le Pb est oxydé.

Par ailleurs, si le Pb est solubilisé, il peut être lessivé jusqu'à la nappe phréatique ou être absorbé par les plantes (Bliefert et Perraud, 2001).

1.4. Effets toxiques du plomb sur les êtres vivants

Les métaux lourds ont des effets toxiques sur tous les organismes vivants (humains, animaux, végétaux, microorganismes). Les métaux qui contaminent les sols et les aliments peuvent s'accumuler dans ces organismes, tout au long de la chaîne alimentaire. Une étude de la Direction Générale de la Santé réalisée en France en 1992 a mis en évidence chez l'Homme un apport moyen par les aliments de 48 μ g de Pb par jour (<http://chimie.ineris.fr/fr/lespdf/metodexpchron/plomb2.pdf>). En plus de cela, 0.1 ng de Pb/m³ d'air passent par la respiration (IUCLID, 1996; HSDB, 2000).

Chez l'homme, l'intoxication par le Pb induit le saturnisme. Cette maladie peut entraîner une néphropathie chronique, l'atteinte rénale étant en général associée à d'autres manifestations : digestives, neurologiques, hématologiques. La législation du travail et la surveillance des

populations exposées a considérablement réduit l'incidence du saturnisme professionnel. De rares cas sont mentionnés chez les peintres, plombiers, travailleurs sur batteries d'automobile. Le saturnisme non professionnel a comme source l'usage d'eau circulant dans de vieilles canalisations ou l'emploi de récipients encore recouverts de Pb, ou bien un environnement pollué dans des zones défavorisées (Fels *et al.*, 1998; Lin *et al.*, 1999).

En France, des normes existent afin de limiter les cas d'intoxication. La quantité de Pb dans les eaux de consommation ne doit pas dépasser 10 µg/l (Décret n°2001-1220), dans l'air la limite est de 0.5 µg/m³ en concentration moyenne annuelle mais avec un objectif de 0.25 µg/m³ (Décret n°2002-213). La norme « sol » n'est pas clairement définie : elle correspond à l'arrêté ministériel du 8 janvier 1998 pris pour le contrôle de l'épandage des boues de station d'épuration ou des boues de curage. Elle est de 100 mg de Pb par kg de terre (http://www.nord-nature.org/environnement/pollutions/sols/metaleurop_3.htm).

2. Dépollution des sols pollués par le plomb

La dépollution des sols contenant du Pb vise à la diminution de sa dispersion afin de limiter les contaminations. Cette objectif est soutenu par le Ministère de l'Écologie, de l'Énergie, du Développement durable et de l'Aménagement du territoire qui a émis à ce propos un texte relatif à la prévention de la pollution des sols, à la gestion et au réaménagement des sols pollués (note ministérielle du 8 Février 2007 ; <http://www.sites-pollues.ecologie.gouv.fr/Approche.asp>).

2.1. Les différentes techniques de dépollution des sols

Les techniques les plus utilisées pour décontaminer les sols pollués par les métaux lourds sont les techniques physico-chimiques (<http://www.total.com/fr/>). Elles se font *in situ* ou *ex situ*. Dans le premier cas, elles consistent en la fixation des métaux dans le sol, à l'aide de liants, tels que du ciment ou de la chaux, ou en leur extraction. Il existe plusieurs types d'extraction des métaux dont l'extraction électrique pour laquelle des électrodes poreuses sont implantées dans le sol et le courant généré fait migrer les ions métalliques vers la charge opposée à la leur, les polluants sont ensuite récupérés par pompage. L'extraction utilisant une solution acide, afin de solubiliser les éléments métalliques, est aussi possible. Si les sols ne peuvent pas être traités sur le site ils sont excavés et par la suite soit stockés dans des décharges soit

traités, par exemple par un lavage sous haute pression d'eau ou par lavage avec de l'eau additionnée de tensioactifs (Paff et Bosilovich, 1995; Chandra Sekhar *et al.*, 2005).

En parallèle, il existe des processus biologiques pour dépolluer les sols. Même s'ils sont moins utilisés, il est possible de décontaminer un sol grâce à des microorganismes (Berthelin, 1983; Gadd, 1990) ou à des plantes (Yang *et al.*, 2005).

2.2. La phytoremédiation

La « phytoremédiation » est un cas particulier de la « bioremédiation » qui consiste en l'emploi d'êtres vivants pour réhabiliter des sols ou des eaux polluées.

Le principe de la phytoremédiation est d'utiliser des plantes pour dépolluer des sites (sols, eaux) contaminés par divers polluants (organiques et inorganiques).

L'idée est née au 19^{ème} siècle, lorsque Baumann (Baumann, 1885) a identifié pour la première fois deux espèces végétales, *Thlaspi caerulescens* and *Viola calaminaria*, comme étant capables d'accumuler de fortes quantités de Zn dans leurs feuilles. Ensuite, en 1935, Byers étudia l'accumulation du sélénium chez *Astragalus* spp. Dix ans plus tard, Minguzzi et Vergnano (1948) identifièrent des plantes capables d'accumuler jusqu'à 1 % (m/m) de Ni dans leurs parties aériennes. Aujourd'hui plus de 400 plantes sont connues pour leur capacité d'accumulation des métaux (Baker *et al.*, 2000).

2.2.1. Les techniques de phytoremédiation utilisées en cas de pollution par le plomb

Chez les plantes, il existe une variété de réponses à un environnement contaminé. Elles correspondent à une tolérance ou non et sont liées ou non à une capacité d'accumulation du métal (Clemens, 2006). Différentes technologies de décontamination basées chacune sur une réponse particulière ont pu être développées. Elles sont regroupées sous le nom de phytoremédiation et sont classées en cinq catégories : la phytodégradation, la phytoextraction, la phytostabilisation, la phytovolatilisation et la rhizofiltration. Toutes ces technologies sont non exclusives donc complémentaires (Yang *et al.*, 2005).

Dans le cas de la pollution par le Pb la technique envisageable pour les sols est la phytoextraction et pour les eaux, la rhizofiltration.

a. La phytoextraction

La phytoextraction, paraît la meilleure approche pour éliminer les contaminants du sol et les isoler sans détruire la structure et la fertilité du sol (Ghosh et Spingh, 2005; Pilon-Smits, 2005). Les espèces végétales concernées absorbent, concentrent et stockent les métaux toxiques du sol contaminé dans leurs organes aériens (tiges, feuilles, etc.) (Henry, 2000; Gisbert *et al.*, 2003; Eapen et D'Souza, 2005). Les plantes le plus souvent utilisées appartiennent aux familles des *Brassicaceae*, des *Fabaceae* ou des *Brassicaceae*.

Une décontamination par la phytoextraction nécessite une répétition de cycles de culture avec récolte de la biomasse à la fin de chaque cycle. Ces cycles se succèdent jusqu'à ce que la concentration de métal dans le sol atteigne une valeur acceptable, ce qui conduit à l'accumulation de biomasse végétale potentiellement dangereuse. Celle-ci doit être stockée de manière à ne présenter aucun risque de contamination pour l'environnement (Blaylock et Huang, 2000). La biomasse peut être traitée par compostage, par compaction, par combustion, par gazéification ou par pyrolyse (Kumar *et al.*, 1995; Raskin *et al.*, 1997; Bridgwater *et al.*, 1999; Blaylock et Huang, 2000; Garbisu et Alkorta, 2001). Les processus de combustion et de gazéification impliquent d'importantes sources d'énergie thermique et électrique (Ghosh et Spingh, 2005).

b. La rhizofiltration

Certaines espèces terrestres ou aquatiques absorbent, concentrent et stockent les contaminants des eaux polluées (Ghosh et Spingh, 2005; Pilon-Smits, 2005), mettant en jeu leurs systèmes racinaires d'où le terme de rhizofiltration. La rhizofiltration, est utilisée pour le traitement des rejets industriels et des effluents agricoles. Elle est particulièrement efficace pour l'élimination du Pb, Cd, Cu, Ni, Zn et Cr, éléments retenus dans les racines (Chaudhry *et al.*, 1998). Cette méthode présente l'avantage de pouvoir être appliquée *in-situ* ou *ex-situ* avec des espèces végétales pas nécessairement hyperaccumulatrices, telles que le tournesol, la moutarde indienne, le tabac, le seigle, les épinards et le maïs (Raskin et Ensley, 2000). Le joncs, le roseau et l'iris sont couramment utilisés dans les bassins filtrants. Lorsque les racines de ces plantes arrivent à leur capacité maximale de rétention, elles sont récoltées. De même que pour la biomasse obtenue lors de la phytoextraction, les racines des plantes rhizofiltratrices sont traitées par des processus stricts.

2.2.2. Avantages et limites de l'utilisation des plantes phytoremédiatrices

La phytoremédiation est une « technologie verte » qui est aussi bien écologique qu'esthétique, lorsqu'elle est convenablement implantée. Elle est de plus bien acceptée par le public. Sa mise en œuvre ne requiert pas d'équipements coûteux ou de personnel hautement spécialisé, et est relativement simple à mettre en œuvre. Son avantage majeur reste son faible coût par rapport aux méthodes classiques de décontamination des sols. Par exemple, le coût de dépollution d'un acre (4047 m²) de sol argilo-sableux contaminé sur 50 cm de profondeur est quatre à six fois plus faible avec des plantes que par excavation classique (Henry, 2000; Ghosh et Spingh, 2005).

En regard de ses nombreux avantages, la phytoremédiation ne présente que peu de limitations. Cependant l'efficacité de cette technique est limitée par la longueur des racines des plantes remédiatrices, et par le climat. Un climat défavorable limite la croissance des plantes, la production de biomasse et donc l'efficacité du système. De plus, la phytoremédiation fait intervenir des processus lents : plusieurs années sont nécessaires pour dépolluer un site de déchets dangereux et la contamination peut ne pas être totalement éliminée. Un autre inconvénient est que l'introduction d'espèces végétales non natives sur les sites de phytoremédiation peut affecter l'écosystème à long terme (Henry, 2000).

2.2.3. Caractéristiques des plantes accumulatrices et hyperaccumulatrices

Parmi les plantes accumulatrices certaines sont « hyperaccumulatrices ». Une plante est considérée comme hyperaccumulatrice quand elle peut stocker 0,1% (m/m) de Ni, de Co, de Cu ou de Pb, 1,0% de Zn et 0,01% de Cd (Baker et Brooks, 1989; Baker *et al.*, 2000). Plus de 400 espèces végétales ont été recensées comme étant hyperaccumulatrices, certaines appartenant aux familles des *Brassicaceae*, comme *Alyssum* spp, *Thlaspi* spp et *Brassica* spp, des *Violaceae*, comme *Viola* spp, des *Fabaceae*, comme *Astragalus* spp. Ces plantes sont connues pour absorber de fortes concentrations de métaux lourds et de radionucléides (Reeves et Baker, 2000).

Dans le cas particulier du plomb, les quantités de Pb accumulées par les plantes accumulatrices ou hyperaccumulatrices peuvent être regroupées, de manière non exhaustive, dans deux catégories en fonction du substrat, solide (Tableau 2) ou liquide (Tableau 3).

Tableau 15 : Quantité de Pb accumulée dans les différents organes de plantes cultivées sur un substrat solide; Pb extractible: fraction de Pb extractible avec du DTPA (diethylene triaminepenta acetic acid) considérée comme accessible pour les plantes. ND : non déterminé.

espèce végétale	famille	nature du substrat	quantité de Pb dans le milieu (mg de Pb / kg de sol sec)		durée du traitement	quantité de Pb accumulée (mg de Pb / kg de masse sèche)			Référence
			Pb total	Pb extractible (DTAP)		racines	tiges	feuilles	
<i>Typha latifolia</i> L.	<i>Typhaceae</i>	sol contaminé par des eaux de drainage enrichie en métaux	434	31	plantes échantillonnées directement sur le site	35	ND	4.7	(Ye <i>et al.</i> , 1997)
			18894	1558		3628	ND	32	
			5686	1007		1108	ND	40	
		mélange de sols contaminés artificiellement	8462	24	39 j	1047	248		
<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	<i>Fabaceae</i>	mélange 90% sol et 10% cendres		4.8	90 j	16.8	18.1	(Gupta <i>et al.</i> , 2007)	
		mélange 75% sol et 25% cendres		3.6		19.3	22.3		
<i>Chromolaena odorata</i> L.	<i>Asteraceae</i>	sol contaminé par une mine de Pb	39979.3	1938.4	plantes échantillonnées directement sur le site minier	774.7	220.5	(Tanhan <i>et al.</i> , 2007)	
			117728.4	2087.0		652.6	1100.8		
			56165.4	1980.2		1093.8	369.4		
			164332.7	2503.5		4238.0	1376.7		
<i>Elsholtzia argyi</i> (écotype issu d'un site minier)	<i>Lamiaceae</i>	sol contaminé par une mine de Pb et de Cu	10167.0	193.8		299.6	184.1	99.1	(Islam <i>et al.</i> , 2007)
<i>Thlaspi rotundifolium</i>	<i>Brassicaceae</i>	sol contaminé artificiellement	2500		4 sem	6350	79	(Huang <i>et al.</i> , 1996)	
<i>Thlaspi caerulescens</i>						5010	58		
<i>Triticum aestivum</i>						1890	120		
		100 µM			2.3	0.02	ND	0.2	
		1000 µM			10.4	0.08	ND	0.4	

Tableau 3 : Quantité de Pb accumulée dans les différents organes de plantes cultivées en culture hydroponique. ND : non déterminé, NA : non applicable.

espèce végétale	famille	quantité de Pb dans le milieu	forme du Pb ajouté	durée du traitement (jours)	renouvellement du milieu	quantité de Pb accumulée (mg de Pb / g de masse sèche)				Référence
						racines	tiges	feuilles	bulbes	
<i>Medicago sativa</i> L.	<i>Fabaceae</i>	200 µM	Pb(NO ₃) ₂	10	aucun	51.0	10.0	0.1	NA	(Lopez <i>et al.</i> , 2005)
<i>Typha latifolia</i> L.	<i>Typhaceae</i>	10 µg/ml	Pb(NO ₃) ₂	21	tous les 3 jours	108.0		0.5	NA	(Ye <i>et al.</i> , 1997)
		20 µg/ml				134.7	0.7	NA		
<i>Chromolaena odorata</i> L.	<i>Asteraceae</i>	5 mg/l	Pb(NO ₃) ₂	15	tous les 3 jours	10.1	0.3	0.2	NA	(Tanhan <i>et al.</i> , 2007)
		10 mg/l				60.6	1.7	0.1	NA	
<i>Elsholtzia argyi</i> (écotype issu d'un site minier)	<i>Lamiaceae</i>	50 µM	Pb(NO ₃) ₂	12	tous les 4 jours	≈ 30.0	≈ 1.0	≈ 0.2	NA	(Islam <i>et al.</i> , 2007)
		100 µM				≈ 29.0	≈ 1.2	≈ 0.3	NA	
		200 µM				≈ 42.0	≈ 1.7	≈ 0.3	NA	
<i>Elsholtzia argyi</i> (écotype issu sol agricole)	<i>Lamiaceae</i>	50 µM	Pb(NO ₃) ₂	12	tous les 4 jours	≈ 33.0	≈ 0.3	≈ 0.1	NA	(Islam <i>et al.</i> , 2007)
		100 µM				≈ 38.0	≈ 0.3	≈ 0.1	NA	
		200 µM				≈ 40.0	≈ 0.4	≈ 0.1	NA	
<i>Brassica juncea</i> L.	<i>Brassicaceae</i>	500 µM	Pb(NO ₃) ₂	3		138.0	ND	ND	NA	(Meyers <i>et al.</i> , 2008)
<i>Helianthus annuus</i> L.	<i>Asteraceae</i>	125 µM	Pb(NO ₃) ₂	6		21.0	ND	ND	NA	(Tandy <i>et al.</i> , 2006)
<i>Sedum alfredii</i>	<i>Crassulaceae</i>	200 µmol/l	Pb(NO ₃) ₂	21		≈ 7.8	≈ 2.7	≈ 0.5	NA	(Huang <i>et al.</i> , 2008)
		400 µmol/l				≈ 7.7	≈ 1.8	≈ 0.4	NA	
<i>Pisum sativum</i> L.	<i>Fabaceae</i>	1000 µM	Pb(NO ₃) ₂	4		50.0	2.0	0.9	NA	(Piechalak <i>et al.</i> , 2003)
<i>Ambrosia artemisiifolia</i> L.	<i>Asteraceae</i>	20 µM	Pb(NO ₃) ₂	14	flux continu de solution nutritive	4.7		0.09	NA	(Huang et Cunningham, 1996)
		50 µM				≈ 13.0	≈ 0.08	NA		
		100 µM				≈ 25.0	≈ 0.03	NA		
<i>Zea mays</i> L.	<i>Poaceae</i>	20 µM	Pb(NO ₃) ₂	14		2.3		0.4	NA	(Huang et Cunningham, 1996)
		50 µM				≈ 3.4	≈ 0.4	NA		
		100 µM				≈ 5.0	≈ 0.6	NA		
<i>Thlaspi rotundifolium</i>	<i>Brassicaceae</i>	20 µM	Pb(NO ₃) ₂	14		28.7		0.2	NA	(Huang et Cunningham, 1996)
<i>Thlaspi caerulescens</i>						26.2	0.06	NA		
<i>Triticum aestivum</i>						5.3	0.1	NA		
<i>Allium sativum</i> L.	<i>Alliaceae</i>	10 µM	Pb(NO ₃) ₂	20	tous les 5 jours	0.4	0.01	ND	0.004	(Liu <i>et al.</i> , 2008)

2.3. Les systèmes de culture utilisés pour l'étude de l'absorption et de l'accumulation du plomb par les plantes

La culture sur sol natif ou sur « substratum » (substrat à base de sol mais dont la structure et la composition sont modifiées), est celle qui se rapproche le plus d'un sol pollué. Cependant son utilisation est difficile car des analyses préalables sont indispensables afin de déterminer la concentration en Pb disponible pour les plantes, sachant que celles ci pourront en plus 'désorber' une partie du Pb lié aux composants du sol.

D'autres substrats existent comme la laine de roche, les gels d'agar, l'argile expansée (vermiculite, perlite). Dans le cas de l'étude de l'absorption par les plantes d'un métal lourd comme le Pb, ils ne sont pas adaptés car une partie des ions Pb s'adsorbent sur le substrat et sont indisponibles pour la plante, et donc la quantité de Pb disponible reste indéfinie.

Une autre possibilité est la culture hydroponique, en milieu nutritif liquide, qui permet de faire abstraction des interactions sol / Pb. De plus des logiciels permettent de modéliser les formes chimiques de chacun des éléments en solution. Cette technique permet des études préliminaires qui pourront ensuite être étendues aux cultures sur sol.

3. Les mécanismes d'absorption et d'accumulation du plomb

Le plomb n'est pas le métal lourd le plus étudié dans les interactions plantes / métaux lourds (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>). Ceci est notamment du au fait que ce métal a une forte capacité de liaison avec les particules du sol, il est donc plus difficilement extractible par les plantes, rendant le travail expérimental plus compliqué.

Il existe néanmoins chez les plantes des mécanismes d'absorption et d'accumulation du Pb dont certains ont été caractérisés.

3.1. Absorption et transport des ions Pb^{2+}

La mobilité des éléments minéraux est un facteur limitant si bien que les bactéries et les plantes exsudent des chélateurs (externes) afin de mobiliser ces éléments et les rendre disponibles. Ce système naturel est copié en phytoremédiation, notamment en phytoaccumulation et rhizofiltration, par l'ajout de composés chimiques. Dans le cas où l'ion métallique entre, libre, dans la plante, il est pris en charge par des molécules qui s'apparentent à des chélateurs internes.

3.1.1. Les chélateurs externes

Certains chélateurs sont naturellement synthétisés par la plante en réponse aux déficiences en nutriments. C'est le cas des graminées qui sécrètent des phytosidérophores comme les acides mugénique et avénique lors d'une culture dans un sol pauvre en fer (Fan *et al.*, 1993; Kinnersely, 1993).

Ainsi, de nombreux chélateurs artificiels ont été testés pour leur capacité à lier le Pb : l'EDTA (ethylene diamine tetraacetic acid) (Fig. 1), l'HEDTA (hydroxyethylene diamine tetraacetic acid), le DTPA (diethylene triamino pentaacetic acid), le CDTA (trans-1,2-cyclohexylene dinitrilo tetraacetic acid), l'EGTA (ethylene bis[oxyethylenetrinitrilo] tetraacetic acid), l'EDDHA (ethylenediamine-N,N0bis(o-hydroxyphenyl)acetic acid), l'HEIDA (N-(2 hydroxyethyl)iminodiacetic acid) et l'HBED (N,N0-di(2-hydroxybenzyl) ethylene diamine N,N0-diacetic acid). Tous ces chélateurs n'ont pas la même efficacité sur la quantité de Pb absorbée par la plante. Certains peuvent même avoir l'effet inverse (Evangelou *et al.*, 2007). L'EDTA ayant une haute affinité pour le Pb ($\log K = 17.88$ pour PbEDTA^{2-}), il est le chélateur le plus étudié (Wu *et al.*, 1999).

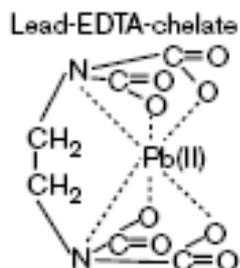


Figure 3 : Forme chimique du complexe Pb-EDTA (Meagher, 2000).

L'EDTA, formant un complexe avec le Pb, induit une augmentation de l'absorption (Tableau 4) et de la translocation du plomb vers les parties aériennes de la plante (Blaylock *et al.*, 1997; Jarvis et Leung, 2002). A ceci s'ajoute parfois une diminution des effets toxiques, soit une inhibition moins forte de la croissance et une limitation des zones nécrosées. C'est le cas par exemple de la moutarde indienne qui, cultivée pendant 48h dans un milieu contenant 0.5 mM de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ et de 0.5 mM d'EDTA, ne présente pas de signes apparents de toxicité contrairement aux mêmes plantes cultivées sans EDTA, qui, elles, présentent des nécroses (Vassil *et al.*, 1998).

Une mole d'EDTA se liant à une mole de Pb, la quantité d'EDTA ajoutée dans un milieu de culture hydroponique doit être équimolaire à celle du Pb, afin que la totalité du Pb et de

l'EDTA forme des complexes. En effet l'EDTA libre se transforme en H-EDTA, composé toxique pour la plante (Vassil *et al.*, 1998; Wu *et al.*, 1999; Tandy *et al.*, 2004; Tandy *et al.*, 2006).

Tableau 4 : Effet de l'ajout d'EDTA sur la disponibilité du Pb dans le sol et sur son absorption (Evangelou *et al.*, 2007).

Quantité d'EDTA ajoutée (mmol.kg ⁻¹)	Augmentation du Pb disponible pour la plante dans le sol	Augmentation du Pb absorbé par la plante	Espèce végétale	Références
3	≈ 23 fois	26 fois	<i>Brassica juncea</i>	(Epstein <i>et al.</i> , 1999)
5	496 fois	27 fois	<i>Zea mays</i>	(Luo <i>et al.</i> , 2005)
		70 fois	<i>Phaseolus vulgaris</i>	
5	50 fois	15 fois	<i>Dianthus chinensis</i>	(Lai et Chen, 2005)
4 fois 10	3500 fois	59.7 fois	<i>Brassica rapa</i>	(Grcman <i>et al.</i> , 2003)
3	5.7 fois	2.8 fois	<i>Brassica juncea</i>	(Wu <i>et al.</i> , 2004)
1.39	315 fois	57.4 fois	<i>Zea mays</i>	(Huang <i>et al.</i> , 1997)
5	107 fois	48 fois	<i>Sinapis alba</i>	(Kos <i>et al.</i> , 2003)

Malgré les effets positifs induits par l'application d'un chélateur artificiel, cet ajout dans le sol présente des inconvénients. En effet puisque l'EDTA augmente la disponibilité du Pb donc sa mobilité, la contamination peut se propager en profondeur et atteindre la nappe phréatique. De plus, l'EDTA libre est peu bio-dégradable. Il subsiste longtemps dans les sols, et peut devenir toxique pour les végétaux et les microorganismes. Afin de diminuer cet effet, des chélateurs facilement bio-dégradables comme le NTA (nitrilotriacetate) et l'EDDS (S,S-ethylene-diaminedisuccinic acid) ont été proposés ces dernières années, pour améliorer la phytoremédiation des sols contaminés par les métaux lourds (Kulli *et al.*, 1999; Kos et Lestan, 2003; Luo *et al.*, 2005; Meers *et al.*, 2005; Epelde *et al.*, 2008).

3.1.2. Les chélateurs internes

Lors de l'entrée du Pb sous forme d'ion libre dans la plante, il est pris en charge par des chélateurs produits par la plante tels que le glutathion, les métallothionéines, les phytochélatines, des acides organiques et des acides aminés ou par des molécules chaperonnes.

a. Le glutathion

Le glutathion (GSH ; γ -glutamyl-cysteinyl-glycine) est un tri-peptide synthétisé, dans le cytosol et les chloroplastes (Noctor et Foyer, 1998), à partir de molécules de cystéine et de glutamate par deux enzymes : l' γ -glutamylcystéine synthétase (γ -ECS) et la glutathion synthétase (GSHS) (Hell et Bergmann, 1988, 1990; Meister, 1995). Le GSH peut former des complexes avec les ions métalliques comme le Pb ou le Cd (Reddy, 2005). Cette réaction de conjugaison se fait grâce à une enzyme la glutathion-S-transférase (GST) (Chasseaud, 1979; Peuke et Rennenberg, 2005). Dans le cas du Cd, il faut deux molécules de GSH pour un ion Cd^{2+} (Mendoza-Cózatl et Moreno-Sánchez, 2006). Pour le Pb le nombre de molécules de GSH nécessaires n'est pas connu. En présence de Pb, l'activité de la GST est stimulée chez *Macrotyloma uniflorum* et *Cicer arietinum* (Reddy *et al.*, 2005) et la teneur en GSH doublée par deux chez *Sesbania drummondii* (Ruley *et al.*, 2006).

En plus du GSH, de l'homoglutathion (hGSH ; γ -glutamyl-cysteinyl - β -alanine) a été retrouvé chez les Fabacées (légumineuses) (Klapheck, 1988). La première enzyme (γ -ECS) intervenant dans la synthèse de l'hGSH est la même que pour le GSH mais ensuite la GSHS est remplacée par l'homoglutathion synthétase (hGSHS) (Matamoros *et al.*, 2003). Le gène codant cette enzyme est exprimé dans les nodosités induites par *Rhizobium*, les racines et les feuilles (Matamoros *et al.*, 2003). Suivant les organes et la plante, le rapport GSH/hGSH est variable : *Vicia faba* (Klapheck, 1988), *Lupinus albus* (Matamoros *et al.*, 1999) et *Vigna unguiculata* (Cruz de Carvalho *et al.*, soumis) (annexe 1) ne contiennent pas d'hGSH, *Pisum sativum* et *Medicago truncatula* (Frendo *et al.*, 1999; Matamoros *et al.*, 1999) présentent autant des deux et *Glycine max*, *Phaseolus vulgaris* et *Phaseolus coccineus* (Klapheck, 1988) contiennent majoritairement de l'hGSH.

Cet hGSH peut présenter des fonctions similaires au GSH, il est impliqué dans les défenses des plantes contre les métaux lourds en entrant dans la biosynthèse des homophytochélatines (Grill *et al.*, 1986; Klapheck *et al.*, 1995), en interagissant avec la glutathion S-transférase (Skipsey *et al.*, 1997) et en intervenant dans le traitement des espèces activées de l'oxygène (Dalton *et al.*, 1986; Moran *et al.*, 2000).

b. Les métallothionéines et phytochélatines

Les métallothionéines (MTs) sont des protéines de faible poids moléculaire (6-7KDa) riches en résidus cystéines présentant trois motifs conservés : Cys-Cys, Cys-X-Cys et Cys-X-X-Cys. La transcription des gènes de MT est induite par les métaux lourds via des « metal response element » (MRE) qui sont présents en une ou plusieurs copie(s) au niveau du promoteur proximal de ces gènes (Bourdineaud *et al.*, 2006). Les MTs sont regroupées en trois classes basées sur l'arrangement des cystéines (Cobbett et Goldsbrough, 2002). La première classe (MTs I) contient 20 résidus cystéine hautement conservés, elle est représentée chez les mammifères et un grand nombre de vertébrés. Les MTs sans arrangement strict des cystéines sont dans la deuxième classe de MT (MTs II), elles incluent les plantes, les champignons et les invertébrés. Cette classe est divisée en quatre catégories (types 1 à 4) en fonction de la position des cystéines. Les phytochélatines sont décrites comme la troisième classe de MTs (MTs III).

Chez les plantes, les MTs répondent à différents stimuli tels que les ions métalliques (Chaney *et al.*, 1997; Mejáre et Bülow, 2001), les hormones végétales, les agents oxydatifs (Akashi *et al.*, 2004), les chocs thermiques, les infections virales, la forte salinité, la sécheresse (Akashi *et al.*, 2004) et les radiations UV (Brkljadic *et al.*, 2004). Les MTs interviennent également dans la réponse aux métaux lourds, comme cela a été montré pour le Cd chez des tabacs transgéniques, exprimant une MT I de souris. Par contre l'expression de cette MT n'a que peu d'effets sur le transport du métal des racines vers les parties aériennes (Yeargan *et al.*, 1992; Elmayer et Tepfer, 1994).

Les phytochélatines (PCs) sont des structures composées de deux à 11 répétitions du dipeptides γ -GluCys. Elles possèdent en C-terminal un acide aminé variable : glycine, γ -alanine, serine ou acide glutamique (Cobbett et Goldsbrough, 2002) et sont classées en fonction de cet acide aminé terminal. La synthèse des PCs est induite par de nombreux métaux dont le Pb (Gupta *et al.*, 1995; Gupta *et al.*, 1999; Mehra et Tripathi, 2000; Piechalak *et al.*, 2002): ceux-ci se lient à une enzyme constitutive, la phytochélatine synthase (PC synthase) qui catalyse la biosynthèse de la PC à partir du glutathion (GSH). Une molécule de PC se lie à un ion Pb^{2+} (Mehra *et al.*, 1995; Clemens, 2001). Les complexes PC-métaux lourds peuvent ensuite être séquestrés dans les vacuoles (Cobbett et Goldsbrough, 2002; Piechalak *et al.*, 2002).

c. Acides organiques et aminés

En raison de la réactivité des ions métalliques avec les atomes de soufre, d'azote et d'oxygène, les acides carboxyliques et les acides aminés sont des chélateurs potentiels. Le citrate, le malate et l'oxalate sont impliqués dans une gamme de processus incluant le transport des métaux par le xylème et la séquestration des métaux dans les vacuoles (Rausser, 1999). Mais des corrélations claires entre les concentrations en acide organique et en métal n'ont pas encore été identifiées (Clemens, 2001).

En conclusion, la prise en charge des ions métalliques tels que Pb^{2+} par divers chélateurs externes et internes permet un meilleur transport du métal dans la plante et son stockage dans des vacuoles.

3.2. Les transports transmembranaires

Le transport apoplastique du Pb dans les racines jusqu'au cylindre central de la plante et son déplacement vers les parties aériennes est fortement inhibé par l'endoderme, et principalement la bande de Caspari, qui joue le rôle de barrière (Seregin et Ivaniov, 1997; Verma et Dubey, 2003).

Afin d'être transporté, il est donc nécessaire que le plomb, seul ou complexé avec un chélateur, traverse une membrane afin d'être pris en charge dans le symplasma. Cette entrée dans la cellule se fait via des transporteurs membranaires.

Il existe chez *Arabidopsis thaliana*, 984 transporteurs protéiques (Nagata *et al.*, 2008). Ces protéines sont classées en trois catégories : les pompes dépendant de l'ATP, les canaux ioniques et les transporteurs secondaires. Chez *Arabidopsis thaliana* elles représentent respectivement 18, 13 et 67%, et les 2% restant sont des transporteurs non classés. Les pompes fonctionnant avec l'ATP témoignent d'un transport actif permettant le passage de molécules dans un seul sens, contre un gradient de concentration, et indépendamment de l'environnement. Il en résulte la formation d'un gradient d'ions entre les cotés externes et internes de la membrane. Les canaux ioniques s'ouvrent et se ferment en réponse à un signal électrique ou mécanique, ou à la liaison avec un ligand. Enfin, les transporteurs secondaires permettent le transport de divers substrats grâce à un gradient formé par des molécules co-transporteuses, principalement les ions H^+ , parfois Na^+ . Suivant le sens du co-transport ces transporteurs sont des symports, si le substrat et le co-transporteur vont dans le même sens ou des antiports dans le cas inverse.

Parmi tous les transporteurs présents chez les plantes certains permettent le transport des métaux lourds, ils seront ici classés suivant leur localisation : dans la membrane plasmique, le tonoplaste ou les deux. Pour chaque localisation ils sont classés ainsi : les pompes fonctionnant avec l'ATP, puis les canaux ioniques et enfin les transporteurs secondaires.

Il existe à ce jour peu de transporteurs dont le rôle dans le transport du Pb a été démontré. Par contre ils sont nombreux à avoir été impliqués dans le transport d'autres métaux lourds tels que le Cd, le Cu, le Zn et le Ni.

3.2.1. Les transporteurs de la membrane plasmique

La membrane plasmique joue un rôle essentiel dans l'homéostasie cellulaire en général, par exemple en régulant les entrées et sorties d'ions dans la cellule. En présence de certains éléments métalliques, elle est la première structure cellulaire affectée. Son fonctionnement peut être dérégulé ce qui se traduit par l'augmentation des efflux cellulaires : des ions sortent de la cellule afin d'équilibrer le gradient chimique. Les plantes hyperaccumulatrices en éléments métalliques présentent par rapport aux autres plantes une stabilité plus grande de leurs membranes cellulaires en présence d'un métal lourd (Nelson, 1999).

Les transporteurs impliqués dans le transport des métaux lourds ne leurs sont pas spécifiques. Ils interviennent principalement dans l'absorption des cations essentiels à la croissance et au développement de la plante. Une compétition s'installe entre les nutriments minéraux sous forme ionisée et les ions métalliques. De plus, en présence de métaux lourds certains transporteurs, ZIP, Nramp, CDF, ABCt, voient leur expression modifiée, jouant par conséquent un rôle clé dans leur transport (Hall et Williams, 2003; Clemens, 2006).

a. Les ATPases de types P

Les pompes ATPases de type P utilisent l'énergie libérée par l'hydrolyse de l'ATP pour transporter une variété de substrats chargés à travers les membranes biologiques. Elles se différencient des autres pompes ATPases par la formation d'un intermédiaire phosphorylé durant le cycle réactionnel (Williams *et al.*, 2000). Chez les plantes les H^+ /ATPases sont impliquées dans le transport de cations, à travers la membrane plasmique (Axelsen et Palmgren, 2001). Il existe cinq familles d'ATPases de type P, elles même divisées en sous familles dont la P1B ou CPx-ATPases (Hall et Williams, 2003). Celle-ci contient un domaine N-terminal cytoplasmique capable de lier une variété d'ions métalliques (Williams *et al.*, 2000) (Fig. 2), d'où son rôle dans le transport de métaux lourds tels que le Cu, le Zn, le Cd et le Pb (Solioz et Vulpe, 1996; Mills *et al.*, 2003; Bernard *et al.*, 2004).

Chez *Arabidopsis thaliana*, l'utilisation de mutant « knockout » a permis de démontrer l'intervention de l'une de ces ATPases (AtHMA5) dans la compartimentation du Cu (Andrés-Colás *et al.*, 2006) ; une autre ATPase (AtHMA4) contribue à la tolérance de la plante au Zn en le pompant vers le xylème (Hussain *et al.*, 2004; Mills *et al.*, 2005).

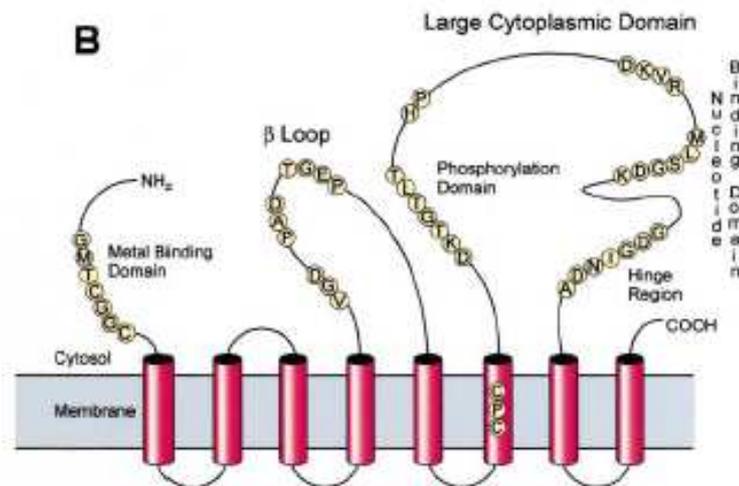


Figure 4 : Structure d'une ATPase de type P (Tabata *et al.*, 1997).

b. La famille des CNGC

Une famille de canaux ioniques a relativement récemment été mise en évidence chez les plantes (Schuurink *et al.*, 1998; Arazi *et al.*, 1999; Köhler *et al.*, 1999; Leng *et al.*, 1999). Elle présente de fortes homologies avec la famille des « cyclic nucleotide-gated non selective cation channels » (CNGC) (canaux à cations non sélectifs médiés par des nucléotides cycliques) des mammifères, impliquée dans la transduction du signal Ca^{2+} . Ce canal est formé de six domaines transmembranaires, d'un domaine de fixation des nucléotides cycliques

(CNB) et d'un pore dont la structure est voisine de celui des canaux K^+ (Köhler et Neuhaus, 2000) (Fig. 3). Ces CGNC végétaux sont des canaux à cations peu sélectifs impliqués dans le transport du calcium et du potassium (Köhler *et al.*, 1999; Leng *et al.*, 1999; Sunkar *et al.*, 2000). Un ADNc complet (NtCBP4) a été isolé chez *Nicotiana tabacum* et sa surexpression dans des plantes transgéniques de tabac a induit une augmentation de la quantité de plomb absorbée par les plantes, corrélée à une activation du transport transmembranaire du Pb (Arazi *et al.*, 1999; Sunkar *et al.*, 2000).

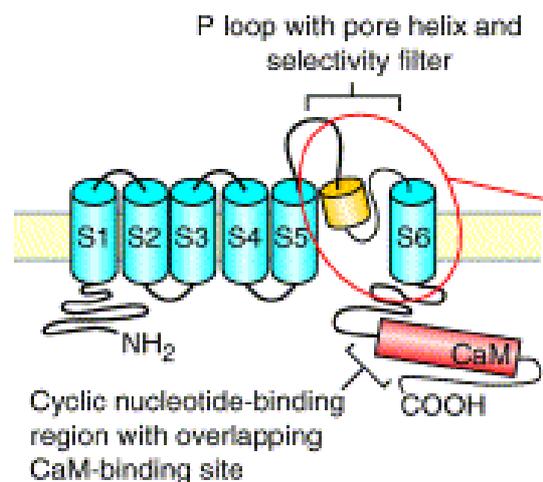


Figure 3 : Structure putative des transporteurs de type CNGC (« cyclic nucleotide-gated non selective cation channels ») chez les plantes. Le domaine CNB (« cyclic nucleotide-binding domain ») est représenté en rouge ; le pore se situe entre les domaines S5 et S6 (Talke *et al.*, 2003).

c. Les transporteurs de type ZIP

L'abréviation ZIP signifie dans le cas des transporteurs « ZRT, IRT-like Protein ». Ces protéines de transport regroupent deux familles de transporteurs. IRT1 (Iron-Regulated Transporter 1) est un transporteur à haute affinité pour les cations qui est exprimé dans des plantes d'*Arabidopsis* carencées en fer (Eide *et al.*, 1996). ZRT1 et ZRT2 (Zinc-Regulated Transporter 1 et 2) sont des transporteurs de zinc à haute et à faible affinité chez la levure (Zhao et Eide, 1996). A ce jour plus de 25 membres de la famille des transporteurs ZIP ont été identifiés, notamment chez plusieurs espèces végétales telles que *Arabidopsis thaliana* (Eide *et al.*, 1996; Zhao et Eide, 1996), *Thlaspi caerulescens* (Pence *et al.*, 2000), *Lycopersicon esculentum*, *Pisum sativum*, et *Oryza sativa* (Guerinot, 2000). Ils sont classés dans la catégorie des transporteurs secondaires mais aucun co-transporteur ne leur est connu (Nagata *et al.*, 2008).

Il a été montré que des ZIPs peuvent transporter des métaux, avec une sélectivité spécifique à

chacun d'entre eux (Korshunova *et al.*, 1999). Les études topologiques prédisent que ces protéines sont intrinsèques dans les membranes (Eide *et al.*, 1996; Grotz *et al.*, 1998; Guerinot, 2000; Assuncao *et al.*, 2001) (Fig. 4).

L'expression des gènes correspondants est stimulée dans les racines et dans les feuilles d'*Arabidopsis thaliana* lors d'une carence en Zn (Grotz *et al.*, 1998). Ces résultats suggèrent que ces protéines peuvent être impliquées non seulement dans l'absorption racinaire mais aussi dans le transport des métaux dans la plante (López-Millán *et al.*, 2004).

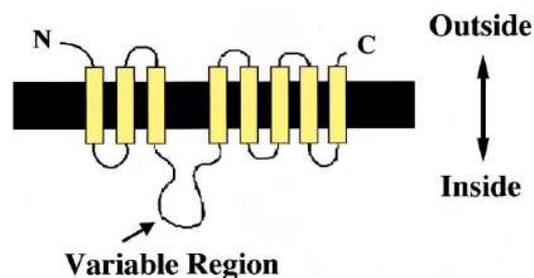


Figure 4 : Structure des transporteurs protéiques ZIP (Guerinot, 2000)

3.2.2. Transporteurs de la membrane plasmique et du tonoplaste

a. Transporteurs ABC

La famille des « ATP-binding cassette » (ABC) est une des plus vastes familles de protéines. On la retrouve dans tous les règnes, des bactéries aux humains (Higgins, 1992). Tous les transporteurs ABC possèdent une ou deux copies de deux structures fonctionnelles : un domaine transmembranaire hydrophobe et un domaine liant l'ATP (NBD : nucleotide binding domain) (Rea, 1999; Theodoulou, 2000) (Fig. 5). Suivant leur sous famille ils sont situés dans les membranes plasmiques, mitochondriales ou vacuolaires (Hall et Williams, 2003). Ces protéines transportent une grande variété de substrats : des ions, des sucres, des lipides, des xénobiotiques, des antibiotiques, des pigments, des drogues et des métaux lourds (Theodoulou, 2000; Sanchez-Fernandez *et al.*, 2001). Le génome d'*Arabidopsis thaliana* contient approximativement 130 protéines ABC réparties en plusieurs sous familles, mais les fonctions précises et les substrats spécifiques de la plupart de ces transporteurs restent encore obscurs (Sanchez-Fernandez *et al.*, 2001; Jasinski *et al.*, 2003). Cependant, certaines d'entre elles interviendraient dans le transport des complexes glutathion-Cd ou PC-Cd du cytoplasme vers les vacuoles (Hall et Williams, 2003). Par fusion d'un gène de protéine ABC avec le gène codant la GFP (Green Fluorescent Protein), Lee et son équipe ont localisé *AtPDR12* dans la membrane plasmique et montré, par transgénèse et surexpression ou silencing, le rôle

de ce gène dans la résistance des plantes d'*Arabidopsis thaliana* à la présence de Pb dans le milieu de culture. Ces expériences ont montré que ce transporteur permet le passage du Pb du cytoplasme vers l'extérieur de la cellule (Lee *et al.*, 2005). L'emploi de mutant d'*Arabidopsis thaliana* a permis de localiser la protéine AtATM3, de la sous-famille des ATM (ABC mitochondriale) dans la membrane mitochondriale, et de montrer son rôle dans l'exportation des complexes glutathion-Cd de la mitochondrie vers le cytosol (Kim *et al.*, 2006).

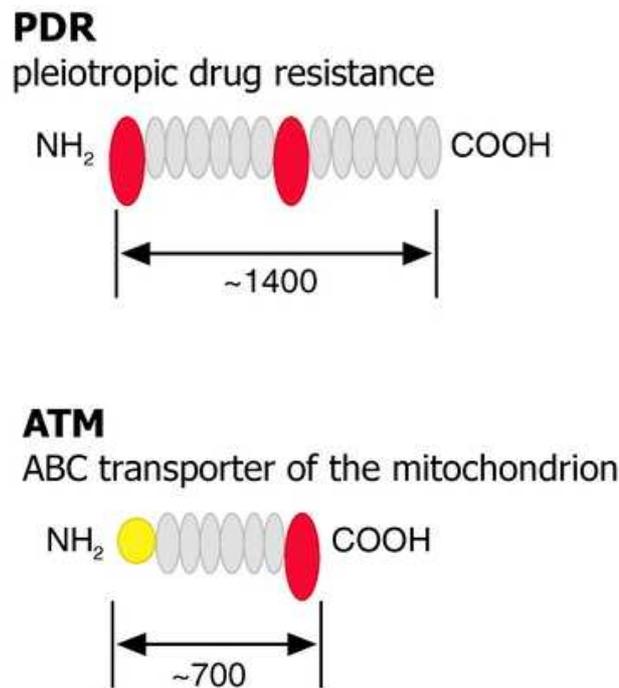


Figure 5 : Organisation des domaines putatifs des transporteurs de type ABC, des sous familles PDR (pleiotropic drug resistance) et ATM (ABC transporter of the mitochondrion). En rouge sont représentés les NBDs (nucleotide-binding domains), en gris les TMDs (transmembrane domains) composés d'hélices α transmembranaires et en jaune le peptide signal (Rea, 2007).

b. Les protéines NRAMP

Le premier membre de la famille des NRAMP (Natural Resistance Associated Macrophage Protein) a été nommé ainsi car il confère une résistance bactérienne chez la souris (Vidal *et al.*, 1993). Ces protéines constituent une nouvelle famille de protéines impliquées dans le transport des ions métalliques divalents (Nagata *et al.*, 2008). Elles sont classées dans la catégorie des symports et ont comme co-transporteur les ions H⁺ (Nagata *et al.*, 2008). La famille des gènes *NRAMP* a été hautement conservée durant l'évolution et des homologues ont été retrouvés dans les bactéries, les levures, les insectes, les mammifères et les plantes supérieures (Williams *et al.*, 2000). Des gènes *NRAMP* ont été identifiés chez plusieurs

espèces végétales : *Oriza sativa* (Belouchi *et al.*, 1995; Belouchi *et al.*, 1997), *Arabidopsis thaliana* (Alonso *et al.*, 1999), *Thlaspi japonicum* (Mizuno *et al.*, 2005), *Glycine max* (Kaiser *et al.*, 2003) et *Lycopersicon esculentum* (Bereczky *et al.*, 2003). Ces protéines présentent douze domaines transmembranaires avec un ‘motif transport’, entre les domaines 8 et 9 (Fig. 6). Chez les plantes, des protéines Nramp ont été localisées dans la membrane plasmique (Clemens 2001) et dans le tonoplaste par un marquage avec la GFP (Thomine *et al.*, 2000; Thomine *et al.*, 2003).

Wei et son équipe ont montré, chez *Thlaspi caerulescens*, que l’expression d’un gène *NRAMP* était induit par le Cd et le Ni, suggérant que ces protéines sont impliquées dans l’homéostasie métallique (Ouziad *et al.*, 2005; Wei *et al.*, 2008). Chez des plantes d’*Arabidopsis thaliana* carencé en fer, AtNRAMP3 induit l’accumulation de métal dans les cellules en mobilisant les ions métalliques de la vacuole au cytosol (Thomine *et al.*, 2003). Le rôle de ces transporteurs dans la réponse au Pb n’a pas été rapporté à ce jour.

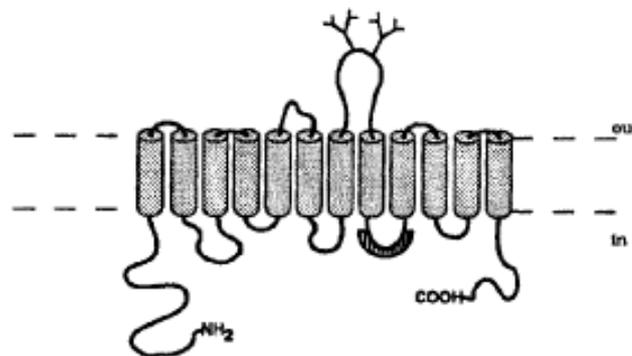


Figure 6 : Structure des protéines NRAMP (Gruenheid *et al.*, 1995).

c. Les transporteurs de type CDF

Les membres de la famille des CDF (Cation Diffusion Facilitator) (Nies et Silver, 1995) sont impliqués dans le transport d’éléments traces (Kim *et al.*, 2004). Ces protéines sont formées de six domaines transmembranaires et possèdent un domaine de liaison aux cations à l’extrémité C-terminale (Paulsen et Saier, 1997).

Ces protéines permettent l’efflux d’ions métalliques, comme le Zn^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} , Mn^{2+} ou Ni^{2+} , du cytoplasme vers l’extérieur de la cellule ou vers les compartiments cellulaires comme les vacuoles (Gaither et Eide, 2001; Palmiter et Huang, 2004). Elles sont classées parmi les antiports et ont comme co-transporteurs les ions H^+ et K^+ (Nagata *et al.*, 2008).

La première protéine CDF végétale, identifiée à partir d'un ADNc isolé, est le transporteur de Zn, ZAT, chez *Arabidopsis thaliana* (van der Zaal *et al.*, 1999), qui a plus tard été renommé AtMTP1 (*A. thaliana* Metal Tolerance Protein 1) (Delhaize *et al.*, 2003) (Fig. 7).

Chez *Arabidopsis thaliana*, le gène ZAT est induit par l'augmentation de Zn dans le milieu de culture (van der Zaal *et al.*, 1999). Ce gène a également été identifié chez *Thlaspi caerulescens* où il est principalement exprimé dans les feuilles et dans les racines. Il est surexprimé chez les plantes poussant sur un sol contaminé par le Zn, le Cd et le Pb (Assuncao *et al.*, 2001). Cependant son rôle dans la correction des effets délétères induits par les métaux lourds dans les plantes n'a pas été démontré (Clemens, 2006).

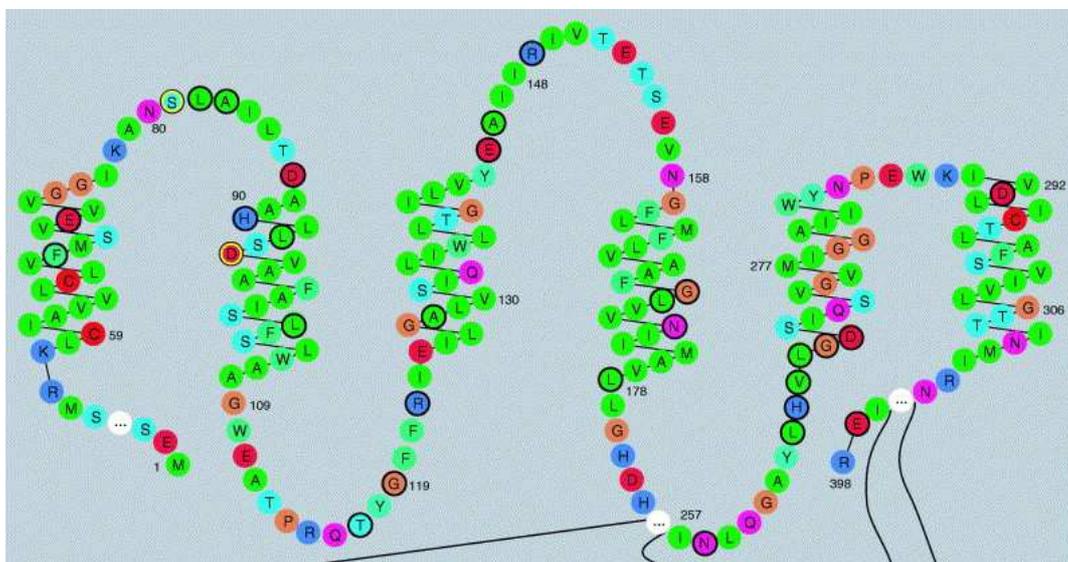


Figure 7 : Structure putative de la protéine MTP1 d'*Arabidopsis thaliana* (Krämer, 2005).

3.2.3. Autres transporteurs du tonoplaste : les antiports cation/H⁺

Des antiports cation/H⁺ sont situés dans la membrane de la vacuole et participent à la régulation des concentrations en Na⁺ et Ca²⁺ dans le cytoplasme (Hirschi, 2001; Maeshima, 2001; Gaxiola *et al.*, 2002). Deux gènes CAX (cation exchangers), codant pour des transporteurs de ce type, ont été isolés chez *Arabidopsis thaliana* (Hirschi *et al.*, 1996). Ces protéines sont formées de 11 domaines transmembranaires et d'une région centrale hydrophile (Hirschi, 2001; Maeshima, 2001) (Fig. 8). Parmi les 11 transporteurs de types CAX présents chez *Arabidopsis thaliana* CAX1 et CAX2 sont impliqués dans le transport du Ca²⁺ dans les vacuoles. Des plantes mutantes ont permis d'identifier CAX2 dans le transport du Mn²⁺ (Shigaki *et al.*, 2003). De plus Salt et son équipe ont montré grâce à des vésicules enrichies en

tonoplaste isolées à partir de racines d'avoine, que CAX2 était impliqué dans l'accumulation de Cd dans les vacuoles (Salt et Wagner, 1993). Des plantes transgéniques de tabac exprimant les gènes *AtCAX2* et *AtCAX4* ont permis de démontrer le rôle de CAX2 et CAX4 dans la tolérance du tabac aux fortes concentrations de Cd, Zn et Mn (Korenkov *et al.*, 2007).

Le rôle de ces transporteurs CAX n'a pas été mis en évidence en réponse à l'accumulation de Pb.

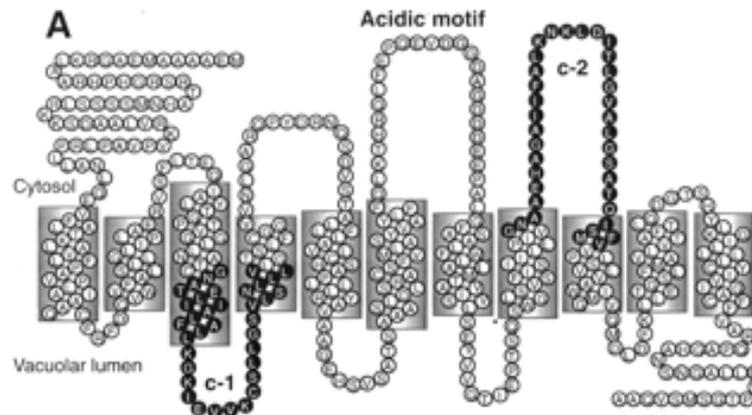


Figure 8 : Structure type des protéines CAX (Kamiya et Maeshima, 2004).

En conclusion, il existe de nombreux transporteurs intervenant dans le déplacement des éléments métalliques dans les cellules végétales (Fig. 9). Certains permettent aux ions métalliques de traverser la membrane plasmique, tels que les CNGC, ZIP, NRAMP et les pompes ATPases de type P. Une fois entrés dans la cellule, ces éléments peuvent être chélatés ou non à des molécules comme le GSH ou les PCs et sont pris en charge dans le symplasma ou stockés dans des vacuoles grâce à d'autres transporteurs, tels que des CDF, des antiports cation/H⁺ et des transporteurs ABC. Certains éléments métalliques pourront ressortir des vacuoles grâce aux transporteurs NRAMP et ainsi être remis en circulation dans le symplasma ou bien être exportés à l'extérieur de la cellule via certains transporteurs ABC et CDF. La localisation des ions métalliques est dépendante de leur nature, spécifique de l'espèce végétale et varie donc suivant la teneur en chacun des transporteurs dans les cellules. Ceci se traduit par différents mécanismes de tolérance mis en place par les plantes (voir paragraphe 4.). Dans le cas du Pb des transporteurs permettant son entrée dans la cellule ont été mis en évidence. Cependant, les protéines impliquées dans le transport du Pb dans les vacuoles n'ont pas encore été identifiées.

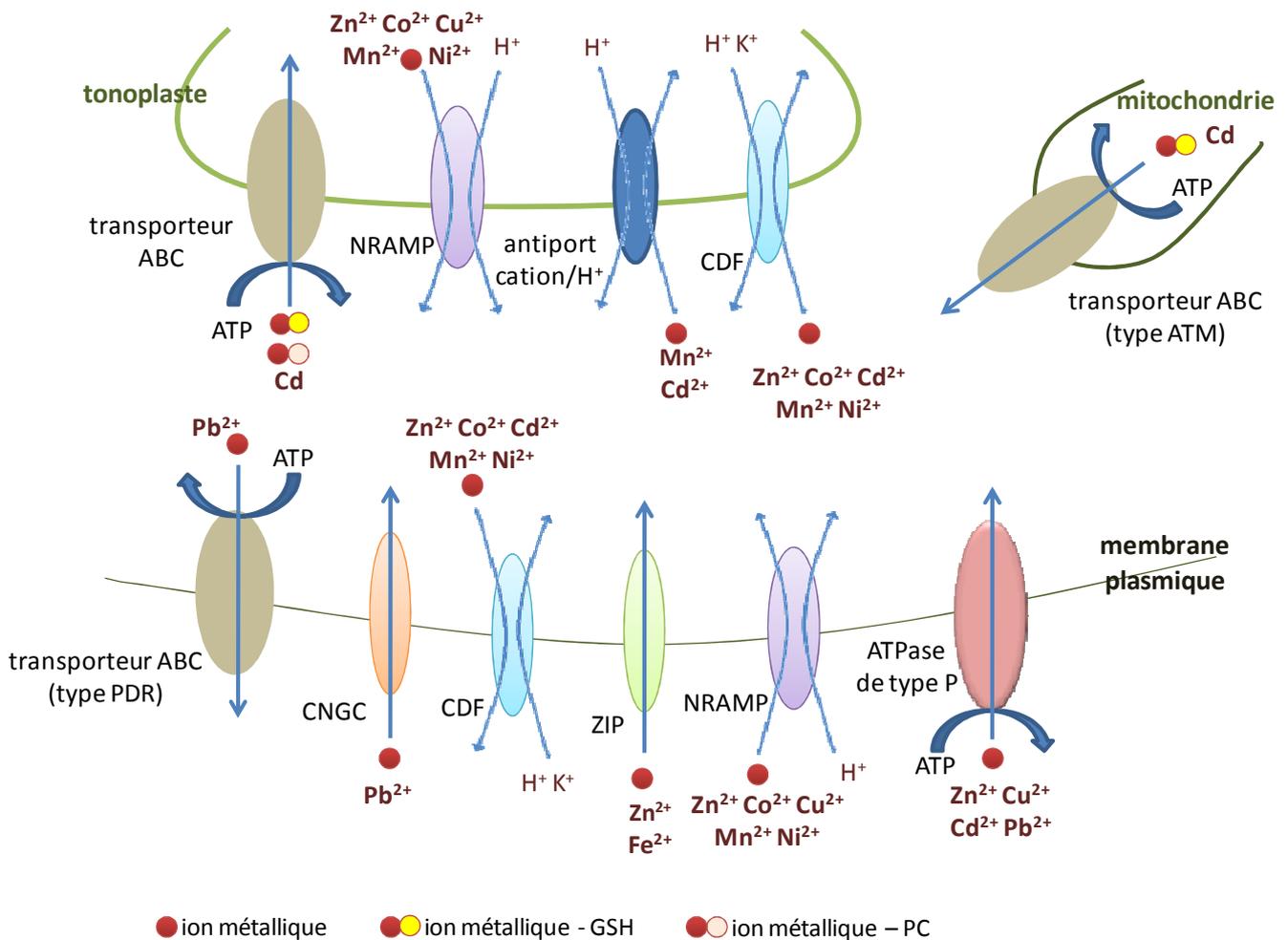


Figure 9 : Schéma récapitulatif des transporteurs de métaux lourds dans une cellule végétale.

4. Les mécanismes de tolérance des plantes au plomb

4.1. Effets du plomb sur la plante

Les plantes cultivées dans un milieu contaminé par le Pb présentent un ralentissement de leur développement et une inhibition de la croissance des racines et des parties aériennes. Leurs feuilles ont généralement une surface inférieure à celle des témoins et des chloroses peuvent apparaître. Dans certains cas la présence de Pb peut mener à une mort des cellules (Ernst, 1998; Seregin et Ivaniov, 2001). Différents dérèglements physiologiques et moléculaires sont à l'origine de ces phénomènes.

La présence de Pb^{2+} dans le milieu extérieur induit une compétition avec les ions minéraux au niveau des transporteurs cellulaires altérant la perméabilité membranaire et induisant une carence en éléments nutritifs dans les plantes (Haussling *et al.*, 1988; Marschner, 1995).

Le ralentissement de la croissance racinaire par le Pb, et les métaux lourds en général (Potters *et al.*, 2007), peut résulter d'une inhibition de la division cellulaire (Wierzbicka, 1989; Wozny et Jerczynska, 1991; Eun *et al.*, 2000) et de l'élongation des cellules (Seregin et Ivanov, 1997; Obroucheva *et al.*, 1998; Malkowski *et al.*, 2002). Des études ont permis d'observer une diminution du taux de transpiration ainsi que du contenu en eau dans les plantes (Iqbal et Mushtaq, 1987; Sharma et Dubey, 2005). Ceci pouvant être dû à une fermeture des stomates induite par l'altération des flux de K^+ à travers la membrane et l'augmentation du contenu en ABA. (Bazzaz *et al.*, 1974).

La photosynthèse est elle aussi inhibée, ceci s'explique par une déformation des structures chloroplastiques (Stefanov *et al.*, 1995), une diminution de la synthèse de chlorophylle, de plastoquinone, et de caroténoïde (Burzynski, 1987), un transport des électrons altéré (Rashid *et al.*, 1994), un manque de CO_2 et une inhibition de l'activité de certaines enzymes du cycle de Calvin (Vallee et Ulmer, 1972).

D'autres enzymes peuvent être affectées par la présence de Pb car il se lie aux groupements SH et parfois bloque les fonctions COOH (van Assche et Clijsters, 1990). Les enzymes dont l'activité est inhibée participent notamment à la synthèse de la chlorophylle, à la fixation du CO_2 , au cycle de Calvin, à l'assimilation de l'azote et au métabolisme des sucres (Sharma et Dubey, 2005). Certaines enzymes sont au contraire activées telles que les hydrolases (comme les protéases), les phosphohydrolases et les enzymes du cycle ascorbate-glutathion (Sharma et Dubey, 2005).

D'autre part, la présence de Pb induit indirectement une contrainte oxydative et par conséquent la production d'espèces activées de l'oxygène (ROS) (Malecka *et al.*, 2001). Cette surproduction de ROS est due au fait que, comme en réponse à de nombreuses contraintes environnementales, les plantes fixent moins de CO_2 lors d'une culture en présence de Pb. Ceci induit une réduction de la régénération du $NADP^+$ par le cycle de Calvin, ayant pour conséquence une inhibition de la chaîne de transport des électrons photosynthétiques (Vranova *et al.*, 2002; Cruz de Carvalho, 2008). Ce phénomène induit alors la formation des radicaux superoxide (O_2^-) et des oxygènes singulets (1O_2) dans les chloroplastes (Krause, 1994). Afin de remédier à cette diminution du transport des électrons les plantes ont développé un système de photorespiration pour régénérer le $NADP^+$ (Kozaki et Takeba, 1996). Cependant via ce système des H_2O_2 sont formés dans les peroxysomes (Somerville *et*

al., 2000). De plus la chaîne de transport des électrons dans les mitochondries est également inhibée, favorisant la formation d' O_2^- (Purvis, 1997).

Cependant d'après certaines études en microscopie électronique, la morphologie des composants cellulaires tels que les mitochondries, les dictyosomes, les ribosomes et le réticulum endoplasmique ne paraît pas affectée par la présence de Pb (Jarvis et Leung, 2002). Afin de limiter les effets délétères induits par la présence d'ions Pb^{2+} , la plante met en place différents mécanismes.

4.2. Stratégies développées par les végétaux pour limiter les effets délétères du plomb

Afin de contrer les effets délétères induits par la présence de plomb dans leur milieu de culture les plantes ont mis en place deux types de stratégie. La première est l'évitement qui consiste : 1) à accumuler le plomb dans l'apoplasme et/ou 2) à le séquestrer rapidement dans les vacuoles s'il parvient jusqu'au symplasme. Ces mécanismes ne sont pas exclusifs (Yang *et al.*, 2005; Clemens, 2006). Dans la deuxième stratégie, les structures intracellulaires sont exposées au polluant mais sont peu affectées du fait de caractéristiques particulières qui leur permettent de tolérer des teneurs élevées en Pb. Ces mécanismes peuvent correspondre à une tolérance constitutive. Ce phénomène a été montré au laboratoire dans le cas de la sécheresse. D'après le modèle construit, une des capacités induite est l'autolyse cellulaire adaptative (ACA) qui permet notamment la dégradation de protéines, et la remise en circuit de précurseurs pour la synthèse de protéines permettant l'adaptation cellulaire au nouvel environnement (Zuily-Fodil *et al.*, 1990; Roy-Macauley *et al.*, 1992; El Maarouf *et al.*, 1999; Cruz de Carvalho *et al.*, 2001; D'Arcy-Lameta *et al.*, 2006).

4.2.1. La stratégie d'évitement

Chimiquement, le Pb est classé comme un acide de Lewis faible. Il peut se lier par liaisons covalentes fortes dans les sols et dans les plantes. A la surface des racines, les ions Pb^{2+} se lient aux groupements carboxyles des acides uroniques du mucilage sécrété par les cellules racinaires. Ainsi, celui-ci forme une barrière protectrice du système racinaire (Morel *et al.*, 1986). Dans les parois cellulaires, le Pb peut se lier aux groupements carboxyles tels que l'acide galacturonique et l'acide glucuronique (Rudakova *et al.*, 1988). Ces différentes liaisons immobilisent efficacement le Pb dans l'apoplasme.

Si les sites apoplastiques de fixation du Pb ne sont pas suffisamment nombreux, l'élément peut intégrer le symplasme. Les cellules des tissus concernés le séquestrent dans des vacuoles (Antosiewicz et Wierzbicka, 1999) et le rendent ainsi inactif. Le plomb entrant dans les cellules sous forme ionique est rapidement lié à des chélateurs internes tels que le glutathion ou les phytochélatines. L'ion Pb^{2+} lié au GSH est ensuite transféré à une PC (Mehra *et al.*, 1995). Du Pb est retrouvé sous forme de dépôts et d'agrégats dans les vacuoles (Wierzbicka et Antosiewicz, 1993; Meyers *et al.*, 2008). Il existe donc des transporteurs au niveau du tonoplaste permettant le passage du Pb. Ces molécules n'étant pas à ce jour clairement identifiées, il est possible de penser qu'il s'agirait de transporteurs du même type que les transporteurs ABC impliqués dans la séquestration du complexe Cd-PC.

Ainsi la possibilité de fixation du plomb dans les parois cellulaires et son stockage dans les vacuoles constituent une forme de tolérance au Pb par évitement (Piechalak *et al.*, 2002). Cependant des mécanismes de protection plus directs peuvent être mis en jeu par certaines espèces végétales.

4.2.2. La protection et la tolérance vis à vis des métaux lourds

Certaines plantes présentent des mécanismes de protection contre les ROS produits lors de nombreuses contraintes abiotiques comme la sécheresse (Esfandiari *et al.*, 2008), l'ozone (Dizengremel *et al.*, 2008), les variations de température, la salinité (Miller *et al.*, 2008) et la présence d'un métal lourd tel que le Pb. Ils visent à la protection de molécules dont les protéines ; dans le cas où celles-ci sont endommagées, un système endoprotéolytique permet de les dégrader.

a. Détoxification des ROS

Les radicaux superoxydes formés dans les cellules sont transformés en H_2O_2 par la superoxyde dismutase (SOD) (Sandalio et del Río, 1987; del Río *et al.*, 2003). Ces molécules d' H_2O_2 sont ensuite dégradées par la catalase (CAT) et l'ascorbate peroxydase (APX) dans les peroxysomes, par la peroxyredoxine et le cycle ascorbate-glutathion (ou cycle d'Halliwell-Asada) dans les chloroplastes et le cytosol, et seulement par le cycle ascorbate-glutathion dans les mitochondries (Mittler *et al.*, 2004). Ce cycle met en jeu des molécules de GSH et d'ASC et implique différentes enzymes : une ascorbate peroxydase (APX), une glutathion réductase

(GR), une monodehydroascorbate réductase (MDHAR) et une dehydroascorbate réductase (DHAR) (Asada, 1996; Noctor et Foyer, 1998) (Fig. 10).

L'APX réduit une molécule d' H_2O_2 en H_2O , en utilisant deux molécules d'ASC. Cette réaction génère deux molécules de monodehydroascorbate (MDHA) (Noctor et Foyer, 1998). Le MDHA peut être réduit directement en ASC par la MDHAR et le donneur d'électron pour cette réaction peut être le NAD(P)H_2 (Asada, 1997). Au cours de cette réaction, du dehydroascorbate (DHA) est formé. Il est réduit en ASC par la DHAR qui utilise le GSH comme substrat (Foyer et Halliwell, 1976). Cette réduction s'accompagne d'une production de glutathion disulfide (GSSH), qui est ensuite réduit en GSH par la GR en présence de NADPH (Van Montagu et Inze, 1992; Noctor et Foyer, 1998).

Le GSH peut aussi intervenir directement pour minimiser l'effet des ROS en capturant les radicaux oxygénés dans la phase aqueuse protégeant ainsi les membranes (Barclay, 1988).

En présence de Pb, une augmentation des activités de l'APX, la GR, la SOD et la CAT est observée chez différentes espèces végétales telles que *Sesbania drummondii* (Ruley *et al.*, 2006), *Oryza sativa* (Verma et Dubey, 2003), *Pisum sativum* (Malecka *et al.*, 2001) et *Ceratophyllum demersum* (Mishra *et al.*, 2006) traduisant ainsi une augmentation de la prise en charge des ROS.

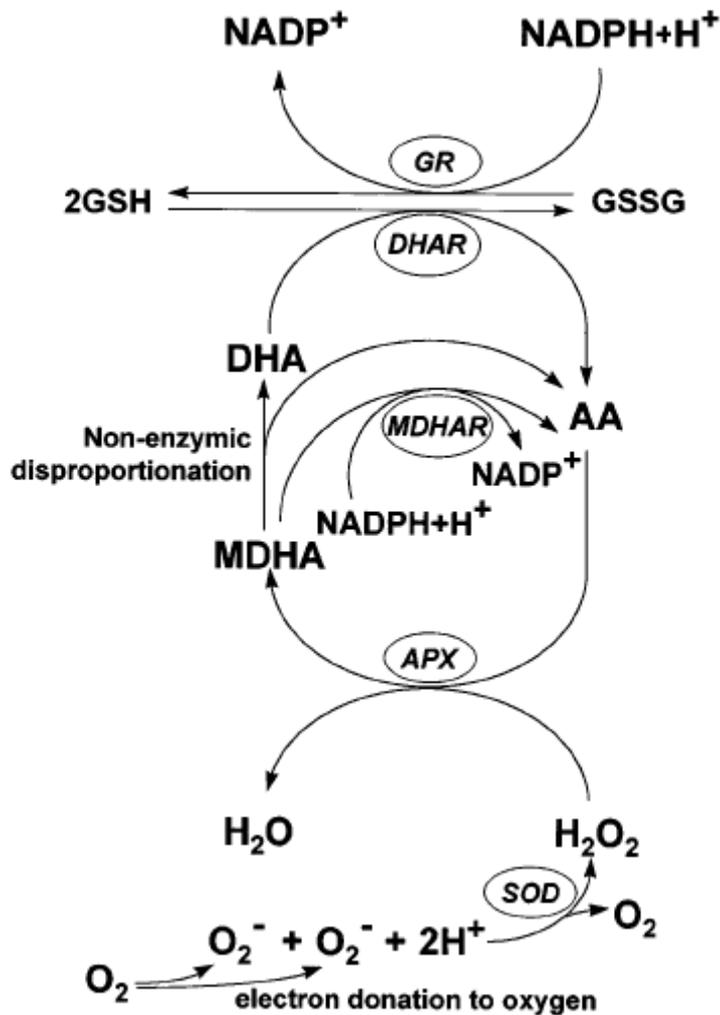


Figure 10 : Le cycle ascorbate-glutathion chez les plantes ; SOD : superoxide dismutase, APX : ascorbate peroxydase, MDHA : monodehydroascorbate, MDHAR : monodehydroascorbate réductase, DHA : dehydroascorbate, DHAR : dehydroascorbate réductase, GSH : glutathion, GSSH, glutathion disulfide, GR glutathion réductase. La stoechiométrie n'est pas respectée pour toutes les réactions (Noctor et Foyer, 1998).

b. Les molécules chaperonnes

L'expression de gènes codant des HSPs (Heat Shock Protein) est induite chez tous les organismes vivants, en réponse à la chaleur (Lindquist et Craig, 1988). Les HSP/chaperonnes (HSP60, HSP70 et HSP90) aident au repliement de protéines spécifiques (Hartl, 1996; Bukau et Horwich, 1998; Buchner, 1999; Frydman, 2001), et interagissent avec une grande gamme de protéines co-chaperonnes qui régulent leur activité (Wang *et al.*, 2004). Les HSP70 agissent plus particulièrement dans la prévention de la formation d'agrégat de protéines immatures et dans l'aide à leur repliement aussi bien en condition normale qu'en condition de contrainte (Wang *et al.*, 2004).

Lors de l'exposition à différentes contraintes (Heikkila *et al.*, 1984) et notamment à des métaux lourds tels le Cd et le Pb (Vierling, 1991; Lewis *et al.*, 2001) et à l'augmentation de la quantité d'O₂ accumulée (Efremova *et al.*, 2002; Rau *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2008), une augmentation de l'expression et de la quantité d'une HSP70 a été observée chez différentes espèces végétales dont *Fucus serratus*, *Lemna minor* et *Vicia faba*. Les molécules chaperonnes de type HSP70 interviennent donc dans la protection des protéines contre les dommages provoqués par le Pb.

c. Les systèmes protéolytiques

Les protéines sont une des plus principales cibles des ROS induisant une augmentation de la teneur en protéines carbonylées (Dean *et al.*, 1997). Le pool de protéines ainsi oxydées doit être dégradé afin d'éviter l'accumulation de protéines non fonctionnelles (Shringarpure *et al.*, 2003). Le système protéolytique végétal est composé par les protéases, principalement localisé dans les lysosomes et organites, et la voie ubiquitine-protéasome, dans le cytosol et le noyau (Rawlings *et al.*, 2004; Kurepa et Smalle, 2008).

Pena et son équipe ont étudié les effets de plusieurs métaux lourds dont le Pb sur le fonctionnement du système protéolytique d'*Helianthus annuus* L. (Pena *et al.*, 2008). Tous les métaux testés inhibent l'activité du protéasome 20S. Dans le cas du Pb cette inhibition ne semble pas due à la contrainte oxydative et donc pas à l'accumulation des protéines carbonylées, comme cela est le cas lors des traitements par le Cu ou l'Hg. En présence de Pb une augmentation des protéines conjuguées à l'ubiquitine est observée. Dans les conditions normales les protéines polyubiquitinées ne s'accumulent pas dans les cellules puisqu'elles subissent une protéolyse spécifique par le système ubiquitine-protéasome. Le niveau intracellulaire des protéines ubiquitinées reflète alors la balance entre le taux d'ubiquitination des protéines et le taux de dégradation des protéines ubiquitinées. Dans le cas d'un stress cellulaire l'accumulation des protéines ubiquitinées reflèterait plutôt une diminution de l'activité du protéasome qu'une augmentation des processus d'ubiquitination (Vierstra, 2003). En conclusion, les dommages oxydatifs ne semblent pas être les seuls responsables de la diminution de l'activité protéasome/protéase, dans le cas d'une contrainte métallique.

Il a cependant été montré que les protéines carbonylées sont la cible de protéases comme certaines endoprotéases (Pena *et al.*, 2006) qui les dégradent permettant ainsi d'obtenir des acides aminés libres pour la synthèse de nouvelles protéines (Palma *et al.*, 2002).

Il existe quatre familles d'endoprotéases : les protéases à serine, les protéases à cystéine, les protéases à acide aspartique et les métallo-protéases. Elles sont impliquées dans la germination, la sénescence (Huffaker, 1990; Buchanan-Wollaston et Ainsworth, 1997; Palma *et al.*, 2002) et la réponse à certaines contraintes comme la sécheresse (Zuily-Fodil *et al.*, 1990; Roy-Macauley *et al.*, 1992; Cruz de Carvalho *et al.*, 2001; Drame *et al.*, 2007), la contrainte oxydative (Solomon *et al.*, 1999).

D'autres études ont montré qu'en réponse aux dommages oxydatifs, les activités des endoprotéases sont stimulées chez les plantes (Gallego *et al.*, 2002; Romero-Puertas *et al.*, 2002) de même qu'en réponse à la présence de métaux lourds tel que le Cd, l'Hg ou le Pb (Jana et Choudhuri, 1984; McCarthy *et al.*, 2001; Garcia *et al.*, 2006; Pena *et al.*, 2006).

5. Lathyrus sativus L.

5.1. Description

5.1.1. Classification botanique et origine

Le *Lathyrus sativus* appartient au sous-règne des plantes vasculaires, à l'embranchement des Phanérogames, au sous embranchement des Angiospermes, à la classe des dicotylédones, à la sous classe des Dialypétales, à l'ordre des *Fabales*, à la famille des *Fabaceae* (légumineuses), à la sous famille des *Papilionoideae*, à la tribu des *Fabaeae*, au genre *Lathyrus* L. et à l'espèce : *sativus*.

Le *Lathyrus sativus* porte le nom: grass pea au Etats-Unis, gesse commune en France, khesari au Bangladesh, sabberi en Ethiopie, saatplatterbse en Allemagne ou encore kesare en Inde (Campbell, 1997).

Plusieurs auteurs ont souligné que l'origine du *Lathyrus sativus* est inconnue car sa distribution naturelle a été masquée par sa mise en culture. Cependant, il semblerait que le sud ouest et le centre de l'Asie centrale puisse être les centres d'origine (Campbell, 1997). De plus l'espèce *Lathyrus sativus* est probablement dérivée de l'espèce sauvage *Lathyrus cicera* (Campbell, 1997). Aujourd'hui cette Fabacée (légumineuse) est cultivée ou pousse naturellement en Europe de l'est, autour de la méditerranée, dans la « corne » africaine et en Asie de l'ouest et du sud.

5.1.2. Morphologie

Le *Lathyrus sativus* (Planches I et II) est une plante herbacée ayant une tige ailée peu rigide. Ses feuilles sont opposées, formées par une ou deux folioles linéaires et lancéolées terminées par une vrille rameuse qui permet l'appui sur d'autres plantes.

Ses fleurs sont typiques des *Fabaceae*, à cinq pétales. Elles mesurent 1,5 cm de diamètre et sont solitaires sur un pédoncule (de 3 à 5 cm). Les fleurs sont bleues, roses ou blanches selon les variétés.

Le fruit est une gousse ovale de 1,5 cm de largeur pour 3 cm de longueur. Elle comporte deux ailes foliacées et contient de trois à cinq graines grises tachetées de marron, d'un diamètre compris entre 4 et 7 mm (Campbell, 1997).

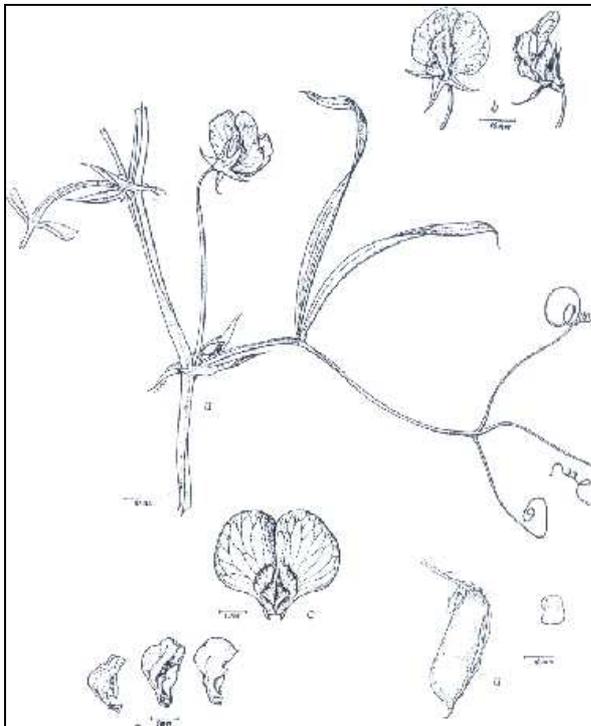


Planche I : Planche descriptive de *Lathyrus sativus* L. : tige, fleur, gousse et graine (Campbell, 1997).



Planche II : *Lathyrus sativus* lignée locale 'Bangladesh' (a) et 'Raipur' (b).

5.2. Composition du *Lathyrus sativus* L.

5.2.1. Valeur nutritive

Les graines du *Lathyrus sativus* ont une valeur énergétique de 362,3 cal/100 g (riz : 116 cal/100 g). Elles sont composées à 31,6% de protéines, à 2,7% de matière grasse, 51,8% d'extrait sans azote et 1,1% de cellulose brute (Campbell, 1997; Hanbury *et al.*, 1999).

5.2.2. Les protéines toxiques et anti-nutritionnelles

- Le *Lathyrus sativus* accumule dans ses graines une substance neurotoxique l'ODAP (oxaloacétate L-acide-2,3-diaminopropionique) laquelle, consommée en grande quantité et pendant une durée prolongée entraîne la production de protéines non fonctionnelles et provoque une maladie neurologique (par dégénérescence des cellules nerveuses) : le lathyrisme (Murti *et al.*, 1964; Rao *et al.*, 1964; Campbell, 1997).

Cette maladie est caractérisée par des troubles de la marche accompagnée d'une hypertonie musculaire (provoquant un dandinement du corps), jusqu'à une paralysie des membres inférieurs et parfois la mort du patient (Teckle Haimanot *et al.*, 2005).

- Les tannins du *Lathyrus* forment des complexes avec les protéines, dont les enzymes digestives, qui ne seront alors plus disponibles. L'organisme répond par la synthèse excessive

d'enzymes digestives qui entraîne une perte ou une altération des mucoprotéines gastro-intestinales.

- les composés phénoliques sont également abondants chez le *Lathyrus*.

5.2.3. Fixation de l'azote

Le *Lathyrus sativus* est une Fabacée (légumineuse) donc elle est capable de fixer l'azote atmosphérique via les agrobactéries *Rhizobium*. Aussi elle est utilisée fréquemment comme source d'azote, pour les cultures vivrières essentielles (Muehlbauer et Tullu, 1997; Hanbury *et al.*, 2000). Elle est par exemple cultivée avant la culture du riz, ou en co-culture.

5.3. Les capacités de résistance à la sécheresse de la gesse commune

Le *Lathyrus sativus* est utilisé dans de nombreuses zones de l'Asie du sud et de la Chine comme culture « dérobée ». Les graines sont semées dans les cultures de riz en attente. Quand l'eau est drainée pour la récolte de riz, les graines de *Lathyrus* germent et utilisent le reste de l'humidité pour croître. Habituellement les lignées ayant des graines petites sont utilisées dans ce contexte car elles restent en dormance pendant les inondations et présentent une meilleure germination que les plantes à grandes graines quand l'eau est drainée (Abd El Moneim *et al.*, 2001).

Ce type de culture ne nécessite que peu ou pas d'intrants : non seulement le *Lathyrus* utilise les reliquats d'eau mais également les nutriments restant dans le sol. Par ailleurs, le *Lathyrus sativus* résiste bien à la sécheresse, à la salinité et aux inondations mais par contre, il est sensible à l'acidité du sol (Kaul *et al.*, 1986; Campbell *et al.*, 1993; Hoque *et al.*, 1996).

Sa tolérance à la salinité des sols et à la sécheresse lui permet de pousser dans les régions arides et semi arides, la percolation profonde due à ses racines aide à lessiver le sel accumulé dans la couche superficielle (Campbell, 1997).

5.4. Le *Lathyrus sativus* et les métaux lourds

Une seule étude à ce jour a été publiée sur le *Lathyrus sativus* en temps que moyen de dépollution. Panda et son équipe (Panda *et al.*, 2006) ont montré que les gousses de *Lathyrus sativus* peuvent être utilisées comme 'biosorbants'. Ces gousses séchées ont été placées dans un milieu liquide contenant du Cd. Leur capacité à accumuler ce métal a été comparée avec d'autres échantillons végétaux, tels que des glumelles de graines de riz, des jacinthes d'eau ou

des poudres de tige de jute. Les gousses de *Lathyrus* ont été les plus efficaces, elles ont absorbé 95 % du Cd présent en solution.

Conclusion

Parmis les différents mécanismes de tolérance que les plantes peuvent développer, la voie impliquant les phytochélatines est majoritairement utilisée dans le cas d'une pollution par le Cd et l'As (Clemens, 2006). Ces molécules ne paraissent pas aussi impliquées dans le cas du Pb pour lequel le système anti oxydatif semble jouer un rôle prédominant.

Ainsi cette thèse porte sur l'étude de la capacité du *Lathyrus sativus* à tolérer la contrainte induite par le Pb (chélation, ROS, inhibition du développement) et à en étudier les mécanismes. Dans ce but : 1) un système de culture adapté à la plante et au Pb a été mis au point ; 2) des observations et mesures phénologiques ont été faites sur deux lignées de *Lathyrus sativus* ; 3) l'expression de gènes codant pour des protéines impliquées dans les mécanismes d'adaptation décrits précédemment, tels que l'autolyse cellulaire et les contraintes oxydatives, ont été étudiés.

PARTIE 2 :

MATÉRIELS ET MÉTHODES

1. Matériel végétal

1.1. Culture du *Lathyrus sativus* L.

1.1.1. Germination

Des graines de *Lathyrus sativus* L. correspondant à deux lignées locales « Bangladesh » et « Raipur », ont été gracieusement fournies par l'Université de Gand (Belgique). Elles sont immergées pendant quatre jours dans de l'eau distillée à 4° à l'obscurité avant d'être stérilisées pendant 15 min dans de l'éthanol à 70 % puis pendant 1 h dans de l'hypochlorite de sodium à 2 % puis rincées trois fois à l'eau distillée stérile. Elles ont été scarifiées avant d'être immergées pendant 12 h dans de l'eau distillée stérile. La germination se fait sur du papier humide ou du milieu de culture Murashige et Skoog (MS) (Duchefa Biochemie Kalys, France) en chambre de culture pendant 3 à 8 jours à 18° et à l'obscurité.

1.1.2. Conditions de culture

a. Conditions contrôlées

Après germination les plantules sont cultivées en phytotron. Les conditions sont les suivantes :

- humidité relative moyenne de 60 %,
- température de 23° à l'obscurité et 26° à la lumière $\pm 0.5^\circ$,
- photopériode variant selon les expériences (Tableau 5),
- intensité lumineuse émise est de 400 μmol de photons $\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

Tableau 5 : Conditions de culture des plantes de *Lathyrus sativus* en milieu hydroponique suivant l'expérience menée.

		1	2	3
germination	durée	6 jours (4 à l'obscurité et 2 à la lumière)	6 jours à la lumière	6 jours
	milieu	papier humide (H ₂ O)	milieu MS	milieu MS
	conditions	22°	22°	22°
pré culture	durée	3 jours	5 jours	8 jours
	milieu	milieu Hoagland dilué 10 fois, vermiculite	milieu Hoagland dilué 10 fois, vermiculite	milieu Hoagland dilué 10 fois, vermiculite
	conditions	23°/26°, 16h/8h, jour/nuit	25°/28°, 12h/12h, jour/nuit	25°/28°, 12h/12h, jour/nuit
culture hydroponique	durée	18 jours	96 h	14 jours
	milieux	<ul style="list-style-type: none"> • eau distillée stérile • milieu Hoagland (D1) • milieu Hoagland dilué 10 fois (D10) • milieu Hoagland dilué 100 fois (D100) 	<ul style="list-style-type: none"> • milieu Hoagland dilué 10 fois sans phosphate • + 0,5 mM de Pb(NO₃)₂ 	<ul style="list-style-type: none"> • milieu Hoagland dilué 10 fois sans phosphate • + 0,5 mM de Pb(NO₃)₂ • + 0,5 mM EDTA • + 0,2 mM de Pb(NO₃)₂ • + 0,2 mM de Pb(NO₃)₂ • + 0,2 mM EDTA
	conditions	1 plante/ pot de 1L changement du milieu tout les 6 jours	14 plantes/ bassine de 3 L	21 plantes/ bassine de 4,5 L renouvellement après 8 jours
échantillonnage	prélèvements	4, 7, 11 et 18 jours	96 h	8 jours et 14 jours
	rinçage des racines	pas de rinçage	milieu Hoagland dilué 10 fois avec ou sans ajout d'EDTA (1 mM)	milieu Hoagland dilué 10 fois avec ou sans ajout d'H-EDTA (1 mM)

1 : expérience de mise au point

2 : traitement de courte durée (96 h)

3 : traitement de longue durée (14 jours)

b. Solution nutritive

Les plantes sont cultivées en hydroponie. La solution nutritive utilisée est le milieu Hoagland N°2, pH 5. Sa composition est la suivante: 115.3 mg.L⁻¹ de (NH₄)₂HPO₄, 2.86 mg.L⁻¹ de B(OH)₃, 656.4 mg.L⁻¹ de Ca(NO₃)₂.4H₂O, 0.08 mg.L⁻¹ de CuSO₄.5 H₂O, 5.32 mg.L⁻¹ de Fe(C₄H₄O₆)₃.2 H₂O, 240.76 mg.L⁻¹ de MgSO₄.7 H₂O, 1.81 mg.L⁻¹ de MnCl₂.4H₂O, 0.016 mg.L⁻¹ de MoO₃, 606.6 mg.L⁻¹ de KNO₃, 0.22 mg.L⁻¹ de ZnSO₄.7 H₂O.

1.1.3. Précautions adoptées relatives au plomb

Le plomb est un composé toxique qui nécessite d'être manipulé avec précaution. Le port de gants est systématique. Lorsque le plomb est sous forme de poudre un masque est porté. Tout les déchets (solides et liquides) contaminés par le plomb sont stockés séparément, identifiés et traités comme produits dangereux.

1.1.4. Milieux de culture et traitements

Après germination, les plantules sont placées sur de la vermiculite et arrosées avec du milieu de base Hoagland N°2 dilué 10 fois. Elles sont ensuite transférées dans les différents milieux de culture liquide dérivés du milieu de base modifié ou non, avec ou sans phosphate, et avec ajout ou non de nitrate de Pb (Pb(NO₃)₂) et d'acide éthylène-diamine-tétraacétique (EDTA) (Tableau 5). Les milieux sont continuellement oxygénés et mélangés par bullage.

La durée des cultures varie de 96 h à 18 jours selon les expériences. Dans le cas des cultures les plus longues le milieu est renouvelé tout les six ou huit jours (Tableau 5).

1.1.5. Modélisation des formes chimiques

Les formes chimiques des différents éléments du milieu, dont le Pb et l'EDTA, sont modélisées au moyen du logiciel « Visual MINTEQ » qui prédit le pourcentage des différentes liaisons possibles. Les calculs tiennent compte du pH et de la température.

1.2. Echantillonnage du matériel végétal

Les plantes sont échantillonnées séparément. Pour chaque plante, trois échantillons sont constitués. Ils correspondent aux racines, tiges et feuilles.

Les racines sont rincées dans du milieu Hoagland N°2 1/10 additionné ou non d'EDTA (1 mM) ou d'H-EDTA (1 mM). Dans ces deux derniers cas, elles sont immergées pendant 1h à

température ambiante avec agitation (100 tour/min). Les tiges ailées sont découpées en fragments de 5 cm de long environ. Les vrilles des feuilles ont été éliminées.

Tous les échantillons sont pesés immédiatement après l'échantillonnage pour obtenir la masse fraîche.

Les échantillons destinés aux études moléculaires sont rapidement emballés dans du papier d'aluminium, congelés à -176° dans l'azote liquide et conservés à -80° .

Les autres échantillons sont placés dans des tubes en plastique, et séchés à 35° pendant une semaine. Ils sont pesés avant d'être utilisés pour les analyses élémentaires.

2. Analyses morphologiques et physiologiques

2.1. Croissance des racines et des tiges

La croissance des plantes est déterminée par mesures répétées des longueurs moyennes des racines principales et de la tige (Tableau 6).

Tableau 6 : Fréquence des mesures de longueur des racines et des tiges de *Lathyrus sativus* dans les différentes cultures

	1	2	3
fréquence des mesures de la longueur des racines et des tiges	à 0, 4, 7, 11, 14 et 18 jours de culture	à 0, 24, 48, 72 et 96 h de culture	à 0, 8 et 14 jours de culture

1 : expérience de mise au point

2 : traitement de courte durée (96 h)

3 : traitement de longue durée (14 jours)

De plus diverses observations sont faites telles que :

- pour les racines : leur couleur, le nombre de ramifications, leur aspect.
- pour les feuilles : leur nombre, leur surface, leur état (jaunissement, nécroses...).

Les plantes sont photographiées à chaque point de mesure et avant chaque prélèvement.

2.2. Indice de tolérance

Un indice dit de tolérance (Tolerance Index, TI) est calculé à partir de la longueur des racines.

Il permet de comparer la capacité des plantes à pousser dans un milieu de culture liquide

contaminé, dans notre cas par le plomb, par rapport aux plantes poussant dans un milieu non traité. La formule de cet indice est la suivante : $TI (\%) = (\text{taille moyenne des racines des plantes traitées} / \text{taille moyenne des racines des plantes témoins}) \times 100$ (Wilkins, 1957).

2.3. Contenu relatif en eau

Le contenu relatif en eau est mesuré à partir des masses fraîche (FW), turgescente (TW) et sèche (DW) d'un matériel végétal, les feuilles le plus souvent. Il est donné par l'équation de Barrs and Weatheley (1968):

$$RWC (\%) = [(FW-DW)/(TW-DW)] \times 100.$$

La masse fraîche est mesurée immédiatement après le prélèvement des feuilles. La masse turgescente est obtenue après 24h de contact de la feuille avec du papier filtre humide, en atmosphère confinée, à 4° et à l'obscurité. La masse sèche est obtenue après 48 h de séchage dans une étuve à 60° (poids constant).

3. Analyses moléculaires

3.1. Broyage des échantillons

Les échantillons de racines, tiges et feuilles conservés à -80° sont transférés à -176° dans de l'azote liquide. Ils sont broyés en poudre fine dans un mortier à l'aide d'un pilon, en présence d'azote liquide. Les mortiers et pilons, réservés au *Lathyrus sativus* ont préalablement été trempés pendant une demie heure dans l'hypochlorite de sodium à 2 %, rincés, séchés et chauffés dans un four à 180° pendant 2 h. Les poudres sont transférées des mortiers dans des tubes de 2 mL, préalablement refroidis à -176°, et conservées à -80°.

3.2. Extraction des ARN totaux

Les extractions d'ARN totaux se font avec du matériel stérile garanti sans RNase.

Les ARN totaux sont extraits à partir de 100 mg de poudre de racines, tiges et feuilles de *Lathyrus sativus* L., à l'aide du kit « RNeasy Plant Mini Kits » (Qiagen, France). A la poudre est ajouté un tampon contenant de l'isothiocyanate de guanidine (GITC) qui dénature et inactive les RNases. La solution contenant les ARN totaux est déposée sur une colonne

fournie dans le kit. Elle est composée d'un gel de silice, car le kit utilise la technologie « QIAGEN silica-gel–membrane silice »

(http://www1.qiagen.com/resources/info/qiagen_purification_technologies_1.aspx).

Les ARNs se lient sélectivement à la membrane par liaison entre le groupement OH des nucléotides et la silice. Après lavage de la colonne, les ARN totaux sont élués de la colonne de silice à l'eau distillée sans RNase (50 µL).

Les ARN sont purifiés (RNA cleanup) dans le but d'éliminer les ARN de taille inférieure à 200 nucléotides, comme les ARNr 5.8S, les ARNr 5S et les ARNt. Un traitement à la DNase I (Quiagen) est effectué sur colonne pour éliminer les fragments d'ADN génomique éventuellement co-purifiés avec les ARN totaux.

Les ARN totaux des extraits sont ensuite dosés au spectrophotomètre (Nanodrop, Noryx) à 260 nm (A_{260}). Pour cette quantification l'équation de Beer-Lambert est modifiée afin que le coefficient d'extinction utilisé ait comme unité des ng-cm/ml : $c=(A \times e)/b$. Où 'c' est la concentration en acides nucléiques (ng/ml), 'A' est l'absorbance, 'e' le coefficient d'extinction dépendant de la longueur d'onde (ng-cm/µl) et 'b' est le trajet optique. Dans le cas des ARNs la valeur de 'e' est 40 ng-cm/µl et celle de 'b' 1 mm.

3.3. Dessin des amorces pour l'isolement des ADNc d'intérêt

Les séquences nucléotidiques correspondant aux ADNc ou gènes d'intérêt préalablement isolés d'espèces végétales proches du *Lathyrus* (si possible de Fabacées), sont identifiées et via GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Les séquences sont alignées grâce au programme « Clustalw » (http://www.infobiogen.fr/services/analyseq/cgi-bin/clustalw_in.pl) et les zones consensus sont identifiées. Dans ces régions, des séquences de 18 à 21 nucléotides sont sélectionnées. Des amorces dégénérées sont déduites et analysées par le programme « net primer launch »

(www.premierbiosoft.com/netprimer/netprlaunch/netprlaunch.html) afin d'évaluer leur valeur comme amorces PCR potentielles.

Ce programme détermine :

- le pourcentage de résidus G et C (qui doit être voisin de 50 %)
- le Tm (ou melting temperature), c'est-à-dire la température à laquelle l'appariement des oligonucléotides à la matrice d'ADN est optimal
- le delta H des conformations en épingle à cheveux si elles existent
- le delta H des homodimères susceptibles de se former

- la présence de palindromes

Les séquences oligonucléotidiques retenues sont commandées auprès de la compagnie MWG-Biotech AG (Ebersberg, Allemagne).

3.4. Isolement des ADNc partiels et complets

3.4.1. Transcription inverse

La réaction de transcription inverse (RT) est réalisée à l'aide du kit « Omniscript RT Kit » (Qiagen, France). Les ARN totaux sont préalablement chauffés pendant 5 min à 65° afin de les 'linéariser'. Ils sont traités avec 50 µL de mélange réactionnel contenant 500 µM de chaque dNTP, 1 µM d'amorce oligo-dT, 10 unité du mélange d'enzymes (reverse transcriptase), 25 unités d'inhibiteur de RNase et 5µL de tampon concentré 10×. Les échantillons sont homogénéisés et incubés à 37° pendant 1 h, comme préconisé par le fabricant. Pour l'isolement d'ADNc partiel de *Lathyrus sativus*, 500 ng d'ARN totaux provenant des différents extraits sont utilisés. Lors des analyses d'expression la quantité d'ARN totaux de départ est de 1400 ng.

3.4.2. Polymerase Chain Reaction (PCR)

Les volumes réactionnels utilisés sont de 20, 25 ou 50 µL. Ils contiennent entre 5 et 100 ng d'ADN matrice selon les applications, 10 à 20 pmol de chacune des amorces, ½ volume de « PCR Master Mix » 2× (Proméga, France) et de l'eau distillée stérile. Le PCR Master Mix est composé de *Taq* DNA Polymerase (*Thermus aquaticus* polymérase) à 50 unités/ml, de 400 µM de chacun des dNTP, de 3 mM de MgCl₂ et d'un tampon de réaction (pH 8.5).

Les réactions de PCR sont réalisées dans le thermocycler « Mastercycler Gradient » (Eppendorf) selon les programmes suivants :

- dénaturation : 95°C, 15min
- 30 ou 35 cycles : dénaturation : 95°C, 40sec ; appariement : température variable selon les amorces, 30sec ; polymérisation : 72°C, 30 sec à 1 min 30 sec (selon la taille du fragment à amplifier)
- extension finale : 72°C, 10min
- conservation : 18°C

3.4.3. Réaction de RT-PCR

Pour l'isolement des ADNc, le kit « One step RT-PCR » (Qiagen, France) permet de réaliser les deux réactions de RT puis d'amplification PCR en une seule étape.

Les mélanges réactionnels se composent, suivant le protocole du fabricant, de 10 µl de tampon 5× concentré, (contenant 12,5 mM de MgCl₂), de 400 µM de chaque dNTP, de 2 µl d'un mélange enzymatique (dont la concentration est propriété industrielle de Qiagen), de 15 pmol de chacune des amorces, de 0,5 µg d'extrait d'ARN totaux, qsp 50 µl avec de l'eau sans RNase.

Les réactions RT-PCR sont réalisées dans le thermocycler « Mastercycler Gradient » (Eppendorf) selon le programme suivant :

- transcription inverse : 50°, 30 min
- activation initiale de la PCR : 95°, 15 min
- 35 cycles : dénaturation : 94°, 40 sec ; appariement : température variable selon les amorces, 40 sec ; polymérisation : 72 °, 30 sec à 1 min 30 sec (selon la taille du fragment à amplifier)
- extension finale : 72°, 10 min
- conservation : 18°

3.4.4. Purification des produits PCR (amplicons)

Pour certaines applications, les séquences nucléotidiques amplifiées par PCR ont été purifiées avec le kit « QIAquick PCR purification Kit » (Quiagen, France). Ce système basé sur la chromatographie d'affinité, comprend une colonne de silice qui adsorbe l'ADN en présence d'une forte concentration en sels alors que les contaminants, tels que les amorces, les nucléotides, les polymérases et les sels, passent librement à travers la colonne. Avant d'être déposé sur la colonne, le produit PCR est mélangé à un tampon de liaison qui optimise l'accroche des fragments d'au moins 100 pb. L'ADN est élué dans de l'eau sans nucléase.

3.4.5. Analyses des produits PCR (amplicons)

Les fragments d'ADN amplifiés par réaction PCR sont séparés et analysés par électrophorèse sur gel d'agarose (Sigma, France) à 1% dans du tampon TAE 1× (Tris 0.04 M ; EDTA 0.001 pH 8.0), contenant du bromure d'ethidium (BET) (0,60 µg.mL⁻¹). Les deux marqueurs de taille utilisés sont les Smart Ladder® (Eurogentec, France) de 100 à 1000 pb et de 200 à 10000 pb pour le grand.

3.5. Amplification de l'extrémité 5' et 3' de l'ADN complémentaire

Cette technique appelée RACE permettent d'obtenir un ADNc complet à partir d'un d'ADNc partiel. Cette amplification se réalise en plusieurs étapes avec le kit « 5'/3' RACE Kit, 2nd Generation » (Roche, France) :

3.5.1. Amplification de l'extrémité 5' de l'ADNc

1/ Le premier brin d'ADNc est synthétisé dans un volume de 20 µL à partir de 0.2 à 2 µg d'ARN totaux, en utilisant une première amorce spécifique anti sens SP1 de l'ADNc partiel déjà isolé, une enzyme (Transcriptor Reverse Transcriptase), un mélange de dNTP, un tampon de synthèse d'ADNc et de l'eau distillée (Fig. 11). Ce mélange est incubé 1 h à 55° et 5 min à 85°.

2/ Ce premier brin d'ADNc est purifié grâce au kit de purification « High Pure PCR Product Purification Kit » (Roche, France). Les nucléotides non utilisés et les amorces restantes sont ainsi éliminés.

3/ Une queue polyA est ensuite ajoutée à l'extrémité 5' terminale de l'ADNc. Pour cela 19 µL de l'échantillon d'ADNc purifié précédemment sont mélangés avec un tampon 10× concentré et incubée 3 min à 94°. Ensuite la 'terminal transférase' est ajoutée et le tout est incubé 20 min à 37°. L'enzyme est inactivée par passage à 70° pendant 10 min.

4/ L'amorce « d'accroche » « Oligo dT-anchor », qui va pouvoir se lier à la queue polyA, et une deuxième amorce spécifique de l'ADNc déjà isolé SP2 (10 pmol) sont utilisées pour la première amplification PCR. Cette réaction (50 µL) se fait à partir de 5 µL d'ADNc ayant la queue polyA, de 1 µL de dNTP, de 2.5 unités de Taq polymérase, de tampon de réaction 10× concentré et d'eau distillée. Le programme PCR est identique à celui décrit précédemment (paragraphe 3.4.2.), sauf pour l'étape de dénaturation qui est plus courte (2 min).

5/ Une seconde PCR est faite afin d'augmenter les chances d'obtenir le fragment d'intérêt. Le protocole est le même que pour la première PCR en remplaçant la matrice par 1 µL de produit de la première PCR et avec une amorce spécifique de « Oligo dT-anchor » : « PCR anchor », et une troisième amorce spécifique de l'ADNc déjà isolé SP3 (10 pmol).

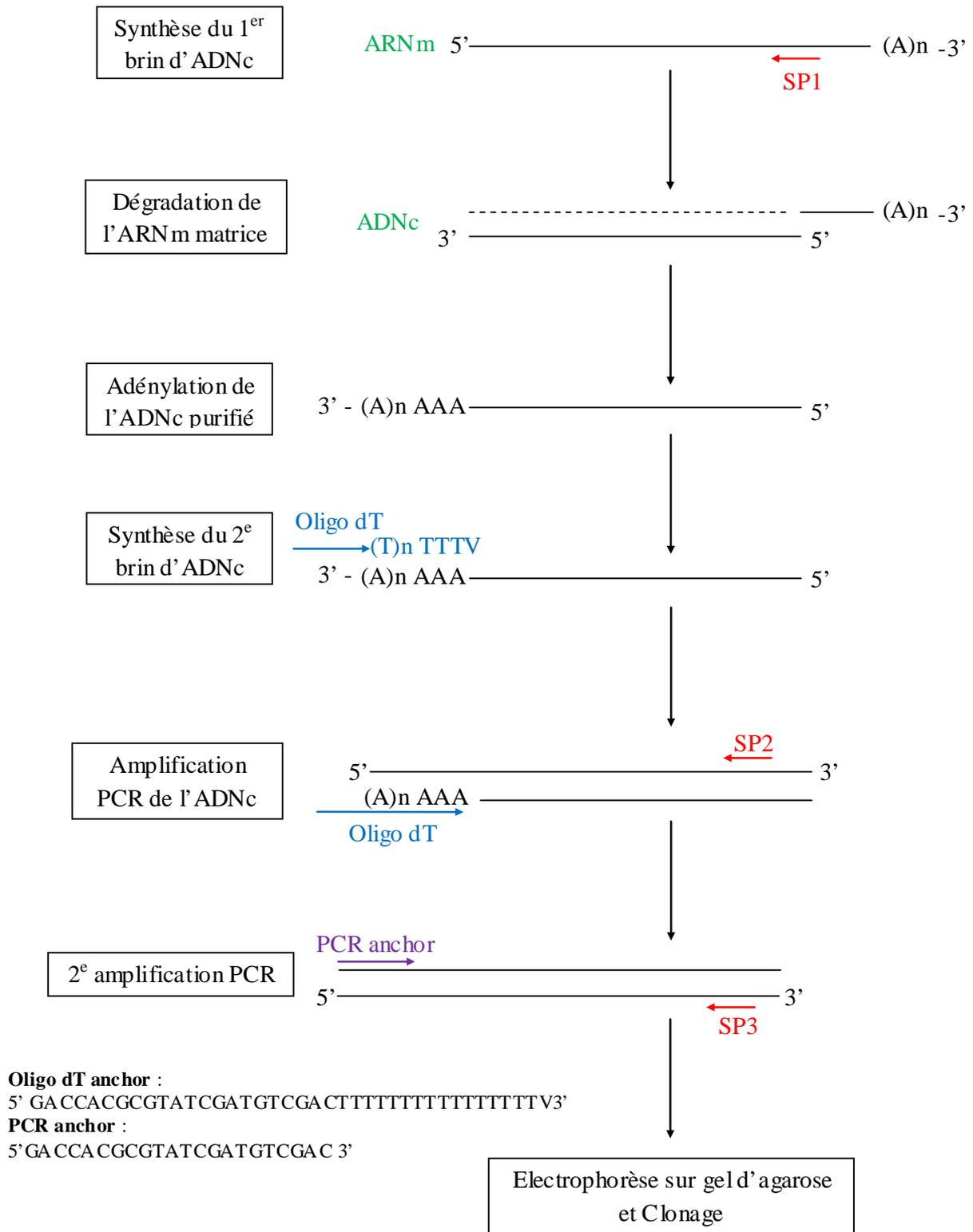


Figure 11 : Diagramme des différentes étapes de la réaction 5' RACE. Les amorces « oligo dT anchor » et « PCR anchor » sont fournies avec le kit (5'/3' RACE Kit, Roche, France). Les amorces SP1, SP2 et SP3 sont des amorces spécifiques du gène d'intérêt. V = A, C ou G.

3.5.2. Amplification de l'extrémité 3' de l'ADNc

Elle est réalisée avec le kit « 5'/3' RACE Kit, 2nd Generation » (Roche, France) mais elle est plus simple car l'ARN messager (ARNm) possède déjà une queue polyA à cette extrémité (Fig. 12).

1/ Le premier brin d'ADNc est synthétisé en utilisant l'amorce d'accroche « Oligo dT-anchor » qui se fixe à la queue polyA de l'ARNm. Les 20 µL de solution contiennent : 0.5 à 2 µg d'ARN totaux, 4 µL de tampon réactionnel, 2µL d'un mélange de dNTP, 1 µL de l'amorce « Oligo dT-anchor », 1 µL de l'enzyme « transcriptase inverse » et d'eau distillée. Le tout est incubé 1 h à 55° puis 5 min à 85°.

2/ Une PCR est réalisée avec l'ADNc obtenu comme matrice, l'amorce spécifique de « Oligo dT-anchor » et une amorce spécifique de l'ADNc déjà isolé SP4 (10 pmol). Le protocole est le même que pour la 5'Race.

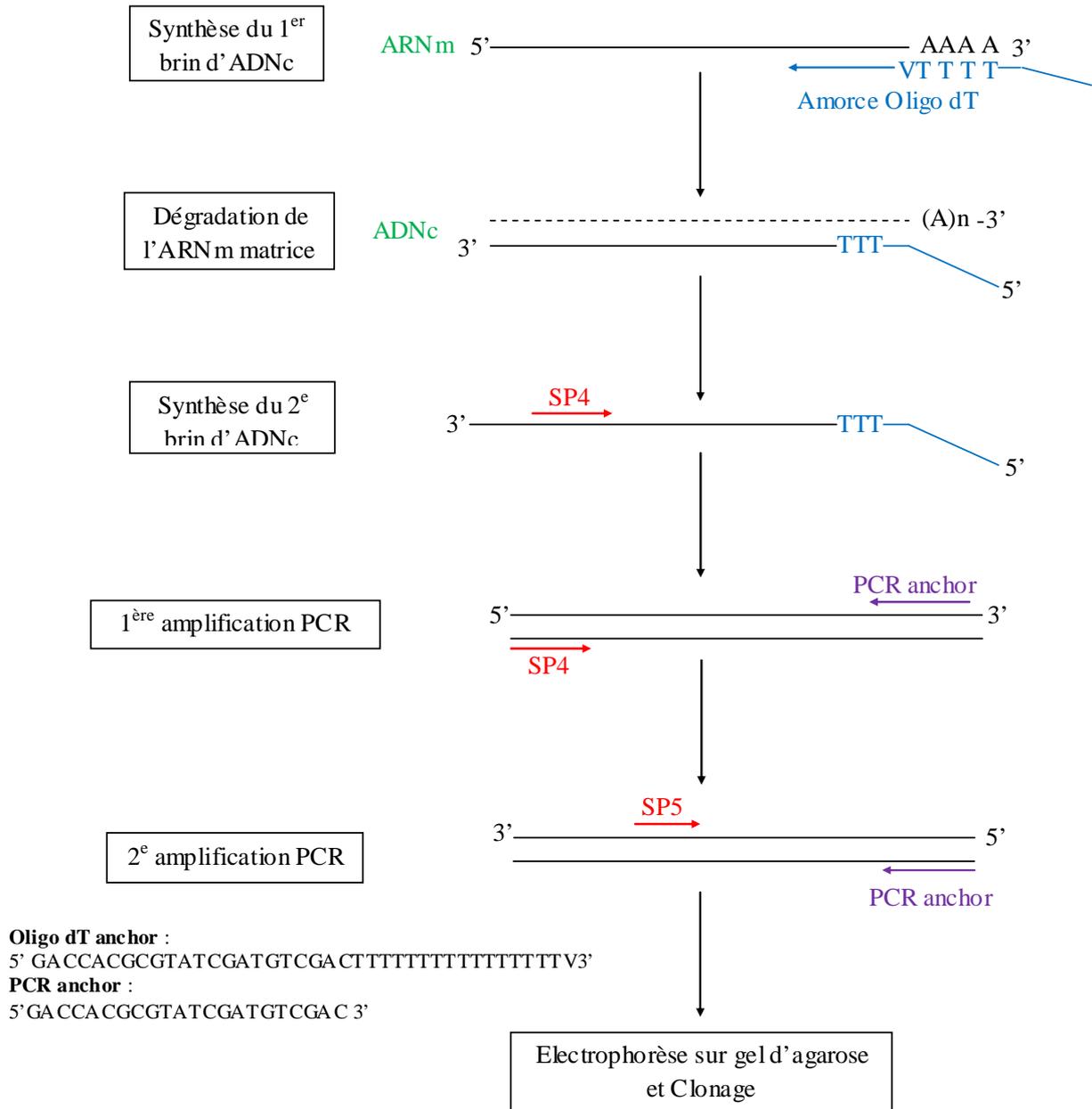


Figure 12 : Diagramme des différentes étapes de la réaction 3' RACE. Les amorces « oligo dT anchor » et « PCR anchor » sont fournies avec le kit 5'/3' RACE (5'/3' RACE Kit, Roche, France). Les amorces SP4 et SP5 sont des amorces spécifiques du gène d'intérêt. V = A, C ou G.

3.6. Clonage des produits d'amplification

3.6.1. Ligation de produits d'amplification PCR dans un vecteur de clonage plasmidique

Le vecteur de clonage utilisé est le pGEM-TEasy (Promega, France) (annexe 3).

Il s'agit d'un système de clonage A/T permettant de sélectionner les clones bactériens recombinants (blancs) (annexe 3).

Les réactions de ligation se font dans un volume de 10 µL comprenant :

- 50 ng de vecteur pGEM-TEasy
- une quantité équimolaire de produit PCR, calculée par la formule :

$$\text{quantité d'insert (ng)} = \frac{\text{quantité de vecteur (ng)} \times \text{taille de l'insert (kb)}}{\text{taille du vecteur (kb)}}$$

- du tampon de ligation concentré 2×
- 3 unités d'enzyme « T4 DNA ligase »
- de l'eau distillée stérile

Les réactions se déroulent à température ambiante pendant 1 h ou à 4° pendant 4 h minimum.

3.6.2. Préparation des bactéries compétentes pour la transformation

Les bactéries sont rendues compétentes après un traitement au CaCl₂ qui induit une augmentation de la perméabilité membranaire des bactéries hôtes..

Une culture bactérienne d'*Escherichia coli* GT869 est faite dans 120 ml de LB (annexe 4) à 37° avec une agitation à 150 tour/min jusqu'à une absorbance à λ = 600 nm de A = 0.5. Après centrifugation pendant 10 min à 4000 tour/min à 4°, le culot est suspendu dans 60 ml de CaCl₂ 50mM. Ce mélange est maintenu pendant 10 min dans de la glace avant d'être à nouveau centrifugé 10 min et ressuspendu dans 6 ml de CaCl₂. Cette suspension bactérienne est agitée toute la nuit dans de la glace dans une chambre froide à 4° avant utilisation. Afin de conserver les bactéries à -80°, 6 ml de glycérol 30 % sont ajoutés et la solution est aliquotée.

3.6.3. Transformation de bactéries compétentes par choc thermique

La transformation de cellules d'*Escherichia coli* GT869 par choc thermique est réalisée en mélangeant 100 µL de bactéries GT869 compétentes avec 2 µL d'une réaction de ligation, en suivant le protocole suivant :

- 5 min dans la glace (4°)
- 5 min à 37°

- 1 min dans la glace (4°)

400 µL de milieu nutritif riche SOC liquide (annexe 4) sont ajoutés. Les cellules sont cultivées à 37° avec agitation douce (100 rpm) pendant 20 min (une génération).

La sélection des transformants est effectuée par étalement de 100 µL ou 200µL de suspension bactérienne sur milieu LB solide (annexe 4) additionné de carbénicilline (100 µg.mL⁻¹, agent de sélection), d'un inducteur de l'opéron lactose, l'isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside (IPTG ; 100mM), d'un substrat de la b-galactosidase, le 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside (X-Gal ; 4 % M/V). Les bactéries sont ensuite incubées à 37° pendant 16 h.

3.6.4. Préparation de l'ADN plasmidique

La composition du plasmide est analysée après amplification et purification. Pour la préparation d'ADN plasmidique, les clones bactériens sont isolés et mis en culture dans 3 mL de milieu LB additionnés de carbénicilline (100 µg.mL⁻¹), à 37°, pendant 16 heures sous agitation (150 rpm). L'ADN plasmidique est extrait au moyen du kit « Miniprep wizard plus SV » (Promega, France). La solution « Cell Lysis Solution » provoque la lyse des cellules bactériennes. Une protéase alcaline inactive les endonucléases et autres protéines intracellulaires qui pourraient affecter la qualité de l'ADN isolé. Cet extrait bactérien brut est déposé sur une colonne d'affinité pour l'ADN plasmidique. La colonne est lavée avec une solution (« Column Wash »), contenant de l'éthanol à 95%. L'ADN plasmidique est élué avec de l'eau sans nucléase.

Les teneurs en ADN plasmidique obtenues sont mesurées au Nanodrop à $\lambda = 260$ nm.

3.6.5. Séquençage d'ADN

Le séquençage est réalisé sur les deux brins d'ADN d'intérêt à partir des amorces universelles T7 et SP6 du plasmide hôte (Genoscreen ; Lille, France). Les séquences sont vérifiées par examen des chromatogrammes fournis.

3.6.6. Analyse des séquences nucléotidiques

Les séquences nucléotidiques sont analysées sur BlastX (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) et Fasta (<http://www.ebi.ac.uk/fasta33/>) pour l'identification de la séquence d'intérêt par alignement de séquences connues.

3.7. Etudes de l'expression des gènes d'intérêt par les techniques de PCR semi quantitative et quantitative (PCR en temps réel ou qPCR)

3.7.1. Préparations faites avant les réactions d'amplification

Pour être à même d'observer les différences d'expression, certaines précautions ont été prises :

- Les solutions d'ARN totaux ont systématiquement été normalisées à $60 \text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, de sorte qu'un même volume d'extrait d'ARN a été utilisé dans les réactions de transcription inverse (qui ont toutes été réalisées à partir de 1400 ng d'ARN totaux).
- Un volume constant de réaction RT a systématiquement été utilisé comme matrice dans les réactions de PCR.
- Les amorces ont été testées afin de vérifier l'absence de dimères.

3.7.2. Choix du gène de référence

Le gène de référence doit être exprimé de manière constante (constitutive) quel que soit le traitement et l'échantillon. Les gènes codant la protéine ribosomale S19, la tubuline A et la polyubiquitine, ont été testés. Seul le gène codant la polyubiquitine s'est avéré constitutif dans nos conditions expérimentales, il a été retenu.

3.7.3. Optimisation des réactions de PCR semi-quantitative

Il est nécessaire d'optimiser la réaction PCR afin d'atteindre dans la phase linéaire de la courbe d'amplification du fragment d'intérêt.

Les réactions de PCR sont multiparamétriques. Les paramètres qu'il est aisé de modifier pour optimiser les réactions de PCR semi-quantitatives sont : le nombre de cycles, la température d'appariement des amorces à la matrice, la quantité de matrice RT (sachant que sur recommandation du fabricant, le volume de produit RT ne doit pas excéder 1/10 du volume réactionnel final). Différents nombres de cycles (20, 25, 30 cycles) sont testés afin d'obtenir celui où l'amplification se produit au cours de la phase exponentielle et non pas au niveau du plateau.

La quantité d'amplicons du produit de réaction PCR est visualisée par électrophorèse sur gel d'agarose.

3.7.4. La réaction de PCR en temps réel

La réaction de PCR en temps réel ou qPCR est une technique quantitative qui permet d'analyser finement l'expression de gènes d'intérêt. La courbe d'amplification est donnée par la fluorescence mesurée à 530 nm en fonction du nombre de cycles. Les valeurs de calcul pourront donc être prises avant le point d'inflexion c'est à dire quand la quantité d'amplicons mesurée est encore directement proportionnelle à la quantité de départ.

Cette réaction est réalisée dans des capillaires de 20 µL (« Light Cycler® Capillaries » ; Roche, France). Le mélange réactionnel de 10 µL contient 1 ou 2 µL d'ADNc (≈50 ng d'ARN totaux), 5 pmol de chacune des deux amorces spécifiques et 2 µL de « Light Cycler® Fast Start DNA Master^{PLUS} SYBR Green 1 » 5× contenant le tampon et l'enzyme « FastStart Taq DNA Polymerase » (Roche, France).

Les réactions de qPCR sont réalisées dans l'appareil LightCycler 2.0 (Roche, France) selon le programme suivant :

- activation initiale de la PCR : 95°, 10 min
- 40 cycles : dénaturation : 95°, 20 sec ; appariement : température variable selon les amorces, 20 sec ; polymérisation : 72 °, 20 sec

La courbe de fusion est établie entre 54 et 95° afin de vérifier pour chaque réaction d'amplification la spécificité de l'amplification.

L'expression relative du gène d'intérêt est donnée par l'équation suivante :

$$\text{Expression relative} = \frac{E^{(Ct_{\text{gène cible de l'échantillon témoin}} - Ct_{\text{gène cible de l'échantillon traité}})}{E^{(Ct_{\text{gène de référence de l'échantillon témoin}} - Ct_{\text{gène de référence de l'échantillon traité}})}}$$

Où E et E' sont respectivement les efficacités d'amplification du gène cible et du gène de référence et Ct le nombre de cycles après lequel la fluorescence atteint une valeur seuil fixé par l'appareil.

4. Analyse des éléments chimiques contenus dans les tissus de plantes de *Lathyrus sativus*

4.1. Minéralisation des tissus végétaux

La minéralisation a pour but de détruire tous les composés organiques des échantillons. Cette technique n'ayant jamais été utilisée sur des échantillons de *Lathyrus sativus*, le protocole suivi a été celui utilisé pour les algues par l'équipe du Centre d'Enseignement et de Recherche sur l'Eau, la Ville et l'Environnement (CEREVE, Université Paris Est, France).

L'efficacité des procédures de minéralisation et d'analyse des éléments chimiques élémentaires est vérifiée par référence à un échantillon certifié de feuilles de tabac contaminé par des teneurs pré-établies d'une série d'éléments traces dont le Pb fait partie (LGC Standards, France).

Deux techniques de minéralisation ont été utilisées l'une après l'autre, ce changement correspond à un renouvellement de l'équipement utilisé pour la minéralisation. La première technique utilisait des bombes en téflon réutilisables et un chauffage avec mise sous pression, la deuxième quant à elle utilise des tubes jetables et un système de chauffage sans mise sous pression.

4.1.1. Minéralisation sous pression et par chauffage

Les échantillons de *Lathyrus* préalablement séchés (environ 100 mg) sont placés individuellement dans des bombes en téflon, dans lesquelles sont ajoutés 8 mL d'acide nitrique suprapur (65 % m/v ; Merck, France), traitement pendant une durée de 12h. Les bombes sont ensuite hermétiquement fermées et la digestion continue sous pression par chauffage dans un micro-onde. Le programme de chauffage est le suivant 2 min à 250 W, 2 min à 0 W, 5 min à 250 W, 5 min à 400 W et 5 min à 500 W. Le volume des échantillons minéralisé est ensuite ajusté à 30 mL avec de l'eau pure (Elga LabWater, France). Dans le but d'être réutilisées les bombes subissent un lavage avec du détergent puis de l'acide nitrique afin d'éliminer tous les contaminants possibles.

4.1.2. Minéralisation par chauffage

Les échantillons préalablement séchés (environ 100 mg) sont placés individuellement dans des tubes en polypropylène de 50 mL. 5 mL d'acide nitrique ultrapure (65 % m/v ; Merck, France) sont ajoutés et le volume complété à 50 mL avec de l'eau pure

(Elga LabWater, France), le mélange est chauffé pendant 2 h 30 min à 95°. Le même protocole est répété avec 8 mL d'eau oxygénée (30% v/v ; Merck, France). Si nécessaire (persistance de particules dans l'échantillon), d'autres étapes avec 5mL d'acide nitrique sont réalisées. Le volume des échantillons minéralisés est ensuite ajusté à 50 mL avec de l'eau pure (Elga LabWater, France).

4.2. Analyses élémentaires quantitatives

Les échantillons minéralisés, dilués ou non, sont analysés par ICP-OES (inductively coupled plasma optical emission spectroscopy) avec le logiciel « Varian Vista MPX ». Les différents éléments quantifiés sont : le Pb, le Ca, l'aluminium (Al), le bore (B), le cobalt (Co), le chrome (Cr), le cuivre (Cu), le fer (Fe), manganèse (Mn), le magnésium (Mg), le molybdène (Mo) et le zinc (Zn).

5. Microscopie électronique à balayage

Les fragments d'organes végétaux sont placés dans une enceinte sous vide et recouverts de platine par vaporisation. L'examen des échantillons est réalisé au moyen d'un microscope électronique à balayage (JEOL JSM-6301-F).

PARTIE 3 :

RÉSULTATS

CHAPITRE I :
MISE AU POINT D'UN NOUVEAU SYSTÈME
EXPÉRIMENTAL POUR LA CULTURE
HYDROPONIQUE DE *Lathyrus sativus* L.

1. Introduction

Le *Lathyrus sativus* est connu par les agriculteurs d'Inde, d'Ethiopie et du Bangladesh pour ses nombreuses capacités de résistance (Kaul *et al.*, 1986; Campbell *et al.*, 1993; Hoque *et al.*, 1996) mais peu d'études ont été réalisées pour en déterminer les caractéristiques.

Des études préliminaires ont montré que la germination des graines posait problèmes ce qui nous a conduit à mettre au point un protocole adapté à cette plante. L'étude de la phénologie du *Lathyrus sativus* a été menée lors d'une culture sur tourbe et vermiculite arrosée régulièrement puis lors d'une contrainte hydrique.

Dans le cadre de la généralisation du concept d'« autolyse cellulaire adaptative » (ACA) établie par le laboratoire, le *Lathyrus sativus* a été étudié au niveau physiologique. Trois lignées de *Lathyrus sativus* ont été choisies : 'Bangladesh', 'Raipur' et 'Adet' (D. Laffray, communication personnelle), originaire respectivement du Bangladesh, d'Inde et d'Ethiopie. Ces travaux ont permis de montrer que les trois lignées présentent des capacités de résistance à la contrainte hydrique variables : la lignée 'Bangladesh' s'est avérée la plus sensible et la lignée 'Raipur' la plus résistante. Ces deux lignées ont été sélectionnées pour la suite de notre étude.

Les plantes de *Lathyrus sativus* étant plurirésistantes : à la sécheresse, à l'inondation ou à la pauvreté des sols, dans ces conditions il a paru possible que cette plante puisse présenter également une capacité de tolérance à la présence d'un métal lourd comme le plomb (Pb), dans le sol. Nous avons donc entrepris des expériences destinées à caractériser la réponse au Pb du *Lathyrus sativus*. Pour ce faire, la culture hydroponique a été utilisée car elle permet de contrôler la quantité de Pb disponible pour la plante dans le milieu. De plus cette technique pourrait ne pas être délétère pour la plante (anoxie) puisque certaines lignées sont cultivées dans des régions inondables.

La mise au point d'un protocole de culture hydroponique, a donc été le préalable indispensable aux études sur l'éventuelle capacité du *Lathyrus sativus* à résister à la pollution du sol par le Pb.

2. Mise au point du protocole de germination des graines de *Lathyrus sativus*

Les deux lignées 'Bangladesh' et 'Raipur' de *Lathyrus sativus* ont été utilisées.

Les conditions étudiées sont les suivantes :

- Préparation des graines avant la germination : durée du trempage dans de l'eau courante, à 4° et à l'obscurité (0, 4 ou 15 jours), stérilisation puis scarification des graines suivit ou non d'une immersion dans l'eau distillée stérile.
- Milieu de germination : papier humidifié avec de l'eau distillée stérile ou du milieu de Murashige et Skoog (MS) (Duchefa Biochemie Kalys, France).
- Condition de germination (à 18°) : à l'obscurité pendant 24 h, puis à la lumière pendant 48h ou uniquement à la lumière pendant 4 à 8 jours.

Les deux lignées ont des taux de germination semblables suivant les milieux. Protocole adopté : Les graines présentant le meilleur taux de germination, 90%, ont été trempées pendant 4 jours dans de l'eau courante à 4° et à l'obscurité, stérilisées, puis scarifiées avant d'être trempées une seconde fois pendant 16h dans de l'eau distillée stérile à température ambiante et finalement placées sur du milieu MS, en chambre de culture.

3. Phénologie du *Lathyrus sativus* et ses réponses à la contrainte hydrique

3.1. Conditions expérimentales

3.1.1. Conditions de culture du *Lathyrus sativus*

Des pots de dimensions 9 x 9 cm troués au fond et d'une masse de 84 ± 2 g ont été lavés puis désinfectés. Ils ont ensuite été remplis avec un mélange de tourbe blonde (Klasmann KTS2, France) et de vermiculite exfoliée (50/50, v/v), préalablement stérilisées à l'autoclave (120° ; 1bar ; 20min).

Le remplissage des pots est fait avec le mélange tourbe/vermiculite additionné d'eau courante. L'eau en excès s'égoutte des pots pendant une demi-journée, puis leur masse est réajustée à 610 g (capacité au champ).

Après germination, pour chaque lignée, 'Bangladesh' et 'Raipur', onze plantules de trois jours ont été repiquées à 3 cm de profondeur, dans les pots. Quatre granules d'engrais universel (Osmocote, Fertiligène) sont insérés dans le substrat. Les plantes sont ensuite arrosées tous les jours avec de l'eau courante.

Pour chaque lignée, deux plantes témoins, constamment irriguées, et neuf plantes soumises à une contrainte hydrique contrôlée ont été utilisées.

Les plantes ont été cultivées en conditions contrôlées (phytotron) : humidité relative moyenne de 60 %, température de 23° à l'obscurité et 26° à la lumière, photopériode de 16 heures d'éclairement et de 8 heures d'obscurité, intensité lumineuse de 400 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}^{-1}$.

3.1.2. Mesure du potentiel hydrique foliaire

Les mesures du potentiel hydrique foliaire (Ψ_w) ont été effectuées au moyen d'une chambre à pression de type Scholander (PMS Instruments, Corvallis, Oregon, USA) (Fig. 13). Cette technique permet de mesurer la pression dans les vaisseaux conducteurs (xylème).

Une feuille sectionnée est enfermée dans une chambre dont le volume est de 66 cm² et dans laquelle l'humidité relative est amenée à environ 100 % grâce à du papier filtre saturé en eau placé au fond. Seule l'extrémité du pétiole dépasse de l'extérieur. Un gaz inerte (azote) est introduit progressivement dans la chambre jusqu'à apparition d'une goutte de sève au niveau de la section du pétiole, correspondant au potentiel d'équilibre. La pression lue est l'inverse du potentiel du xylème, en bars sur le manomètre de la chambre, elle est convertie en MPa (1 MPa = 10 bars).

Les mesures de potentiel hydrique foliaire sont effectuées le matin avant le début de la photopériode : les stomates étant encore fermés, le potentiel hydrique foliaire est en équilibre avec celui du sol.

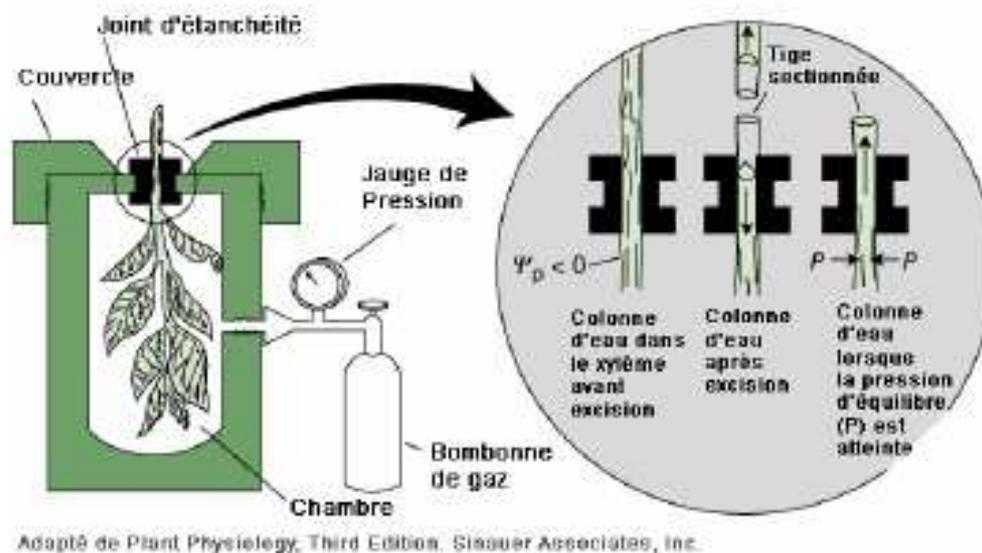


Figure 13 : Principe de la chambre à pression de Scholander (Taiz et Zeiger, 1991)

3.1.3. Induction du déficit hydrique

Il est imposé aux plantes par suspension d'arrosage au début de la troisième semaine après la mise en pot. Différents stades de sécheresse ont été déterminés :

- C : témoin arrosé : $\Psi_w = -0.6 \pm 0.05$ MPa
- sécheresse légère (S1) : $\Psi_w = -0.9 \pm 0.1$ MPa
- sécheresse moyenne (S2) : $\Psi_w = -1.5 \pm 0.1$ MPa

3.1.4. Prélèvement des échantillons

Les échantillons ont été prélevés à t1, t18 (en jours) pour les témoins (C) et à t25 et t29 pour les stades S1 et S2, respectivement.

Les vrilles et les fleurs ont été éliminées, et les feuilles sont rapidement coupées, déposées dans du papier aluminium puis congelées à -176° dans de l'azote liquide. Les tiges ailées sont découpées en fragments de 5 cm de long, enveloppées dans du papier aluminium puis congelées. Les échantillons sont conservés à -80° jusqu'à leur utilisation.

3.2. Résultats

3.2.1. Potentiel hydrique foliaire de base (Ψ_w) des plantes de *Lathyrus sativus* L. lignées 'Bangladesh' et 'Raipur' témoins et soumises à la sécheresse

Le sol des pots des plantes témoins a été maintenu à la capacité au champ durant toute la durée de l'expérience. De ce fait, la masse totale des pots (sol + plante + pot) a été de 630 ± 25 g pendant l'expérience. Pendant 22 jours de culture les plantes témoins ont maintenu un Ψ_w compris entre -0.6 et -0.8 MPa. Le Ψ_w diminue ensuite particulièrement pour la lignée 'Raipur', traduisant un manque d'efficacité racinaire (Fig. 14).

Pendant les 18 premiers jours de contrainte hydrique, le Ψ_w des plantes des deux lignées est équivalent à celui des témoins. Il chute à partir 18^{ème} jour jusqu'au 22^{ème}, puis se stabilise entre les 22 et 25^{ème} jours et diminue entre les 25 et 29^{ème} jours (Fig. 14).

Le stade S1 de sécheresse est atteint au 25^{ème} jour de sécheresse, avec un Ψ_w de -0.95 ± 0.05 MPa pour la lignée 'Bangladesh' et de -1.00 ± 0.05 MPa pour la 'Raipur' (Fig. 14). Le stade S2 est atteint au 28^{ème} jour de sécheresse avec un Ψ_w de -1.45 ± 0.1 MPa pour 'Bangladesh' et -1.55 ± 0.05 MPa pour 'Raipur' (Fig. 14).

Sur la durée entière du traitement, le Ψ_w de la lignée 'Bangladesh' diminue de 0.85 MPa (-0.6 à -1.45 MPa), et 0.95 MPa (-0.6 à -1.55 MPa) pour 'Raipur'. Après 29 jours de traitement, les tissus foliaires sont très sénescents et aucune mesure de Ψ_w , ni aucun échantillonnage n'est plus possible. Ces résultats semblent indiquer que la lignée 'Raipur' est plus sensible à la contrainte hydrique que la lignée 'Bangladesh' mais de façon limitée.

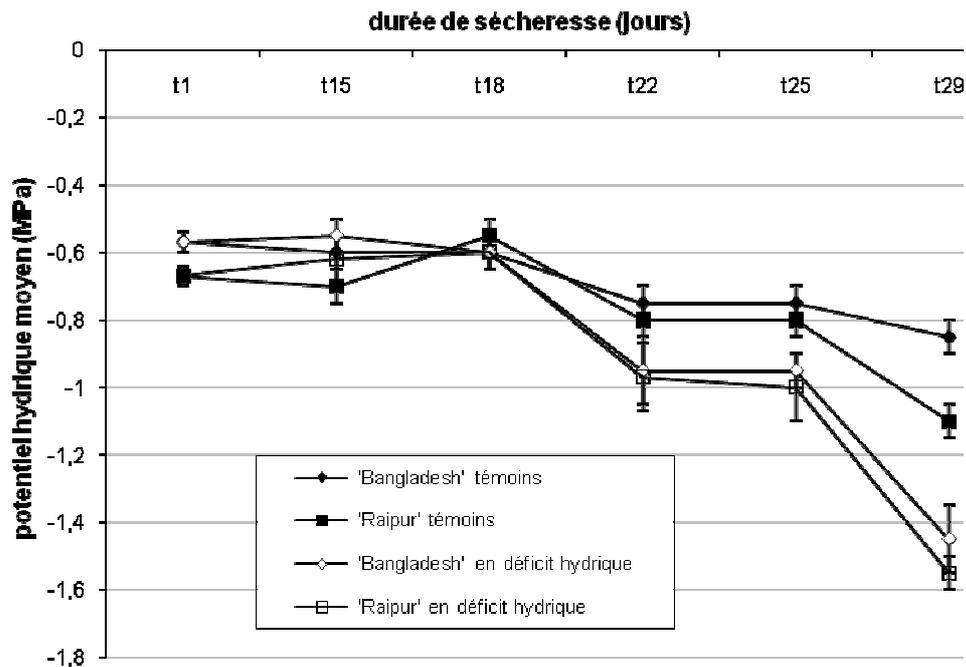


Figure 14 : Potentiel hydrique moyen chez le *Lathyrus sativus* en fonction de la durée de la sécheresse.

3.2.2. Morphologie et cycle de développement des plantes témoins lignées 'Bangladesh' et 'Raipur'

Après la germination, les plantules ont toutes survécu à la transplantation en pot et elles se sont ensuite développées normalement. La morphologie ainsi que le cycle de développement des deux lignées semblent différer, pour les critères suivants :

- le nombre de ramifications partant de la base de la tige principale : 4 à 5 pour les plantes de la lignée 'Raipur' et 2 à 3 pour celles de la lignée 'Bangladesh',
- la taille des feuilles est plus réduite chez 'Raipur',
- la hauteur des plantes (à t29) : 60 cm pour la lignée 'Bangladesh' et 50 cm pour la lignée 'Raipur',
- la date de l'entrée en floraison : 3 semaines après la mise en pot pour 'Raipur' et 4 semaines pour 'Bangladesh'.

Une fois la floraison initiée, il est aisé de différencier les plantes des deux lignées : les fleurs de 'Raipur' sont bleues tandis que celles de 'Bangladesh' sont rose pâle (Planche. III). Leur mode de fécondation (allogame ou autogame) n'est pas encore connu. Une fois fécondées, ces fleurs évoluent rapidement en gousses ailées déhiscents contenant 2 à 3 graines (Planche. IV).

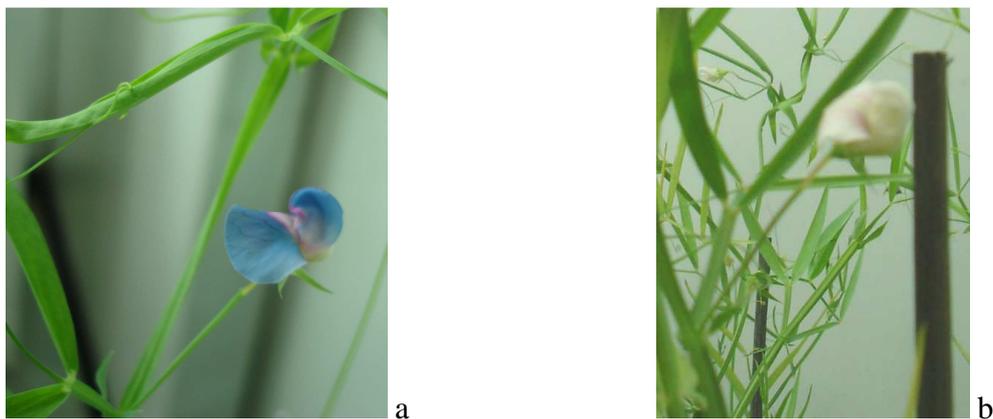


Planche III : Fleurs de *Lathyrus sativus* lignées 'Raipur' (a) et 'Bangladesh' (b).



Planche IV : Gousses de *Lathyrus sativus* lignées 'Raipur' (a) et 'Bangladesh' (b).

3.2.3. Phénologie des deux lignées de *Lathyrus sativus* L. ('Bangladesh' et 'Raipur') en réponse à la contrainte hydrique

Pendant les dix-huit premiers jours de contrainte hydrique par suspension d'arrosage, $-0,5 \geq \Psi_w \geq -0,7$ MPa pour les deux lignées (Fig. 14), l'aspect général varie peu par rapport à celui des plantes témoins irriguées régulièrement (Planche V). Par contre le déficit hydrique induit un raccourcissement du cycle de 'Raipur' de 10 jours par rapport aux plantes témoins.

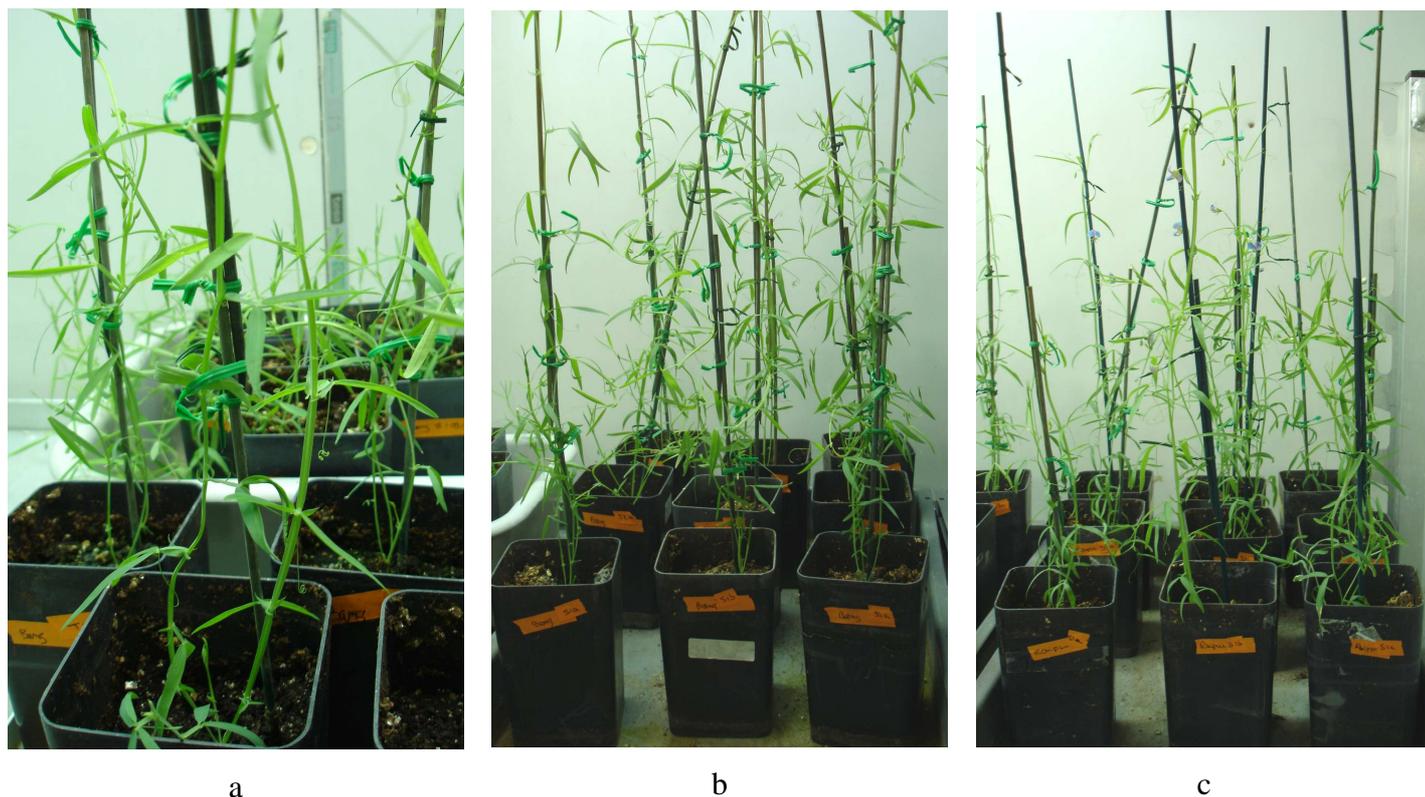


Planche V : Plantes de *Lathyrus sativus* après 36 jours de culture (t15) ; (a) : témoins ; (b) lignée 'Bangladesh' et (c) lignée 'Raipur' soumises à la contrainte hydrique.

Après les trois premières semaines de suspension d'arrosage ('Raipur' : $\Psi_w = -0.97 \pm 0.1$ MPa et 'Bangladesh' $\Psi_w = -0.95 \pm 0.1$ MPa), les feuilles des plantes contraintes flétrissent tout en restant vertes (Planche VI).

Au vingt-cinquième jour de suspension d'arrosage ('Raipur' : $\Psi_w = -1.00 \pm 0.05$ MPa et 'Bangladesh' $\Psi_w = -0.95 \pm 0.05$ MPa), les feuilles les plus vieilles commencent à sécher. Dans les jours qui suivent ('Raipur' : $\Psi_w = -1.55 \pm 0.05$ MPa et 'Bangladesh' $\Psi_w = -1.45 \pm 0.1$ MPa), ce phénomène s'étend rapidement au reste des feuilles qui jaunissent et se dessèchent (Planche VI). Ce phénomène est, quantitativement, plus prononcé chez 'Bangladesh' que chez 'Raipur'.

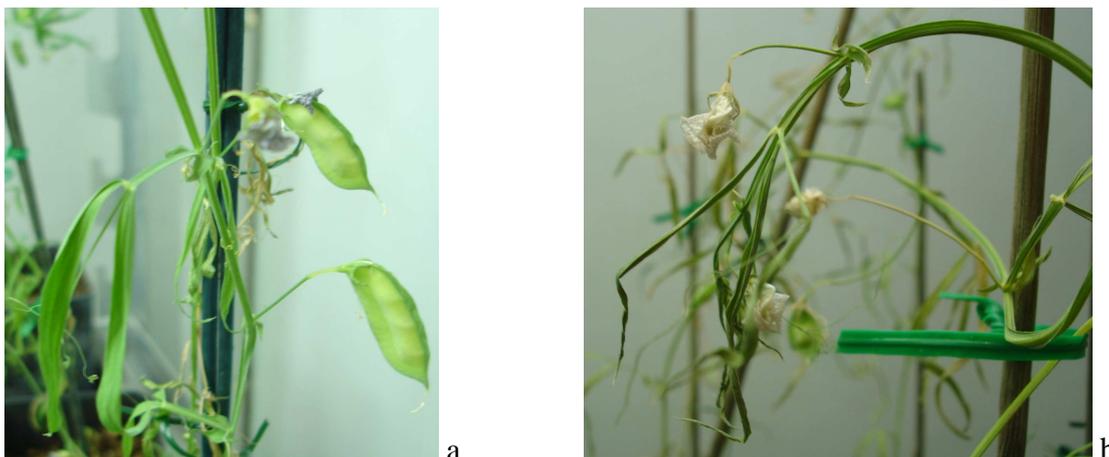


Planche VI : Effets de la contrainte hydrique sur les feuilles de la lignée 'Raipur' (a) et 'Bangladesh' (b) de *Lathyrus sativus* 29 jours après la suspension d'arrosage.

Pendant trois semaines sans arrosage, les plantes n'ont pas montré de modifications liées au déficit hydrique. Par contre au-delà de ce délai, leur état s'est détérioré de façon brutale en l'espace d'une semaine.

3.3. Discussion

A notre connaissance, aucune étude n'est disponible sur les caractéristiques physiologiques de *Lathyrus sativus* en général, et particulièrement concernant les lignées étudiées. Les seules données physiologiques disponibles sont celles rassemblées dans notre laboratoire (D. Laffray, communication personnelle). Ces données concernent les lignées 'Raipur' et 'Bangladesh' et montrent comme ici que le Ψ_w des plantes de la lignée 'Raipur' est légèrement inférieur à celui des plantes de la lignée 'Bangladesh'.

Les observations morphologiques sont également en accord avec ces précédents travaux et confirment une taille et une surface foliaire supérieures chez 'Bangladesh' par rapport à 'Raipur' et une mise à fleur plus précoce pour 'Raipur'. D'après les résultats il semblerait que 'Raipur' investisse dans une limitation de l'appareil végétatif et un cycle court. Cette plante, plus rustique que 'Bangladesh', pourrait développer une stratégie d'« évitement » de la contrainte hydrique.

Au niveau physiologique, le fait que le Ψ_w des plantes contraintes reste équivalent à celui des plantes témoins pendant les 18 premiers jours du traitement de sécheresse signifie que les plantes des deux lignées contrôlent leurs pertes d'eau, probablement par une régulation stomatique efficace. Lorsque la réserve hydrique du sol s'amenuise, les plantes se

déshydratent par épuisement de l'eau disponible et par transpiration cuticulaire. L'évapotranspiration n'entre pas en jeu puisque leurs stomates sont fermés au moment de la mesure du potentiel hydrique. Le jaunissement des feuilles observé en réponse à la contrainte témoigne d'une réponse hydrolytique qui sera étudiée par la suite.

4. Mises au point de la culture hydroponique

Les éléments minéraux trophiques nécessaires au développement des plantes sont classés en macroéléments : azote (N), phosphore (P), soufre (S), potassium (K), magnésium (Mg), calcium (Ca) et microéléments ou oligo-éléments (co-facteurs enzymatiques) : fer (Fe), cuivre (Cu), manganèse (Mn), zinc (Zn), bore (B), molybdène (Mo) et chlore (Cl). Ces éléments sont absorbés sous forme ionique et les besoins en chacun d'entre eux diffèrent suivant les plantes.

4.1. Les milieux de culture

L'étude a porté sur le milieu utilisé généralement pour la culture hydroponique des Fabacées (légumineuses), le milieu Hoagland (Hoagland et Arnon, 1938) (Tableau 7).

Tableau 7 : Culture hydroponique chez les Fabacées (légumineuses).

Plantes	<i>Vicia faba</i> , <i>Pisum sativum</i> , <i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Pisum sativum</i>	<i>Medicago sativa</i>
Milieu de culture	Hoagland	Hoagland dilué 10 ou 100 fois	Hoagland
Temps de culture	96h	96h	10j
Auteurs	(Piechalak <i>et al.</i> , 2002)	(Piechalak <i>et al.</i> , 2003)	(Lopez <i>et al.</i> , 2005)

Afin de déterminer la concentration optimale du milieu Hoagland pour le développement du *Lathyrus sativus*, différentes dilutions ont été testées : milieu non dilué (D1), dilué 10 fois (D10) et dilué 100 fois (D100). Des plantules témoins, ont été placées dans de l'eau distillée stérile (H₂O). Le milieu de culture a été renouvelé tous les 6 jours. Quatre plantes de chacune des deux lignées, 'Bangladesh' et 'Raipur' ont été utilisées pour chaque traitement (Planche VII), chacune placée dans un pot contenant un litre de milieu.

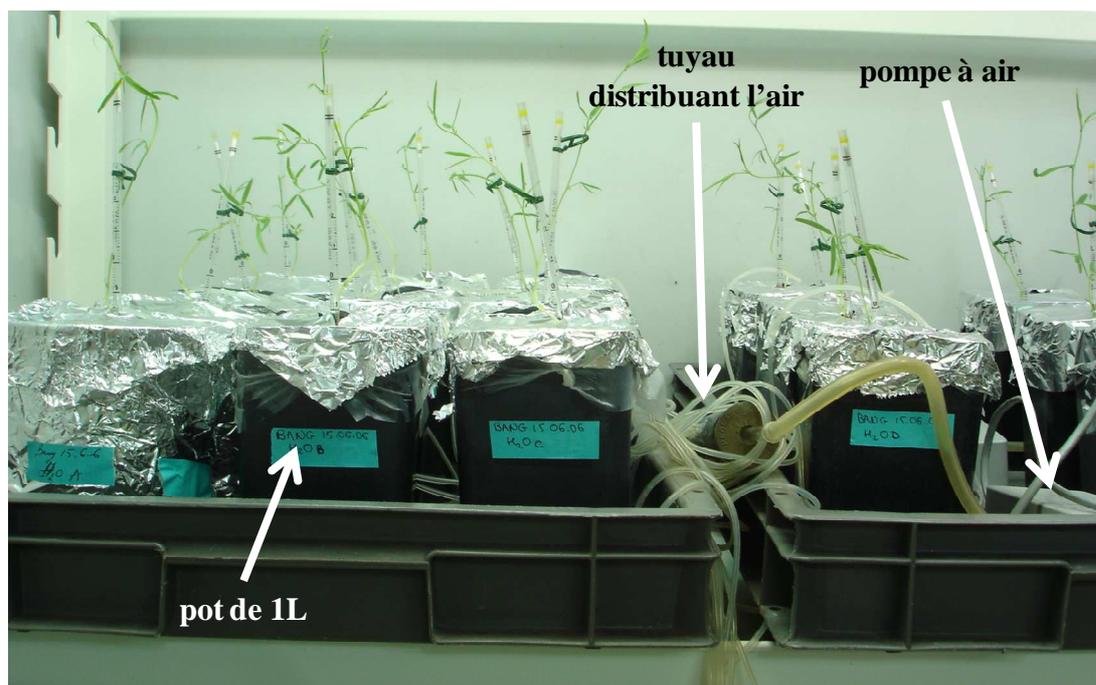


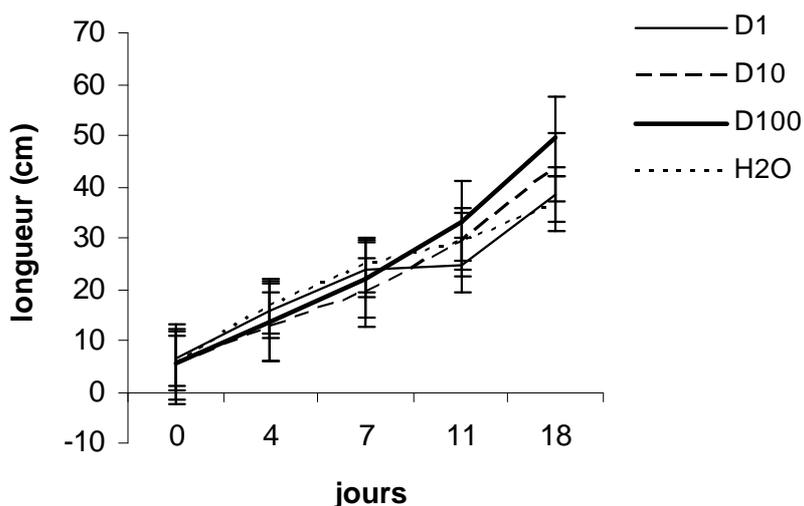
Planche VII : Système utilisé pour la culture hydroponique.

4.2. Résultats : Développement des plantes en fonction des milieux de culture

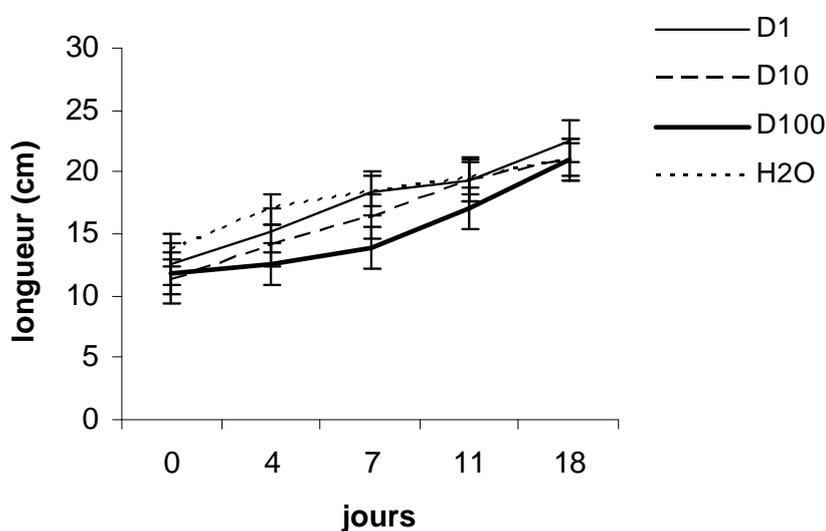
Les mesures ont été effectuées à 4, 7, 11 et 18 jours de culture pour chaque condition expérimentale.

4.2.1. Croissance et morphologie des plantes de *Lathyrus sativus* de la lignée 'Bangladesh'

En ce qui concerne la taille des plantes, après 18 jours de culture en milieu liquide, les meilleurs résultats ont été obtenus pour les racines avec le milieu Hoagland D100 (Fig. 15a) et pour la tige avec le milieu Hoagland D1 (Fig. 15b). De manière générale, le milieu a relativement peu d'incidence sur la taille totale des plantes. Les plantes poussant dans l'eau distillée se sont développées de manière similaire à celles poussant dans les milieux Hoagland.



a



b

Figure 15 : Croissance de la racine principale (a) et de la tige (b) de *Lathyrus sativus* L. lignée 'Bangladesh' en fonction de la dilution du milieu de culture Hoagland et du temps ; D1, D10, D100 : milieu Hoagland non dilué, dilué 10 fois et dilué 100 fois ; H2O ; (nombre de répétitions = 4).

Par contre, si la taille des plantes est relativement peu sensible à la composition du milieu de culture il n'en est pas de même de leur morphologie (Tableau 8).

Après quatre jours de culture hydroponique (Planche VIII) dans de l'eau distillée, les plantes 'Bangladesh' présentent un début de jaunissement au niveau de la pointe de certaines feuilles. Après 7 jours (Planche IX), le phénomène s'est accentué et des nécroses apparaissent, de plus les feuilles se sont repliées sur elles-mêmes. Ces réactions ont également été observées dans le cas des feuilles des plantes poussant dans la solution Hoagland D1. Seules des nécroses et un jaunissement des feuilles ont été observés avec la solution de Hoagland D10. Les réactions

délétères ont été très limitées avec la solution D100. Au niveau des racines aucun signe visible n'est apparu pour les différents traitements.

Au onzième jour de culture un rougissement de la tige chez les plantes cultivées dans l'eau distillée et au quatorzième jour des nécroses sur les feuilles des plantes poussant dans le milieu D100 ont été observés. Après 18 jours de culture (Planche X) les plantes présentent toutes des feuilles jaunies avec des zones nécrosées et « frisées ». Au niveau des parties aériennes les plantes les moins sénescentes sont celles cultivées dans le milieu Hoagland D100. Au niveau des racines, la solution nutritive D1 induit une ramification plus importante du système racinaire, tandis que D100 et la culture dans l'eau distillée favorisent le développement des racines secondaires sur la racine principale. En termes de masse racinaire D10 a donné les résultats les plus élevés.

Tableau 8 : Morphologie des plantes de *Lathyrus sativus* lignée ‘Bangladesh’ en culture hydroponique avec trois dilutions de milieu Hoagland différentes (D1 : dilué une fois ; D10 : dilué 10 fois ; D100 : dilué 100 fois) ou dans de l’eau distillée (H₂O), à différents temps de culture (0, 4, 7, 11, 14 et 18 jours) ; + : présence, ++ : présence plus intense, ± présence variant suivant les feuilles ; (nombre de répétitions = 4).

		taille de la tige (cm)	bout des feuilles jaunies	nécrose sur la feuille	feuilles frisées	feuilles décolorées	tige rougeâtre
J0	H20	13,7 ± 1,91					
	D1	12,5 ± 2,18					
	D10	11,17 ± 1,51					
	D100	11,73 ± 2,58					
J4	H20	17,00 ± 1,73	+				
	D1	15,27 ± 0,75					
	D10	14,07 ± 1,37					
	D100	12,60 ± 1,15					
J7	H20	18,43 ± 1,89	+	+	+		
	D1	18,30 ± 2,70		+	+		
	D10	16,33 ± 0,76	+	±			
	D100	13,90 ± 1,97	±				
J11	H20	19,50 ± 2,29	+	++	+		+
	D1	19,25 ± 1,06		+	++		
	D10	19,33 ± 1,15	+	±			
	D100	17,13 ± 4,15	+				
J14	H20	20,75 ± 2,47	+	++	+	+	+
	D1	21,00 ± 1,41		+	++		
	D10	20,40 ± 3,54	+	+			
	D100	20,75 ± 3,20	+	+			
J18	H20	21,00 ± 2,12	+	++	+	++	++
	D1	22,5 ± 1,41	+	+	++		
	D10	21,00 ± 6,36	+	+	+		
	D100	21,00 ± 3,01	+	+	+		

D1



H₂O



Planche VIII : Morphologie des plantes de *Lathyrus sativus* L. lignée 'Bangladesh' après 4 jours de culture hydroponique dans les différents milieux de culture ; D1 : milieu Hoagland non dilué ; H₂O : eau distillée.

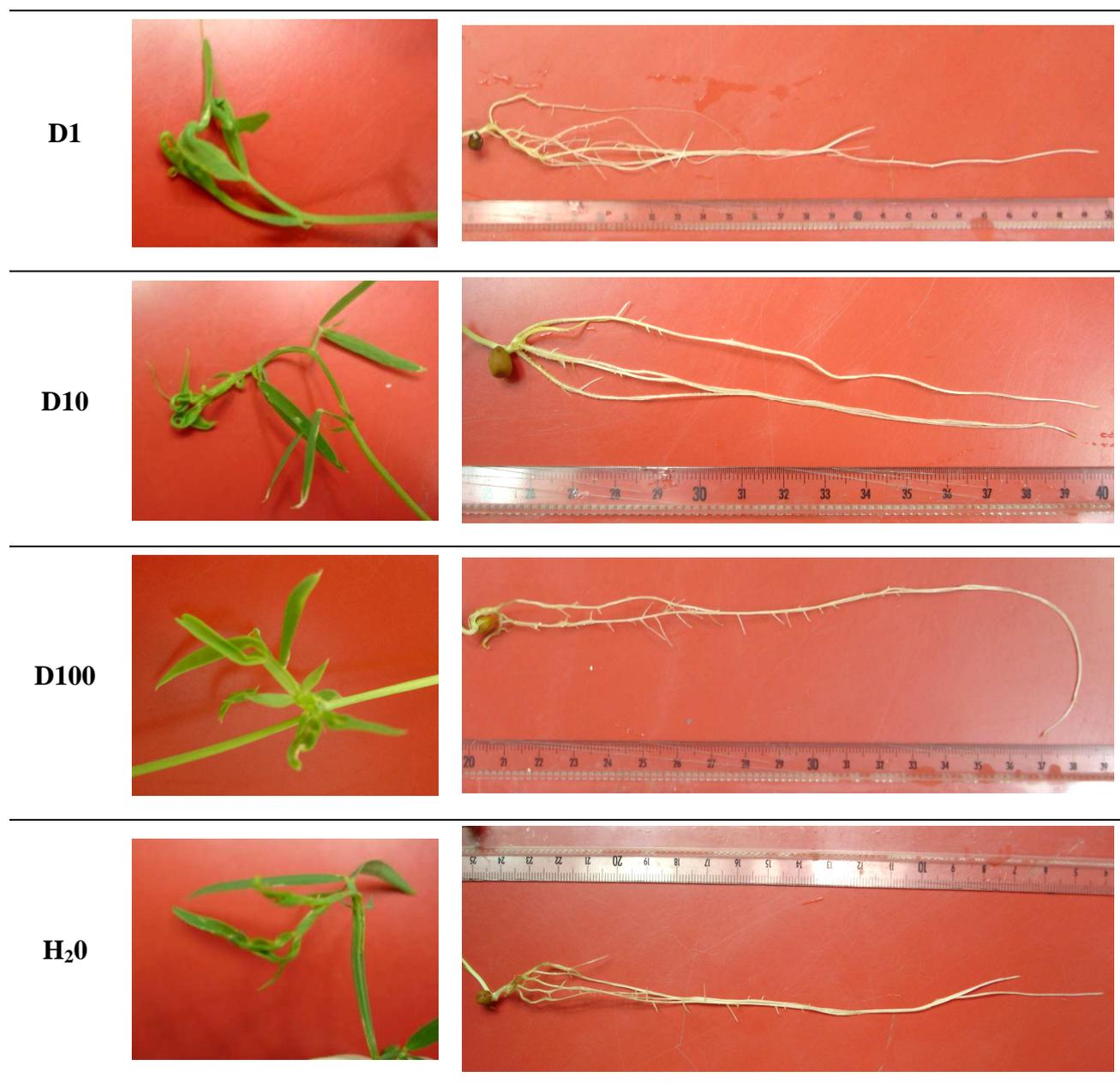


Planche IX : Morphologie des plantes de *Lathyrus sativus* L. lignée 'Bangladesh' après 7 jours de culture hydroponique dans les différents milieux de culture ; D1, D10, D100 : milieu Hoagland non dilué, dilué 10 fois et dilué 100 fois ; H₂O : eau distillée

Planche X : Morphologie des plantes de *Lathyrus sativus* L. lignée 'Bangladesh' après 18 jours de culture hydroponique dans les différents milieux de culture ; D1, D10, D100 : milieu Hoagland non dilué, dilué 10 fois et dilué 100 fois ; H2O : eau distillée.

D1



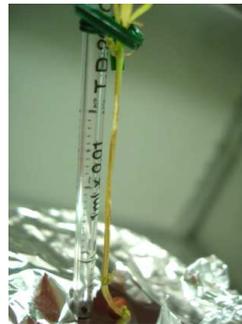
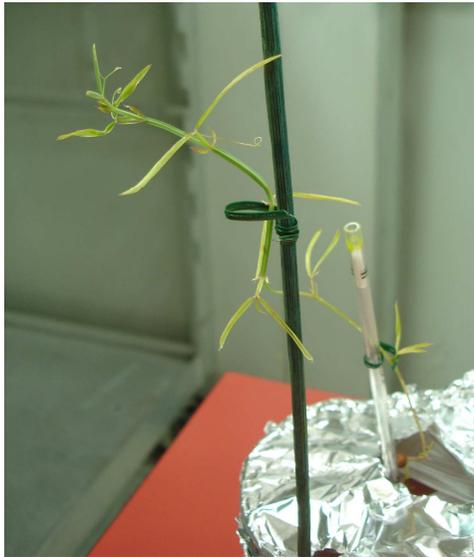
D10



D100



H₂O



4.2.2. Croissance et morphologie des plantes de *Lathyrus sativus* de la lignée 'Raipur', lors de la culture hydroponique

Les résultats présentés figure 16 montrent que le milieu le plus favorable à la croissance des racines est le milieu Hoagland D10 tandis que l'eau distillée est le moins favorable (Fig. 16a). En ce qui concerne les tiges (Fig. 16b et tableau 9) les meilleurs résultats sont obtenus avec D10, la croissance des tiges y a été de 26.6 cm contre 14, 18, 22 cm avec l'eau, D1 et D100 respectivement. Dans tous les cas l'eau distillée seule est défavorable en raison du manque d'éléments minéraux trophiques.

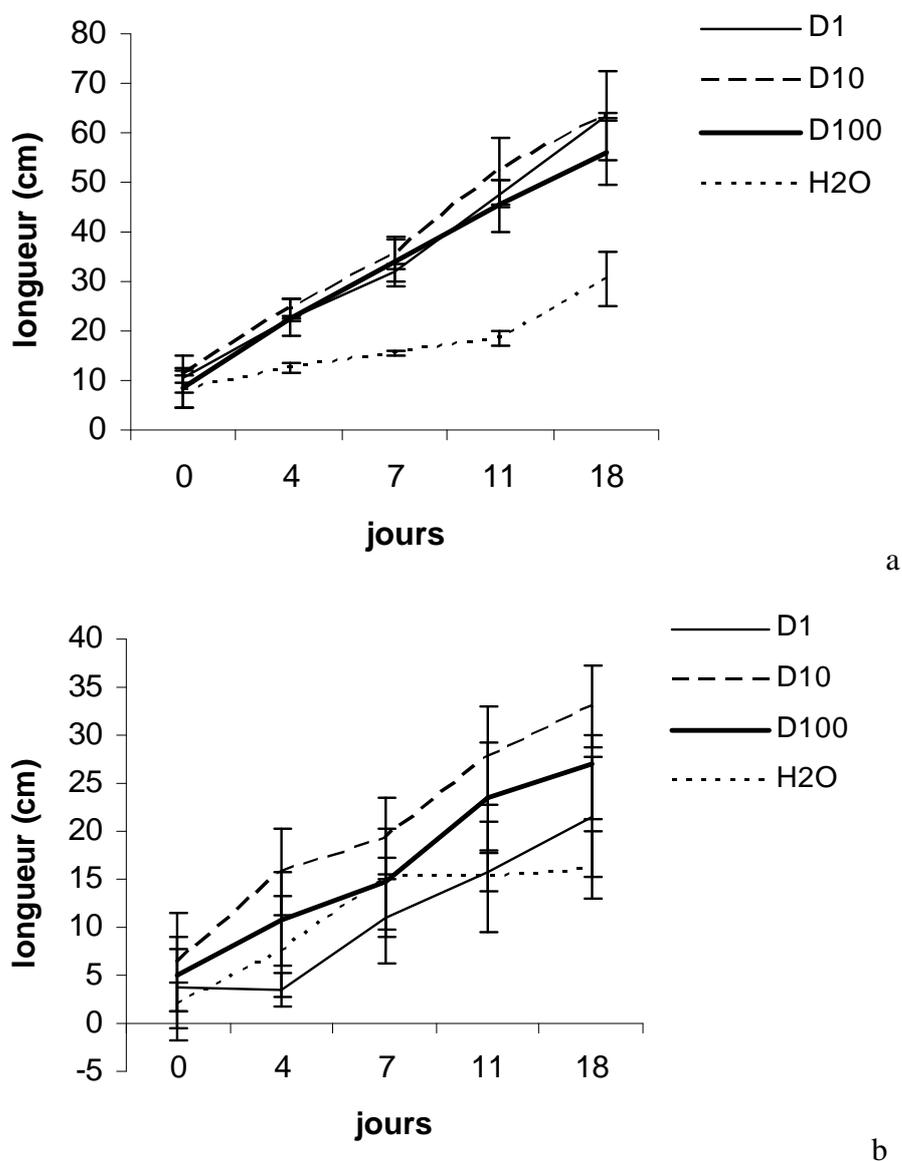


Figure 16: Croissance de la racine principale (a) et de la tige (b) de *Lathyrus sativus* L. lignée 'Raipur' en fonction de la dilution du milieu de culture Hoagland et du temps ; D1, D10, D100 : milieu Hoagland non dilué, dilué 10 fois et dilué 100 fois ; H2O ; (nombre de répétitions = 4).

Tableau 9 : Descriptif de la morphologie des plantes de *Lathyrus sativus* lignée 'Raipur' en culture hydroponique avec trois dilutions de milieu Hoagland différentes (D1 : dilué une fois ; D10 : dilué 10 fois ; D100 : dilué 100 fois) ou dans de l'eau (H₂O), à différents temps de culture (0, 4, 7, 11, 14 et 18 jours) ; + : présence, ++ : présence plus intense, ± présence variant suivant les feuilles ; (nombre de répétitions = 4).

		taille de la tige (cm)	bout des feuilles jaunies	nécrose sur la feuille	feuilles frisées	feuilles décolorées	tige rougeâtre
J0	H20	2,07 ± 2,21					
	D1	3,63 ± 2,23					
	D10	6,37 ± 3,05					
	D100	5,06 ± 3,03					
J4	H20	7,57 ± 5,06	+				
	D1	3,57 ± 1,79					
	D10	15,77 ± 4,46					
	D100	10,77 ± 4,88	+				
J7	H20	15,33 ± 5,75	+	±			
	D1	10,93 ± 4,65					
	D10	19,23 ± 4,14					
	D100	14,83 ± 5,48	+	+			
J11	H20	15,25 ± 3,89	+	±			
	D1	15,67 ± 2,02		±			
	D10	27,83 ± 5,06					
	D100	23,50 ± 5,77	+	+			
J14	H20	15,50 ± 5,63	+	±			
	D1	16,5 ± 6,36		+			
	D10	29,75 ± 5,30		±			
	D100	23,50 ± 2,12	+	+			
J18	H20	16,00 ± 7,42	+	+			
	D1	21,50 ± 6,36		+	+		
	D10	33,00 ± 4,24		±	±		
	D100	27,00 ± 3,00	+	+		+	

La culture des plantes dans l'eau distillée et dans le milieu D100 induit dès le quatrième jour une sénescence (jaunissement) au niveau de la pointe des feuilles (Tableau 9 et Planche XI). Ce phénomène est accentué avec l'apparition de nécroses au septième jour (Planche XII). Il n'apparaît qu'au onzième jour pour les plantes du milieu D1. Au quatorzième jour toutes les plantes présentent des nécroses sur une partie ou la totalité de leurs feuilles. Au dix-huitième jour de culture hydroponique (Planche XIII), les plantes cultivées dans les milieux D1 et D10 présentent en plus des nécroses, un 'frisotement' de certaines feuilles. Les plantes poussant dans le milieu D100 présentaient quand à elle un jaunissement généralisé de leurs feuilles (stade précoce de sénescence).

Les plantes ayant poussé dans les milieux Hoagland ont fleuri après 18 jours de culture hydroponique.

A partir de 7 jours de culture, les racines des plantes cultivées dans le milieu D1 ont poussé en longueur et présentent moins de ramifications que les plantes cultivées dans l'eau dont les racines sont plus courtes mais plus ramifiées.



Planche XI : Morphologie des plantes de *Lathyrus sativus* L. lignée 'Raipur' après 4 jours de culture hydroponique dans les différents milieux de culture ; D1 : milieu Hoagland non dilué ; H₂O : eau distillée.

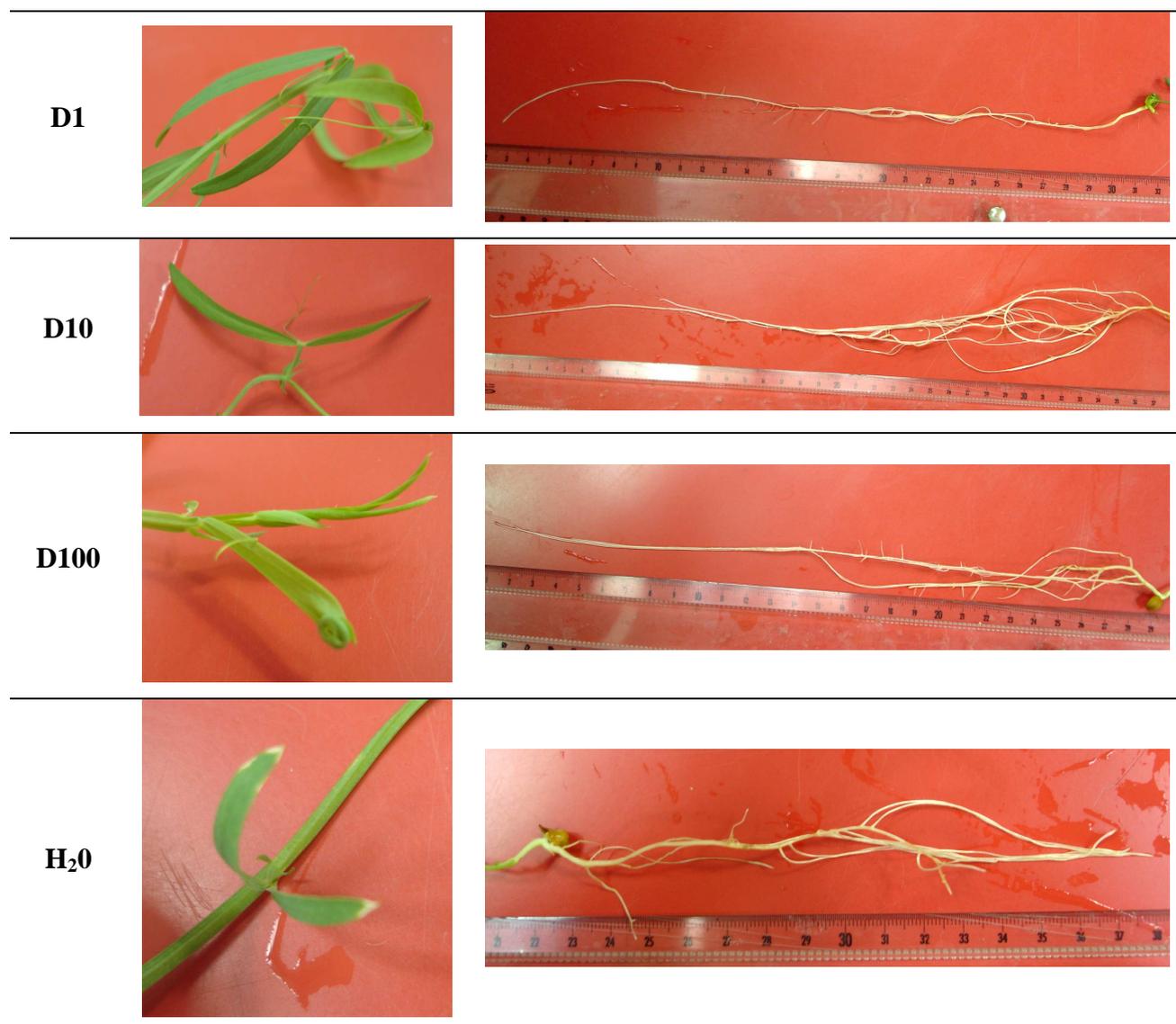


Planche XII : Morphologie des plantes de *Lathyrus sativus* L. lignée 'Raipur' après 7 jours de culture hydroponique dans les différents milieux de culture ; D1, D10, D100 : milieu Hoagland non dilué, dilué 10 fois et dilué 100 fois ; H₂O : eau distillée.

D1



D10



D100



H₂O

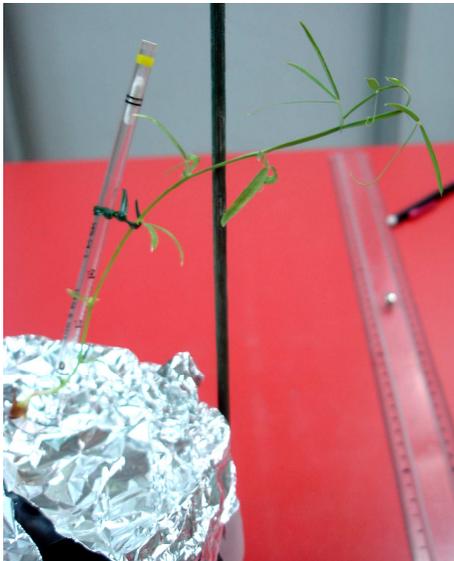


Planche XIII : Morphologie des plantes de *Lathyrus sativus* L. lignée 'Raipur' après 18 jours de culture hydroponique dans les différents milieux de culture ; D1, D10, D100 : milieu Hoagland non dilué, dilué 10 fois et dilué 100 fois ; H₂O : eau distillée.

4.2.3. Etude physiologique des deux lignées de *Lathyrus sativus* cultivées en hydroponie

En ce qui concerne le RWC, relativement peu de différences dans les valeurs ont été observées entre les traitements dans une même lignée de *Lathyrus sativus* (Tableaux 10 et 11). Par contre pour les deux lignées, une augmentation du RWC est observée entre le onzième et le dix-huitième jour. De plus en moyenne, le RWC est plus élevé chez 'Raipur' par rapport à 'Bangladesh'.

Tableau 10 : RWC des feuilles de *Lathyrus sativus* lignée 'Bangladesh' après 11 et 18 jours de culture hydroponique pour différentes concentrations de milieu Hoagland (D1 : dilué une fois ; D10 : dilué 10 fois ; D100 : dilué 100 fois) ou dans de l'eau (H₂O) ; (nombre de répétitions = 4).

	RWC (%)	
	11 j	18 j
D1	69,6 ± 4,7	79,7 ± 3,7
D10	68,0 ± 1,8	83,8 ± 3,5
D100	77,8 ± 5,4	87,4 ± 5,1
H ₂ O	68,2 ± 5,1	81,2 ± 2,7

Tableau 11 : RWC des feuilles de *Lathyrus sativus* lignée 'Raipur' après 11 et 18 jours de culture hydroponique pour différentes concentrations de milieu Hoagland (D1 : dilué une fois ; D10 : dilué 10 fois ; D100 : dilué 100 fois) ou dans de l'eau (H₂O) ; (nombre de répétitions = 4).

	RWC (%)	
	11 j	18 j
D1	79,4 ± 2,9	88,6 ± 3,7
D10	79,9 ± 4,9	81,6 ± 4,5
D100	78,4 ± 2,4	86,1 ± 3,2
H ₂ O	80,3 ± 4,6	94,5 ± 3,7

4.3. Discussion

Chez les deux lignées de *Lathyrus sativus*, quelle que soit la composition du milieu testée, les plantes survivent à la culture hydroponique et continuent de croître.

Les plantes de la lignée 'Bangladesh' semblent peu sensibles aux différences de composition du milieu de culture, alors que les plantes de la lignée 'Raipur' présentent une forte dépendance à la quantité de nutriments disponible. Dans les milieux Hoagland D1 et D10 les plantes de la lignée 'Raipur' sont plus grandes que celles de la lignée 'Bangladesh'. De plus en réponse à la carence minérale induite par l'eau ou la solution Hoagland D100, les plantes de la lignée 'Raipur' développent plus de ramifications aux niveaux de leur racine principale. Ceci leur permet d'augmenter leur surface de contact avec le milieu de culture pour optimiser leur nutrition minérale.

D'après les valeurs de RWC, après 18 jours de culture en hydroponie les plantes des deux lignées régulent mieux leurs pertes en eau qu'à 11 jours, 'Raipur' étant plus efficace que 'Bangladesh'.

Après 18 jours de culture, chez les deux lignées, les plantes présentent des signes de sénescence des feuilles allant jusqu'à la nécrose. Ces effets pourraient être dus à un déficit minéral et / ou à une anoxie partielle en dépit de l'aération du milieu. Dans les deux cas le milieu Hoagland D10 apparaît le plus approprié au développement du *Lathyrus sativus*, il a donc été retenu pour les cultures suivantes.

Il est intéressant de noter que les plantes de la lignée 'Raipur' fleurissent à 27 jours (après 18 jours de culture hydroponique) et à 24 jours sur tourbe et vermiculite. Ainsi la culture en hydroponie inhibe dans une certaine mesure la mise à fleur de 'Raipur'. Quant à 'Bangladesh' aucune floraison ne s'est produite ce qui confirme l'allongement de leur cycle par rapport à 'Raipur', observé précédemment.

5. Etude ultrastructurale des feuilles de *Lathyrus sativus*

Les *Lathyrus sativus* des lignées 'Raipur' et 'Bangladesh' ont été cultivées dans les conditions définies précédemment et arrosées régulièrement. Des fragments de feuilles ont été observés en microscopie électronique à balayage (MEB, grossissement de x 400 à x 20000). Cette étude a pour but l'observation des stomates et des cirres cuticulaires.

A faible grossissement ($\times 400$), les clichés montrent que la surface des feuilles de la lignée 'Bangladesh' est irrégulière et plissée (Planche XIV). Par contre la surface des feuilles de 'Raipur' est plus lisse (Planche XVI). Ceci est dû à la présence de cirres. En effet les feuilles de *Lathyrus* sont recouvertes de cirres (ou cirrhes) (Planches XVb et XVIIb). Celles-ci peuvent border les stomates (Planche XVa). Il semblerait que leur répartition (Planches XIV et XVI) diffère et qu'elles soient plus abondantes chez 'Bangladesh' (Planche XV a) que chez 'Raipur' (Planche XVIIa).

Les cirres peuvent être classées en fonction de leur morphologie, dans le cas du *Lathyrus sativus*, elles correspondaient aux cirres en plaquettes à bord irrégulier (Koch et.al.).

Les cirres sont composées de lipides formant des cristalloïdes ou un film externe de protection sur la cuticule (Kunst et Samuels, 2003). Ces cirres permettent une diminution des pertes d'eau non stomatique, la protection contre les rayons ultra violet, la diminution de la rétention d'eau à la surface des feuilles réduisant les dépôts de poussière, pollen et polluants atmosphériques. Elles constituent également une barrière contre les bactéries et les champignons pathogènes.

Les cirres étant impliquées dans la résistance à différentes contraintes environnementales, leur présence n'est pas surprenante chez les plantes de *Lathyrus sativus* elle-même pluri-résistantes.

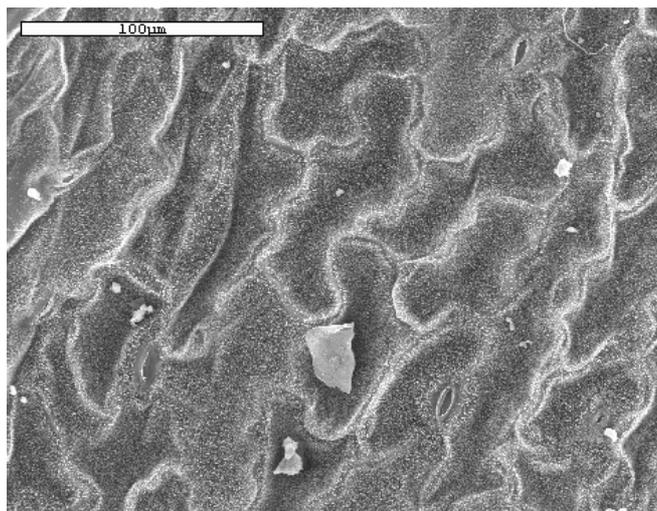
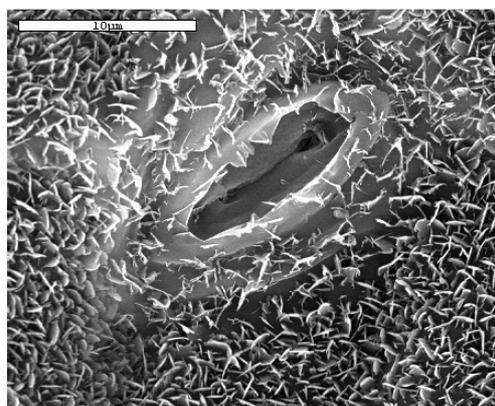
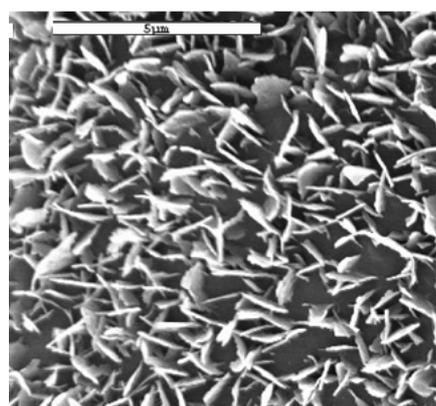


Planche XIV : Observation au microscope électronique à balayage d'une feuille de *Lathyrus sativus* lignée 'Bangladesh' ; grossissement : $\times 400$.



a



b

Planche XV : Observation au microscope électronique à balayage d'un stomate (a) et des cires (b) présents sur une feuille de *Lathyrus sativus* lignée 'Bangladesh' ; grossissements : $\times 4000$ (a) et $\times 8000$ (b).

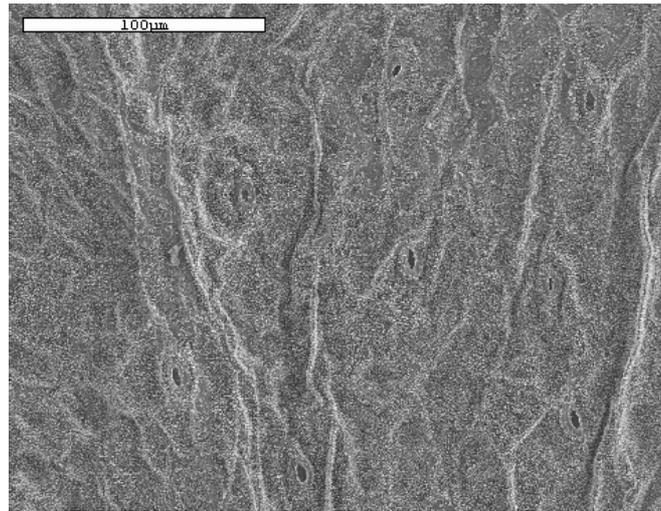


Planche XVI : Observation au microscope électronique à balayage d'une feuille de *Lathyrus sativus* lignée 'Raipur' ; grossissement : $\times 400$.

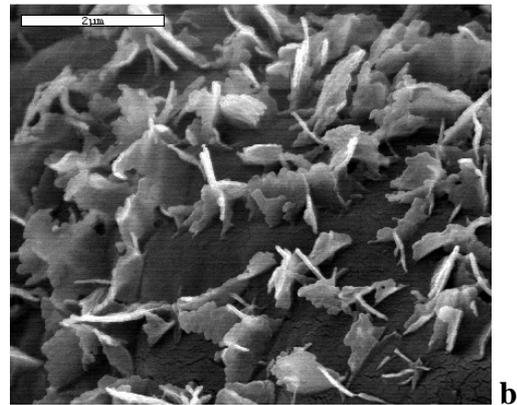
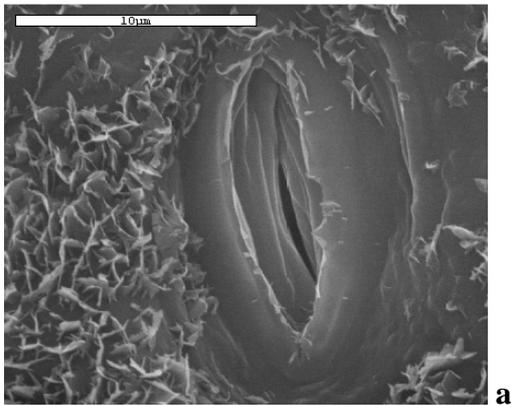


Planche XVII : Observation au microscope électronique à balayage d'un stomate (a) et des cires (b) présents sur une feuille de *Lathyrus sativus* lignée 'Raipur' ; grossissements : $\times 4000$ (a) et $\times 20000$ (b).

6. Mise au point des systèmes de culture en présence de plomb

En culture hydroponique le milieu utilisé en présence de Pb est le milieu Hoagland. Ce milieu est souvent qualifié de « modifié », ce qui signifie souvent l'absence de phosphate dans le milieu. En effet le Pb et le phosphate forment un complexe insoluble de sel de phosphate et précipitent (Kopittke *et al.*, 2008), d'où une diminution de la quantité de Pb disponible pour la plante.

Des logiciels de modélisation permettent de prévoir et donc de minimiser ce phénomène en simulant différentes compositions de milieu. Nous avons utilisé le logiciel « Visual MINTEQ ver 2.53 » (<http://www.lwr.kth.se/english/OurSoftWare/Vminteq/>) dans le but d'optimiser la forme Pb^{2+} disponible pour la plante, tout en restant dans des conditions de culture (composition du milieu et pH) les plus adéquates pour le développement du *Lathyrus sativus*. Ceci nous a conduit à cultiver les plantes cinq à huit jours dans du milieu Hoagland « complet » dilué 10 fois, puis de poursuivre les cultures hydroponiques dans le même milieu sans phosphate.

Les concentrations en $Pb(NO_3)_2$ utilisées généralement se situent entre 0.01 et 1 mM. Notre but étant de tester les capacités de tolérance du *Lathyrus sativus* au Pb et les mécanismes qu'il met en jeu pour supporter cette contrainte, nous avons opté pour une concentration en Pb moyenne de 0.5 mM.

La complexation des éléments présents dans le milieu de culture varie évidemment en fonction du pH. Dans un milieu Hoagland D10 « complet » à pH 5.5, contenant 0.5 mM de $Pb(NO_3)_2$, seulement 51.75 % du Pb est sous forme dissoute, le reste précipite principalement avec les phosphates et les sulfates. Avec le milieu D10 sans phosphates, 62 % du Pb est sous forme dissoute et le reste se lie aux sulfates ; si les sulfates sont éliminés, 99% du Pb présent dans le milieu est sous forme dissoute.

Afin d'augmenter la proportion de Pb libre, il est possible de baisser le pH de la solution. En effet, plus la valeur du pH est basse plus la quantité de Pb dissout est élevée. Les plantes de *Lathyrus sativus* n'apprécient pas les milieux trop acides, le pH minimum a été fixé à 5.0.

En conclusion le milieu sélectionné est le milieu Hoagland D10 sans phosphate, 0.5 mM de $Pb(NO_3)_2$, à pH 5.0. Dans ces conditions 77 % du Pb est dissout, et la quasi-totalité (95 %) est

sous forme Pb^{2+} . Par la suite, deux concentrations de Pb ont été testées : 0.2 et 0.5 mM de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, Pb^{2+} correspondant à 73.3 et 71.1 %, respectivement, du Pb total.

Dans le but de lier 100 % du Pb présent dans le milieu de culture à de l'EDTA, la quantité ajoutée de ce dernier doit être précisée. Une molécule de Pb se liant à une molécule d'EDTA, la quantité d'EDTA ajoutée dans le milieu doit être équimolaire à celle de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$. L'EDTA ayant une très forte affinité pour le Pb, lorsque les deux composés sont présents en solution, ils se lient préférentiellement l'un à l'autre en dépit de la présence d'autres molécules.

Ce phénomène a été vérifié en modélisant les complexes se formant dans le milieu de culture au moyen de logiciel « Visual MINTEQ ». En présence de 0.5 mM de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ et de 0.5 mM d'EDTA, 98.7 % du Pb en solution est complexé avec l'EDTA et 98.7 % de l'EDTA est complexé avec le Pb. De manière similaire, en présence de 0.2 mM de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ et de 0.2 mM d'EDTA, 98.2 % du Pb en solution est complexé avec l'EDTA et 98.1 % de l'EDTA est complexé avec le Pb. Ainsi dans les deux systèmes de culture la quasi-totalité du Pb et de l'EDTA sont complexés, ils seront donc utilisés pour la suite des expériences.

En conclusion le protocole défini consiste à faire germer les plantes de *Lathyrus sativus* pendant cinq à huit jours sur de la vermiculite arrosée avec du milieu Hoagland « complet » D10, pH 5.0, avant de les transférer en hydroponie. Le milieu de culture utilisé est le même sans phosphate afin que la quantité de Pb disponible pour la plante soit optimale. Enfin, les concentrations en $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ et en EDTA sont de 0.2 ou de 0.5 mM, suivant l'expérience.

CHAPITRE II :
ARTICLE N° 1
ÉTUDE DE L'ACCUMULATION DE PLOMB
PAR LE SYSTÈME RACINAIRE DES
PLANTES DE *Lathyrus sativus* L.

Ce travail a fait l'objet d'un article dans les Comptes Rendus Biologies de l'Académie des Sciences :

Brunet J., Repellin A., Varrault G., Terryn N., Zuily-Fodil Y., Lead accumulation in the roots of grass pea (*Lathyrus sativus* L.) : a novel plant for phytoremediation systems, C. R. Biologies 331 (2008) 859–864.

En l'absence de données concernant les réponses de la gesse commune (*Lathyrus sativus* L.) à la présence de Pb au niveau des racines, une première étude a été réalisée avec pour objectifs : 1) l'analyse de la croissance des plantes dans un milieu de culture hydroponique contenant 0.5 mM de nitrate de Pb ; 2) la détermination des potentiels de stockage de Pb dans les tissus racinaires ; 3) l'étude de l'impact du Pb sur l'équilibre minéral dans les racines.

1. Expérimentation

Des graines germées de *Lathyrus sativus* d'une lignée locale 'Raipur' ont été conditionnées au milieu Hoagland 1/10 pendant cinq jours sur de la vermiculite. Les plantes âgées de 11 jours ont été placées en culture hydroponique dans du milieu Hoagland 1/10 sans phosphate, additionné ou non de 0.5 mM de nitrate de Pb ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$). Elles ont été récoltées après 96 h de culture. Une partie des racines a été rincée pendant une heure dans une solution d'EDTA à 1 mM.

Au cours de ce travail les variations de divers paramètres ont été étudiées :

- la croissance des plantes : indice de tolérance (TI, tolerance index), masse sèche (DW, dry weight),
- le contenu relatif en eau (RWC, relatif water content),
- les concentrations en Pb, Ca, Cu, K, Na et Zn dans les racines minéralisées par spectroscopie (ICP-OES).

2. Discussion

La survie de toutes les plantes et l'absence de dommages visibles au niveau des feuilles indiquent que les plantes de *Lathyrus sativus* tolèrent la culture hydroponique en présence de Pb. Cependant le développement des plantes en est inhibé, ce qui correspond à un phénomène observé en réponse au Pb chez d'autres Fabacées (légumineuses) (Huang et Cunningham, 1996; Piechalak *et al.*, 2002; Piechalak *et al.*, 2003). Les valeurs de RWC semblent indiquer une fermeture des stomates, consécutive à la contrainte.

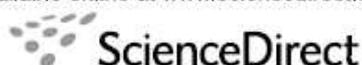
Les concentrations en Ca des plantes traitées au Pb indiquent une diminution de son absorption, de même que pour le Zn et le Cu. La capacité de ces plantes à survivre en état de carence en éléments nutritifs pourrait constituer une caractéristique et un aspect important de la tolérance du *Lathyrus* au Pb. La diminution de la quantité notamment de Ca dans les tissus racinaires peut être due à une inhibition par les ions Pb du fonctionnement des transporteurs peu spécifiques de Ca (Simons et Pockock, 1987; Reuveny et Narahashi, 1991; Clemens *et al.*, 1998; Antosiewicz et Hennig, 2004; Wojas *et al.*, 2007) et/ou d'un blocage des transporteurs par le Pb (Walker *et al.*, 1977; Kabata-Pendias et Pendias, 1992; Sharma et Dubey, 2005). Les bases de ce phénomène ne sont pas encore élucidées. En dépit du déséquilibre minéral induit par la présence de Pb dans les racines, les plantes paraissent morphologiquement intactes. Ceci est à relier avec la capacité du *Lathyrus sativus* à pousser sur les sols pauvres (Vaz Patto *et al.*, 2006).

Les racines des plantes cultivées en présence de Pb contiennent en moyenne 153 mg Pb/g de masse sèche, dont les trois quarts paraissent non échangeables (rinçage des racines à l'EDTA) (Huang et Cunningham, 1996).

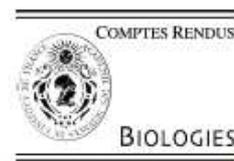
Les capacités d'accumulation du Pb dans plantes de *Lathyrus sativus* ont été comparées avec celles des plantes cultivées en culture hydroponique dans des conditions similaires (tableau 12). Les résultats montrent que le *Lathyrus sativus* présente des capacités d'accumulation dans les racines comparables ou supérieures à celles de plantes accumulatrices reconnues telles que *Brassicae juncea* et *Thlaspi rotundifolium*, faisant de cette espèce végétale une candidate pour la mise au point de nouveaux systèmes de rhizofiltration (Piechalak *et al.*, 2002).

Tableau 12 : Contenu en Pb dans les racines de plantes cultivées en culture hydroponique.

Espèce végétale	Concentration en Pb(NO ₃) ₂ dans le milieu (mM)	Durée du traitement (jours)	Contenu en Pb dans les racines (mg Pb/g DW)	Référence
<i>Brassicae juncea</i>	0.5	3	138	(Meyers <i>et al.</i> , 2008)
<i>Pisum sativum</i>	1	4	50	(Piechalak <i>et al.</i> , 2003)
<i>Helianthus annuus</i>	0.125	6	21	(Tandy <i>et al.</i> , 2006)
<i>Thlaspi rotundifolium</i>	0.02	12	28.7	(Huang et Cunningham, 1996)

Available online at www.sciencedirect.com

C. R. Biologies 331 (2008) 859–864

<http://france.elsevier.com/direct/CRASS3>

Plant biology and pathology / Biologie et pathologie végétales

Lead accumulation in the roots of grass pea (*Lathyrus sativus* L.): a novel plant for phytoremediation systems?

Judicaëlle Brunet^a, Anne Repellin^a, Gilles Varrault^b, Nancy Terryn^c,
Yasmine Zuily-Fodil^{a,*}

^a Laboratoire d'écophysiologie moléculaire (UMR-IRD 137), Université Paris Est, 94010 Créteil cedex, France

^b Centre d'enseignement et de recherche sur l'eau, la ville et l'environnement, Université Paris Est, ENPC, ENGREF (UMR 102),
94010 Créteil cedex, France

^c Institute for Plant Biotechnology for Developing Countries (IPBO), Department Molecular Genetics, Ghent University,
K.L. Ledeganckstraat 35, B-9000 Ghent, Belgium

Received 27 March 2008; accepted after revision 7 July 2008

Available online 18 September 2008

Presented by Philippe Morat

Abstract

Eleven day-old grass pea plants (*Lathyrus sativus* L.) were grown hydroponically for 96 h in the presence of 0.5 mM lead nitrate ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$). The survival rate was 100%. The mean lead content (measured by ICP-OES) in root tissues was 153 mg Pb g^{-1} dry matter. Over three quarters of the lead was not labile. Compared with control plants, lead-exposed plants showed a six-fold, two-fold and three and a half-fold reduction in their root calcium, zinc and copper contents, respectively. Together, these results suggested that *Lathyrus sativus* L. was tolerant to a deficiency in essential nutrients and able to store large amounts of lead in its root tissues. Therefore, it could be used for the development of new rhizofiltration systems. *To cite this article: J. Brunet et al., C. R. Biologies 331 (2008).*

© 2008 Académie des sciences. Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Résumé

Accumulation de plomb par les racines de *Lathyrus sativus* L. : une nouvelle plante pour la phytoremédiation ? Des plantes de gesse (*Lathyrus sativus* L.), âgées de 11 jours, ont été cultivées en hydroponie en présence de 0.5 mM de nitrate de plomb ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$) pendant 96 h. Les plantes survivent toutes au polluant. De plus, la teneur moyenne de plomb mesurée dans les racines par ICP-OES est de 153 mg Pb g^{-1} de matière sèche. Plus des trois quarts du plomb n'est pas labile. Parallèlement, les teneurs en calcium, zinc et cuivre dans les tissus racinaires sont réduites d'un facteur six, deux et trois et demi par rapport aux racines des plantes témoins, non exposées au plomb. Ces résultats suggèrent que le *Lathyrus sativus* L. est une plante tolérante les carences en éléments nutritifs essentiels et capable de stocker des quantités de plomb très élevées dans ses racines. Ainsi, elle pourrait être intégrée dans de nouveaux systèmes de rhizofiltration. *Pour citer cet article: J. Brunet et al., C. R. Biologies 331 (2008).*

© 2008 Académie des sciences. Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

* Corresponding author.

E-mail address: zuily@univ-paris12.fr (Y. Zuily-Fodil).

Keywords: Accumulation; Calcium; *Lathyrus sativus* L.; Lead; Roots

Mots-clés: Accumulation; Calcium; *Lathyrus sativus* L.; Plomb; Racines

1. Introduction

The contamination of soil and water with lead (Pb) mostly results from human activities. Various industries, such as mining and smelting, the past and present use of lead in paints, gasoline and linings have resulted in its spreading all over the world. Lead is extremely toxic to all intermediates of food chains [1–3]. In humans, its effects have been thoroughly characterised, and include nephropathy, saturnism or colic-like abdominal pains [4]. Chemical and physical techniques to remove lead from soils have been developed [5,6]. They are expensive and applicable only to small areas. Recently, heavy metal extraction by plants has emerged as a promising, cost-effective alternative to reduce heavy metal levels in soils [7]. The first step in the implementation of phytoextraction strategies is the identification of plant species able to: (i) tolerate large quantities of heavy metals in the soil [7]; and (ii) absorb large amounts of at least one trace element. Over 400 plant species have been described as presenting both these properties [8]. A majority of them have evolved to cope with Ni [8], one of several trace elements (Cu, Ni, Zn, Cd, As, Se, Pb) representing a hazard to ecosystems. Lead tolerant and/or lead accumulating plants are rather exceptional. Scientists are therefore on the lookout for novel species with phytoremediation potentials towards this element.

Grass pea (*Lathyrus sativus* L.) is a ubiquitous annual leguminous crop with such an amazing capability to tolerate harsh growth conditions that it is considered one of the most promising sources of genes of interest [9]. It is poorly affected by abiotic stresses, such as water-logging and is resistant to various insects and pests [9–14]. Due to its low nutriment requirements, it can thrive in poor soils, and also in very arid environments [15]. We have previously shown that some drought tolerant tropical legume species cope with water deficit by maintaining cell homeostasis through control over autolytic processes [16–19]. Furthermore, our results strongly suggest that these characteristics could provide general tolerance to abiotic and even biotic stresses. In the present study, we hypothesized that grass pea, due to its multi-tolerance, possessed the ability to deal with stress at the cellular level, and we investigated its capacity to cope with lead in the soil solution. In particular, we report on grass pea's lead-absorption

and storage capacities in root tissues and on the impact of lead on mineral homeostasis for calcium, copper and zinc.

2. Materials and methods

Lathyrus sativus (L.) seeds corresponding to an Indian local line "Raipur", were germinated on Murashige and Skoog medium (Kalys, France) under sterile conditions. Seedlings of similar size were transferred to expanded vermiculite irrigated with 1/10 Hoagland's N°2 medium (pH 5.0) (Sigma, France). Five days later, plants were transferred to liquid growth medium (phosphate free 1/10 Hoagland's N°2 medium, pH 5.0), aerated continuously and supplemented (or not) with 0.5 mM Pb(NO₃)₂. When in the liquid medium, plants were cultured under controlled conditions: 12 h/12 h photoperiod with 25/23 °C day/night temperatures; 70% RH; 400 μmol photons m⁻²s⁻¹. After 96 h of exposure to lead, the roots were collected and briefly rinsed in phosphate free 1/10 Hoagland medium. For EDTA treatment, roots were soaked in 1 mM EDTA (Sigma, France) for 1 h. Six plants were used for each treatment. Root systems (approximately 100 mg each) were dried at 35 °C for seven days, and digested under pressure in sealed vessels containing suprapur nitric acid (65% m/v). Lead and calcium levels were determined by inductively coupled plasma optical emission spectroscopy (ICP-OES), using a Varian Vista MPX instrument.

Tolerance indexes (TI) for roots and shoots were calculated according to Wilkins's equation [20] where ML_{Pb} and ML_C represented mean length of longest roots (or shoots) in 1/10 Hoagland's-lead and lead-free solutions, respectively: TI (%) = ML_{Pb}/ML_C × 100.

Leaf relative water content was determined according to equation of Barrs and Weatheley [21] where FW, DW and TW represented fresh, dry and turgid weight: RWC (%) = [(FW – DW)/(TW – DW)] × 100.

3. Results

After 96 h of exposure to lead as 0.5 mM Pb(NO₃)₂ in P-free modified Hoagland's liquid medium under controlled conditions, survival rate amongst grass pea plants was 100%. Plant growth, however, was affected, as shown by the tolerance indexes measured for roots

Table 1

Tolerance indexes (TI_{Pb}) to lead and dry biomass produced by grass pea (*Lathyrus sativus* L.) plants grown (96 h) in 1/10 modified Hoagland's medium supplemented with 0.5 mM $Pb(NO_3)_2$ (DW_{Pb}) or not (DW_C)

	TI_{Pb}	DW_{Pb}/DW_C
	(%)	
Roots	48.0 ± 14.4	44.3 ± 11.2
Shoots	75.4 ± 9.3	80.1 ± 18.7

Values are means \pm (SD) ($n = 6$).

Table 2

Relative water content in the leaves of grass pea (*Lathyrus sativus* L.) plants grown (96 h) in 1/10 modified Hoagland's medium supplemented with 0.5 mM $Pb(NO_3)_2$ (Pb) or not (C)

	RWC (%)
C	90.8 ± 0.3
Pb	93.0 ± 0.6

Values are means \pm (SD) ($n = 6$).

and shoots (Table 1). Unsurprisingly, tolerance index (TI) values revealed that root elongation was more affected by the presence of lead than shoot elongation (Table 1). Furthermore, the roots whitish color in the control plants had evolved to a light brown in the lead-treated plants. Average root dry biomass was reduced in the lead-treated plants, as indicated by the dry biomass ratios between lead-treated and control plants (Table 1). In addition, leaves of lead-treated plants were smaller than those in the control plants, although exposure to the pollutant did not affect the number of leaves per stem (data not shown).

The water status in leaf tissues was not affected by lead since RWC values remained equivalent in both groups of plants (Table 2).

Analyses of mineral contents by ICP-OES in the roots of control plants showed that they were lead-free (Fig. 1). On the other hand, lead-exposed plants accumulated an average of 153.0 mg of lead per g of dry root material (Fig. 1). Rinsing the root systems with an EDTA solution prior to mineralization resulted in a slight decrease in the quantity of accumulated lead in the roots ($138.0 \text{ mg Pb g}^{-1} \text{ DW}$) (Fig. 1). Like Pb contents, Na contents increased in the roots of Pb-treated plants (data not shown). On the other hand, the amounts of calcium, zinc and copper were reduced by 6, 2 and 3.5-fold, respectively, in response to the lead treatment (Figs. 2–4). The potassium content was also reduced (data not shown). In general, root treatment with EDTA had a slight impact on the mineral contents (Figs. 2–4).

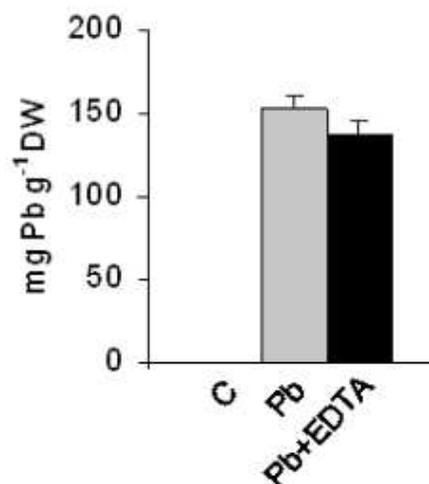


Fig. 1. Lead content in the roots of grass pea (*Lathyrus sativus* L.) plants grown (96 h) in 1/10 modified Hoagland's medium supplemented with 0.5 mM $Pb(NO_3)_2$ or not. C: control plants; Pb: lead-treated plants; Pb + EDTA: lead-treated plants rinsed with EDTA. Values are means \pm (SD) ($n = 6$).

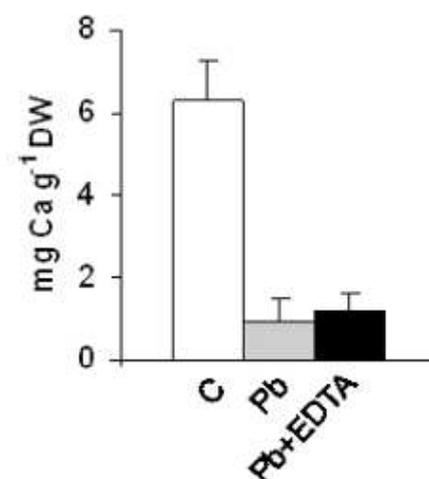


Fig. 2. Calcium content in the roots of grass pea (*Lathyrus sativus* L.) plants grown (96 h) in 1/10 modified Hoagland's medium supplemented with 0.5 mM $Pb(NO_3)_2$ or not. C: control plants; Pb: lead-treated plants; Pb + EDTA: lead-treated plants rinsed with EDTA. Values are means \pm (SD) ($n = 6$).

4. Discussion

Precise control over the amounts of Pb ions available to plants growing in a soil is technically difficult because lead bio-availability depends highly on soil characteristics [22]. The grass pea plants (*Lathyrus sativus* L.) were therefore exposed to a modified phosphate-free Hoagland's liquid medium supplemented with 0.5 mM $Pb(NO_3)_2$ for 96 h. Their capacity

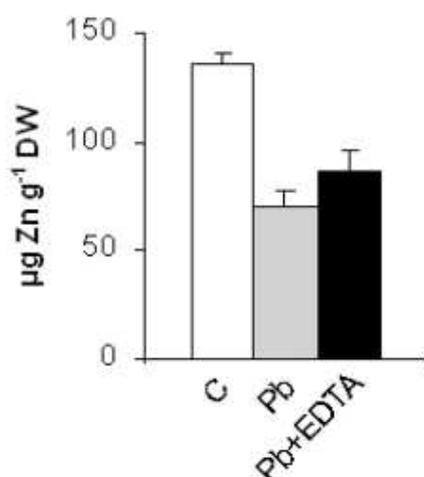


Fig. 3. Zinc content in the roots of grass pea (*Lathyrus sativus* L.) plants grown (96 h) in 1/10 modified Hoagland's medium supplemented with 0.5 mM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ or not. C: control plants; Pb: lead-treated plants; Pb + EDTA: lead-treated plants rinsed with EDTA. Values are means \pm (SD) ($n = 6$).

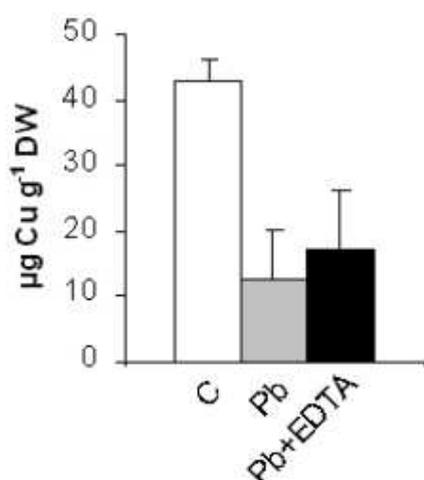


Fig. 4. Copper content in the roots of grass pea (*Lathyrus sativus* L.) plants grown (96 h) in 1/10 modified Hoagland's medium supplemented with 0.5 mM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ or not. C: control plants; Pb: lead-treated plants; Pb + EDTA: lead-treated plants rinsed with EDTA. Values are means \pm (SD) ($n = 6$).

to cope with the pollutant was analyzed by comparing lead-exposed plants to control plants exposed to the Pb-free medium.

The 100% survival rate observed at the end of the lead treatment and the absence of visual damage to the leaves suggested that grass pea plants presented an elevated tolerance to Pb ions, under our experimental conditions. Morphological differences between lead-treated and control plants concerned their size. Lead reduced

grass pea plant growth rates in the roots and shoots and limited overall biomass production. This appeared to be a general response to lead that was previously observed in *Vicia faba*, *Pisum sativum* and *Phaseolus vulgaris* [3,23–25]. Since hydration levels (RWC%) in leaf tissues were slightly higher in lead-treated than in control plants at the end of the treatment, it is most likely that lead-induced stomatal closure developed over the course of the experiment and that atmospheric carbon fixing activities were compromised as a consequence.

Mineral analyses showed that lead-treated plants contained six times less Ca compared with control plants. Due to the importance of Ca in many aspects of plant cell biology [26], tolerance to low Ca conditions could therefore represent an important aspect of tolerance to lead in grass pea, as is the case in other higher plant species [27,28]. Reduced calcium contents in lead-exposed plants has previously been observed in other species, such as rye, maize, tomato and mustard varieties [27] and could result from the inhibition of Ca transporters by toxic lead ions [28–32] and/or replacement of Ca ions with Pb ions due to the high affinity of the latter for Ca binding-sites on biological structures [26,33–35]. In ground dried husks of *Lathyrus sativus* plants, efficient replacement of Ca by Cd at the surface of the biomass has been reported [36]. However, in the present experiment, simple replacement of Ca with Pb was not sufficient to account for the large quantities of lead found in the roots. Several studies have shown the poor molecular-specificity of some Ca transporters [26]. It is therefore possible that the more abundant Pb ions competed with Ca ions [28,32] and were preferentially transported in and out of grass pea root tissues.

To a lesser extent, the negative impact of lead on Ca content was also observed for other essential nutrients (Zn, Cu, K). Like for Ca, a reduction in Zn, Cu and K contents has previously been observed in response to lead exposure in *Cucumis sativus* and *Zea mays* plants, as a result of a possible blockage of the transporter proteins by the pollutant [22,37,38]. On the other hand, the lead-treated grass pea plants accumulated more Na than the controls. Whether Na was actively absorbed to compensate for the loss in K, as was suggested in the case of *Pisum sativum* roots exposed to lead [39], remains to be elucidated. Despite the important mineral unbalance induced by lead in their roots, grass pea plants remained visually intact, a response to be expected from a plant known to thrive in poor quality soils [9].

Lead-treated grass pea plants contained an average of 153 mg Pb g^{-1} DW in their roots. Rinsing the root systems with EDTA prior to mineral analysis barely impacted lead content. Desorption solutions including

chelators of divalent cations (EDTA, HEDTA) have been used previously on lead-treated root systems to differentiate between exchangeable and non-exchangeable Pb ions [25]. In corn and ragweed, short-term Pb uptake (30 min) mostly consisted of exchangeable Pb [25]. Conversely, long-term Pb uptake, as was studied in the present experiment, mostly involved non-exchangeable Pb. The efficient immobilization of Pb ions on grass pea roots could represent a new and interesting feature for the development of phytoremediation strategies requiring that large amounts of the contaminant remain tightly bound to plant tissues.

Comparing lead accumulation capacities of plant species is not easy because experimental conditions differ significantly. To best assess grass pea lead accumulation capacity, mostly results from studies on plants grown in hydroponic conditions have been considered. After a short exposure to lead (three days with 500 μM of $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$), 138 mg Pb g^{-1} DW were measured in the roots of *Brassica juncea* plants [40]. Roots of *Pisum sativum* exposed to 1 mM of $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ for four days accumulated up to 50 mg Pb g^{-1} DW [23] and 21 mg Pb g^{-1} DW were found in the roots of *Helianthus annuus* plants exposed to 125 μM of $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ for six days [41]. Longer exposure (12 days) to 20 μM of $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ led to an accumulation of 28.7 mg Pb g^{-1} DW in *Thlaspi rotundifolium* roots [25]. Under our experimental conditions (0.5 mM of $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ for 96 h), grass pea plants absorbed 153 mg Pb g^{-1} DW in their root systems. It appears that grass pea presents lead accumulation capacities that are equivalent to those of efficient root accumulators like *Brassicaceae juncea* and *Thlaspi rotundifolium*. Combined with the fact that lead was tightly retained by root tissues, these accumulation data clearly demonstrate that the grass pea has an interesting potential, as an efficient lead phytoextracting species in rhizofiltration setups [3]. Studies are now in progress to better understand the mechanisms involved in lead absorption by the grass pea.

Acknowledgements

The authors thank Dr. F. Lambein of Laboratory of Physiological Chemistry at the University of Ghent for kindly providing them with grass pea seeds.

References

- [1] M. Wierzbicka, D. Antosiewicz, How lead can easily enter the food chain – a study of plant roots, *Sci. Total Environ.* (1993) 423–429.
- [2] J.R. Henry, An overview of the phytoremediation of lead and mercury, National Network of environmental management studies (NMES), 2000.
- [3] A. Piechalak, B. Tomaszewska, D. Baralkiewicz, A. Malecka, Accumulation and detoxification of lead ions in legumes, *Phytochemistry* 60 (2002) 153–162.
- [4] D.R. Juberg, C.F. Kleiman, S.C. Kwon, Position paper of the American Council on Science and Health: Lead and human health, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 38 (1997) 162–180.
- [5] M. Ghosh, S.P. Spingh, A review on phytoremediation of heavy metals and utilization of its byproducts, *Applied Ecology and Environmental Research* 3 (2005) 1–18.
- [6] Environmental Protection Agency, Environmental Investments: The Cost of Clean Environment, US Government Printing Office, Washington, DC, 1990.
- [7] D.E. Salt, M. Blaylock, N.P. Kumar, V. Dushenkov, B.D. Ensley, I. Chet, I. Raskin, Phytoremediation: A novel strategy for the removal of toxic metals from the environment using plants, *Nat. Biotechnol.* 13 (1995) 468–474.
- [8] A.J.M. Baker, R.R. Brooks, Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements – A review of their distribution, ecology and phytochemistry, in: *Biorecovery*, AB Academic Publishers, 1989, pp. 81–126.
- [9] M.C. Vaz Pato, B. Skiba, E.C.K. Pang, S.J. Ochatt, F. Lambein, D. Rubiales, Lathyrus improvement for resistance against biotic and abiotic stresses: From classical breeding to marker assisted selection, *Euphytica* 147 (2006) 133–147.
- [10] A.K. Kaul, M.Q. Islam, A. Hamid, Screening of Lathyrus germplasm of Bangladesh for BOAA content and some agronomic characters, in: *Proceedings of the International Symposium on Lathyrus and Lathyrism*, Third World Medical Research Foundation, New York, 1986, pp. 130–141.
- [11] C.G. Campbell, R.B. Mehra, S.K. Agrawal, Y.Z. Chen, A.M. Abd El Moneim, H.I.T. Khawaja, C.R. Yadov, J.U. Tay, W.A. Araya, Current status and future strategy in breeding grasspea (*Lathyrus sativus*), *Euphytica* 73 (1994) 167–175.
- [12] P.S. Spencer, The grass pea: threat and promise, *Third World Medical Research Foundation*, New York, 1989, p. 244.
- [13] A.M. Croft, E.C.K. Pang, P.W.J. Taylor, Molecular analysis of *Lathyrus sativus* L. (grasspea) and related *Lathyrus* species, *Euphytica* 107 (1999) 167–176.
- [14] R. Hoque, M. Hussain, Y.H. Kuo, F. Lambein, Salinity tolerance and accumulation of neurotoxin and excitatory amino acids in *Lathyrus sativus*, *Bangladesh J. Biochem.* 2 (1996) 15–27.
- [15] C.G. Campbell, Grass pea, *Lathyrus sativus* L. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops, Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Rome, 1997.
- [16] H. Roy-Macauley, Y. Zuily-Fodil, M. Kidric, A.T. Pham Thi, J. Vieira da Silva, Effect of drought stress on proteolytic activities in *Phaseolus* and *Vigna* leaves from sensitive and resistant plants, *Physiol. Plant.* 85 (1992) 90–96.
- [17] M.H. Cruz de Carvalho, A. d'Arcy-Lameta, H. Roy-Macauley, M. Gareil, H. El Maarouf, A. Pham-Thi, Y. Zuily-Fodil, Aspartic protease in leaves of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp): enzymatic activity, gene expression and relation to drought susceptibility, *FEBS Letters* 492 (2001) 242–246.
- [18] A.R. Matos, A. d'Arcy-Lameta, M. Franca, S. Petres, L. Edelman, J.-C. Kader, Y. Zuily-Fodil, A.T. Pham-Thi, A novel patatin-like gene stimulated by drought stress encodes a galactolipid acyl hydrolase, *FEBS Letters* 491 (2001) 188–192.
- [19] N.N. Diop, M. Kidric, A. Repellin, M. Gareil, A. d'Arcy-Lameta, A.T. Pham-Thi, Y. Zuily-Fodil, A multicystatin is in-

- duced by drought-stress in cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) leaves, *FEBS Letters* 577 (2004) 545–550.
- [20] D.A. Wilkins, A technique for the measurement of lead tolerance in plants, *Nature* 180 (1957) 37–38.
- [21] C. Bars, P.E. Weatheley, A re-examination of the relative turgidity technique for estimating water deficit in leaves, *Aust. J. Biol. Sci.* 15 (1968) 413–428.
- [22] P. Sharma, R.S. Dubey, Lead toxicity in plants, *Braz. J. Plant Physiol.* 17 (2005) 35–52.
- [23] A. Piechalak, B. Tomaszewska, D. Baralkiewicz, Enhancing phytoremediative ability of *Pisum sativum* by EDTA application, *Phytochemistry* 64 (2003) 1239–1251.
- [24] S. Verma, R.S. Dubey, Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants, *Plant Science* 164 (2003) 645–655.
- [25] J.W. Huang, S.D. Cunningham, Lead phytoextraction: species variation in lead uptake and translocation, *New Phytologist* 134 (1996) 75–84.
- [26] P.J. White, M.R. Broadley, Calcium in plants, *Ann. Bot.* 92 (2003) 487–511.
- [27] D.M. Antosiewicz, Study of calcium-dependent lead-tolerance on plants differing in their level of Ca-deficiency tolerance, *Environ. Pollut.* 134 (2005) 23–34.
- [28] S. Wojas, A. Ruszczynska, E. Bulska, M. Wojciechowski, D.M. Antosiewicz, Ca²⁺-dependent plant response to Pb²⁺ is regulated by LCT1, *Environ. Pollut.* 147 (2007) 584–592.
- [29] T.J.B. Simons, G. Pocock, Lead enters bovine adrenal medullary cells through calcium channels, *J. Neurochem.* 48 (1987) 383–389.
- [30] S. Clemens, D.M. Antosiewicz, J.M. Ward, D.P. Schachtman, J.I. Schroeder, The plant cDNA LCT1 mediates the uptake of calcium and cadmium in yeast, *Proc. Natl Acad. Sci.* 95 (1998) 12043–12048.
- [31] E. Reuveny, T. Narahashi, Potent blocking action of lead on voltage-activated calcium channels in human neuroblastoma cells SH-SY5Y, *Brain Research* 545 (1991) 312–314.
- [32] D.M. Antosiewicz, J. Hennig, Overexpression of LCT1 in tobacco enhances the protective action of calcium against cadmium toxicity, *Environ. Pollut.* 129 (2004) 237–245.
- [33] E. Habermann, K. Crowell, P. Janicki, Lead and other metals can substitute for Ca²⁺ in calmodulin, *Archives of Toxicology* 54 (1983) 61–70.
- [34] H.P.M. Vijverberg, M. Oortgiesen, T. Leinders, R.G.D.M. van-Kleef, Metal interactions with voltage- and receptor-activated ion channels, *Environ. Health Perspect.* 102 (1994) 153–158.
- [35] G. Richardt, G. Federolf, E. Habermann, Affinity of heavy metal ions to intracellular Ca²⁺-binding proteins, *Biochem. Pharmacol.* 35 (1986) 1331–1335.
- [36] G.C. Panda, S.K. Das, S. Chatterjee, P.B. Maity, T.S. Bandopadhyay, A.K. Guha, Adsorption of cadmium on husk of *Lathyrus sativus*: Physico-chemical study, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 50 (2006) 49–54.
- [37] A. Kabata-Pendias, H. Pendias, Trace Elements in Soils and Plants, CRC Press, London, 1992, p. 295.
- [38] W.M. Walker, J.E. Miller, J.J. Hassett, Effect of lead and cadmium upon the calcium, magnesium, potassium, and phosphorus concentration in young corn plants, *Soil Sci.* 124 (1977) 145–151.
- [39] A.E.A. Päivöke, Soil lead alters phytase activity and mineral nutrient balance of *Pisum sativum*, *Environmental and Experimental Botany* 48 (2002) 61–73.
- [40] D.E.R. Meyers, G.J. Auchterlonie, R.I. Webb, B. Wood, Uptake and localisation of lead in the root system of *Brassica juncea*, *Environmental Pollution* 153 (2008) 323–332.
- [41] S. Tandy, R. Schulin, B. Nowack, The influence of EDDS on the uptake of heavy metals in hydroponically grown sunflowers, *Chemosphere* 62 (2006) 1454–1463.

CHAPITRE III :
ARTICLE N°2 :
RÉPONSE INDUITE DANS DES PLANTES
DE *Lathyrus sativus* L. PAR
L'ACCUMULATION DE PLOMB
DANS LES RACINES

Ce travail fait l'objet d'un article soumis à publication dans *Chemosphere* : Brunet J., Varrault G., Zuily-Fodil Y., Repellin A., « Accumulation of lead in the roots of grass pea (*Lathyrus sativus*) plants triggers systemic variation in gene expression in the stems and leaves ».

L'étude précédente a permis de mettre en évidence la tolérance des plantes de *Lathyrus sativus* (lignée locale 'Raipur') à la culture hydroponique en présence de Pb, ainsi qu'une forte accumulation de ce métal dans les racines. Ce travail a pour but de préciser la réponse moléculaire du *Lathyrus* à cette contrainte.

Comme cela a été exposé dans la partie 1 « Etat des connaissances », il a été démontré que la présence de Pb dans le milieu de culture induit chez de nombreuses espèces végétales des modifications au niveau physiologique et moléculaire. Afin de limiter ces effets délétères les plantes développent diverses stratégies. L'évitement consiste à limiter l'entrée du Pb dans les tissus racinaires en multipliant les sites de liaisons à la surface des racines, dans l'apoplasme. La prise en charge des ions métalliques par des chélateurs internes dans le symplasme, tels que les phytochélatines et/ou le glutathion, aboutissent à leur séquestration dans des vacuoles. Les plantes tolérantes mettent en œuvre des mécanismes de protection contre les effets délétères des ions Pb^{2+} sur les structures cellulaires : les espèces activées de l'oxygène (ROS) induites indirectement par la présence de Pb sont pris en charge efficacement ; les composants des structures cellulaires (membranes essentiellement) lésées directement par les ions Pb^{2+} ou indirectement, par les ROS, sont hydrolysées par une batterie d'enzymes hydrolytiques (protéases, enzymes lipolytiques) et d'autres molécules sont synthétisées, mieux adaptées à la présence de Pb.

Sur des plantes de *Lathyrus sativus* appartenant à deux lignées locales ('Raipur' et 'Bangladesh') maintenues comme décrit précédemment en culture hydroponique additionnée de nitrate de Pb, la présente étude a comme objectifs : 1) l'analyse des quantités de Pb accumulées dans les différents organes des plantes (racines, tiges, feuilles) ; 2) la mise en évidence de certains mécanismes moléculaires développés par les plantes, notamment en ce qui concerne les variations de l'accumulation de transcrits de gènes impliqués.

1. Expérimentation

Après six jours de germination, des graines de *Lathyrus sativus* des lignées locales 'Bangladesh' et 'Raipur' ont été conditionnées au milieu Hoagland 1/10, pendant cinq jours sur de la vermiculite. Les plantes âgées de 11 jours ont été cultivées en hydroponie sur milieu de Hoagland 1/10 sans phosphate, additionné ou non de 0.5 mM de nitrate de Pb ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$). Dans ces conditions 77 % du Pb est sous forme d'ion Pb^{2+} . Les plantes ont été récoltées séparément après 96 h de traitement. Une partie des racines a été rincée pendant une heure dans une solution d'EDTA à 1 mM.

Cette expérimentation a permis d'étudier les variations de divers paramètres dont certains communs à l'étude précédente mais sur les deux lignées :

- le développement des plantes et le contenu relatif en eau dans les feuilles,
- les concentrations en Pb dans les racines, tiges et feuilles après minéralisation par spectroscopie (ICP-OES),
- l'expression de gènes impliqués dans les mécanismes de tolérance des plantes à la contrainte induite par la présence de Pb, par PCR quantitative.

2. Discussion

Les plantes de *Lathyrus sativus*, lignées 'Raipur' et 'Bangladesh', exposées au Pb accumulent dans leurs racines des quantités de Pb comparables à celles retrouvées dans les racines de plantes accumulatrices (Meyers *et al.*, 2008). Ceci induit une inhibition rapide de la croissance des racines. Malgré la quasi absence de Pb dans les parties aériennes l'élongation de la tige est faible et les feuilles sont plus petites que celles des témoins. Ce résultat témoigne d'une action systémique du Pb. Ainsi un signal moléculaire serait transmis des racines contaminées par le Pb vers les feuilles, induisant notamment une dormance physiologique. Cet effet direct peut être renforcé par l'effet indirect produit par le déséquilibre en élément minéraux chez ces plantes (Brunet *et al.*, 2008).

La phospholipase $\text{D}\alpha$ ($\text{PLD}\alpha$) est régulée au niveau transcriptionnel par de nombreuses contraintes. Chez les deux lignées de *Lathyrus* elle est exprimée plus fortement dans les racines et les feuilles des plantes exposées au Pb par rapport aux témoins (Tableau 13). Une

telle réponse de la PLD α a été observée au laboratoire en réponse à une autre contrainte abiotique (la sécheresse) chez *Vigna unguiculata* (Matos *et al.*, 2001).

En réponse à la présence de Pb dans les racines, une augmentation de la transcription de la glutathion S-transférase (*LsGST*) a été observée (Tableau 13), ceci indiquerait la possibilité d'une augmentation de la formation de complexes entre les molécules de glutathion (GSH) et les ions Pb (Chasseaud, 1979; Reddy *et al.*, 2005). Une augmentation de l'activité de la GST a été montrée comme directement reliée à la quantité de Pb accumulée chez deux Fabacées (légumineuses) (*Macrotyloma uniflorum* et *Cicer arietinum*) (Reddy *et al.*, 2005).

La présence de Pb est connue pour induire l'augmentation de la production d'espèces activées de l'oxygène (ROS) chez les plantes (Malecka *et al.*, 2001). Dans les racines de *Lathyrus sativus* exposées au Pb, l'augmentation de l'expression des gènes codant la glutathion réductase (*LsGR*) et les ascorbate peroxydases peroxisomale (*LsAPXp*) et cytosolique (*LsAPXc*) (Tableau 13), impliqués dans le cycle ascorbate-glutathion, semble correspondre à l'induction d'une contrainte de type oxydative. L'augmentation de l'expression du gène codant pour une GR a déjà été observé en réponse au Cd et au Hg chez *Medicago sativa* (Ortega-Villasante *et al.*, 2007).

Les racines de *Lathyrus* paraissent donc augmenter leur capacité de tolérance au Pb aussi bien en le complexant avec le glutathion qu'en prenant en charge les ROS induits indirectement par sa présence.

L'absence de variation dans l'expression de l'homoglutathion synthétase (hGSHS) en réponse au Pb (Tableau 13) suggère que les plantes de *Lathyrus* favorisent le GSH par rapport à l'homo-GSH pour répondre à la contrainte cellulaire.

L'absence de variations dans l'expression du gène de la phytochélatine synthétase (PCS) dans les racines des plantes exposées au Pb (Tableau 13) pourrait signifier que la formation de complexes PC-Pb n'est pas une stratégie de séquestration choisie par le *Lathyrus*. Cependant un signal systémique induit une l'augmentation de ce transcrit dans les feuilles.

De la même manière, l'accumulation de transcrit de HSP70 en grande quantité dans les feuilles des plantes exposées au métal (Tableau 13), mais ne contenant pas de Pb, semble répondre au signal induit au niveau des racines et transmis dans les parties aériennes. L'induction systémique des HSP70 a déjà été observée chez le tabac (Hamilton et Coleman, 2001). Le signal induisant l'augmentation de la transcription de la HSP70 peut être l'acide abscissique comme cela à été mis en évidence chez le maïs (Heikkila *et al.*, 1984), de plus cette hormone est produite en réponse à différentes contraintes (Schachtman *et al.*, 1997).

L'augmentation de l'accumulation des ARNm d'aspartique protéase (*LsAP*) et de cystéine protéase (*LsCP*) (Tableau 13) semble également être induite par un signal systémique. Cette contrainte pourrait conduire à une augmentation de l'activité protéolytique dans les feuilles et peut être correspondre à un mécanisme d'autolyse adaptative, comme cela a été montré en réponse à la sécheresse (Zuily-Fodil *et al.*, 1990; Roy-Macauley *et al.*, 1992; Cruz de Carvalho *et al.*, 2001; Drame *et al.*, 2007).

A l'examen des réponses des gènes *LsPCS*, *LsHSP70*, *LsAP* et *LsCP*, il semblerait que le signal émis par les racines en contact avec le Pb puisse correspondre à une stratégie préventive des feuilles (Hamilton et Coleman, 2001). Enfin les résultats de cette étude montrent que deux lignées de *Lathyrus* étudiées présentent des mécanismes de tolérance au Pb similaires.

Tableau 13 : Modulation des expressions, mesurées en PCR en temps réel, des gènes de CP, AP, APXc, APXp, HSP70, GSHS, GST, GR, PCS et PLD α dans les racines, tiges et feuilles de *Lathyrus sativus* cultivés en présence de 0.5 mM Pb(NO₃)₂ par rapport aux témoins ; - : diminution de la quantité relative de transcrits accumulée chez les plantes traitées par rapport aux témoins, +, ++, +++ : augmentation, respectivement, de moins de 2 fois, de 2 à 3 fois et de plus de trois fois de la quantité relative de transcrits accumulée chez les plantes traitées par rapport aux témoins.

	Roots		Shoots		Leaves	
	'Raipur' Pb treated	'Bangladesh' Pb treated	'Raipur' Pb treated	'Bangladesh' Pb treated	'Raipur' Pb treated	'Bangladesh' Pb treated
CP			+		++	++
AP	-				+	+
APXc		+	++	++	++	+
APXp		+	+	++	+	++
HSP70		+	++	++	+++	+++
hGSHS						
GST	+	+++	+	+	+	
GR	++	+++	++	+	+	+
PCS	-				+	++
PLD α	+++	+	+	+	++	+++

Accumulation of lead in the roots of grass pea (*Lathyrus sativus*) plants triggers systemic variation in gene expression in the stems and leaves.

Judicaëlle Brunet^a, Gilles Varrault^b, Yasmine Zuily-Fodil^a, Anne Repellin^{a*}

^a Laboratoire d'Ecophysiologie Moléculaire (UMR-IRD 137), Université Paris Est, 94010 Créteil Cedex, France

^b Centre d'enseignement et de recherche sur l'eau, la ville et l'environnement ; Université Paris Est, ENPC, ENGREF (UMR 102), 94010 Créteil Cedex, France

* Corresponding author:

Laboratoire d'Ecophysiologie Moléculaire (UMR-IRD 137), Université Paris Est, FST, 61 avenue du Général de Gaulle 94010 Créteil Cedex, France, +33 (0)1 45 17 65 65, +33 (0)1 45 17 16 17, repellin@univ-paris12.fr

Introduction

Environmental pollution with toxic metals, such as lead, has become an acute ecological issue. Anthropogenic sources of lead are numerous and diverse. Although poorly mobile in soils, lead can be taken up by plants and disturb growth and development at the concentration of 30 ppm of Pb (Xiong, 1997). All plant metabolisms are affected by this non-essential element, including photosynthesis and mineral acquisition (Rashid and Popovic, 1990; Godbold and Kettner, 1991; Kastori *et al.*, 1992; Singh *et al.*, 1997; Sharma and Dubey, 2005). However, some plant species happen to tolerate the presence of lead and more interestingly, some have developed the capacity to accumulate the element, mostly in their root tissues. A first step in the use of these abilities for the development of phytoremediation technologies to clean-up lead contaminated sites is a better understanding of the cellular mechanisms of tolerance to lead.

Like many other toxic metals (Gratão *et al.*, 2005), lead induces the accumulation of reactive oxygen species (ROS) in plant tissues (Foyer *et al.*, 1994; Malecka *et al.*, 2001; Verma and Dubey, 2003), as a result of an imbalance between ROS production and ROS scavenging

(Lozano-Rodriguez *et al.*, 1997; Cho and Park, 2000). Consequences of the disruption of the cellular redox balance are ROS-induced damage to biomolecules, such as membrane lipids, proteins, chloroplastic pigments, enzymes, and nucleic acids (Mishra and Singhal, 1992). Because ROS (namely: super oxide radical (O_2^-), hydroxyl radical (OH) and hydrogen peroxide (H_2O_2)) formation is part of plant metabolism, they have evolved ROS scavenging pathways that can be used in response to the presence of lead.

The main scavenging pathway implicates glutathione (GSH), a tri-peptide thiol, synthesized from cysteine and glutamate by γ -glutamylcysteine synthetase (γ -ECS) and glutathione synthetase (GS) (Hell and Bergmann, 1988, 1990; Meister, 1995). In response to cellular redox imbalance, constitutive or lead-induced ROS can be detoxified through the ascorbate-glutathione cycle (Mishra *et al.*, 2006). It uses GSH as a reductant which is oxidized to GSSG. Oxidized glutathione is reduced back to GSH by the enzyme glutathione reductase (GR) (Noctor and Foyer, 1998). GSH can also directly minimize the ROS effects on cell membranes by trapping oxygen radicals in the aqueous phase (Barclay, 1988; Bhattacharya and Choudhuri, 1995; Noctor and Foyer, 1998). In addition to GSH, legume species are able to synthesize homogluthathione (hGSH; γ Glu-Cys- β Ala) through homogluthathione synthetase (hGS) activity. There is some evidence that hGSH shares some functions with GSH in antioxidative defense (Moran *et al.*, 2000; Matamoros *et al.*, 2003). GR activity has been shown to increase in response to lead in the roots and shoots of two legume species, horsegram and bengalgram (Reddy *et al.*, 2005), as well as in coontail plant tissues (Mishra *et al.*, 2006).

Data on variation of other enzyme activities in the ascorbate-glutathione cycle in response to lead are missing. However, it is most likely that the entire antioxidant metabolism is boosted in response to lead, as is the case in the presence of other toxic non-essential metal elements like cadmium, mercury and zinc.

Exclusion and sequestration of lead ions represent another strategy evolved by plants to avoid lead-induced damage to cell components. The mobility of lead ions can be lowered by binding to cell walls or to different external ligands, such as phytosiderophore (Kinnerseely, 1993; Antosiewicz and Wierzbicka, 1999). Intracellular metal ions can be complexed to individual glutathione molecules (or its hGSH homologue in legume species) by glutathione S-transferase (GST) enzymes (Chasseaud, 1979) or to (homo)phytochelatins, polymers of (homo)glutathione synthesized by phytochelatin synthase (PCS) (Asada, 1994). GST activity increases in the roots and shoots of horsegram and bengalgram plants exposed to lead (Reddy

et al., 2005) and phytochelatins are induced by lead in the roots of *Rubia tinctorium* (Maitani *et al.*, 1996).

In addition to the preceding defense strategies evolved by plants to prevent toxic metal-induced damage, other consisted in the direct protection of their components or the elimination of damaged components. Molecular chaperones, such as heat shock proteins, have been shown to play a role in protecting intracellular polypeptides against damage or dysfunctions due to stresses like those due to the presence of heavy metals (Wang *et al.*, 2004). Expression of the gene coding chaperone protein HSP70 dramatically increases in response to exposure to Cd, Cu, Pb and Zn (Efremova *et al.*, 2002; Rau *et al.*, 2007). Moreover, in *Vicia faba*, this increase could be correlated with O₂⁻ accumulation (Wang *et al.*, 2008). To avoid the accumulation of abnormal proteins as a result of oxidative damage (Dean *et al.*, 1997), endoproteic activities are stimulated in response to exposure to toxic metals, including lead, as is the case in pea plants contaminated with cadmium (Romero-Puertas *et al.*, 2002). Similarly, damaged membrane lipids can be removed by lipolytic enzymes, such as phospholipases (Navari-Izzo *et al.*, 2006). These activities release precursors for the synthesis of macromolecules better suited to the polluted environment. In addition, they are susceptible to yield signalling substances involved in local or distant response pathways (Pappan and Wang, 1999). Systemic responses have been first described in the context of plant defence responses against pathogens. However, it is now accepted that they represent general responses to a number of biotic and abiotic stresses. Some works have studied the molecular nature of heavy metal-induced signal (Cuypers *et al.*, 2000; Gupta *et al.*, 2000; Metwally *et al.*, 2003)

Grass pea (*Lathyrus sativus* L.) is a legume crop with a unique adaptation features to abiotic stresses such as drought or poor soil conditions (Kaul *et al.*, 1986; Spencer, 1989; Campbell *et al.*, 1994; Hoque *et al.*, 1996; Croft *et al.*, 1999; Vaz Patto *et al.*, 2006) and as a result is considered a promising source of genes of interest (Vaz Patto *et al.*, 2006). Encouraging results published recently suggest that some grass pea lines present elevated tolerance to the presence of lead and that they accumulate large amounts of the element in their root tissues (Brunet *et al.*, 2008). The aim of the present work was to identify transcriptional regulation mechanisms developed by grass pea that could explain its tolerance to lead stress.

Materials and methods

1. Plant growth

a. Nutrient solution

Unless otherwise stated, the composition of the Hoagland N°2 solution used in this study was as follows: 115.3 mg L⁻¹ (NH₄)₂HPO₄, 2.86 mg L⁻¹ B(OH)₃, 656.4 mg L⁻¹ Ca(NO₃)₂·4H₂O, 0.08 mg L⁻¹ CuSO₄·5 H₂O, 5.32 mg L⁻¹ Fe(C₄H₄O₆)₃·2 H₂O, 240.76 mg L⁻¹ MgSO₄·7 H₂O, 1.81 mg L⁻¹ MnCl₂·4 H₂O, 0.016 mg L⁻¹ MoO₃, 606.6 mg L⁻¹ KNO₃, 0.22 mg L⁻¹ ZnSO₄·7 H₂O, pH 5.0 adjusted with HCl.

b. Plant material and lead treatment

Two *Lathyrus sativus* (L.) local lines, 'Bangladesh' and 'Raipur' originating from Bangladesh and India, respectively, were used. Seeds were sterilized in 75% ethanol for 15 min, 2% sodium hypochlorite for 1 h, and thoroughly rinsed in sterilized distilled water. Under sterile conditions, seeds were scarified, soaked in distilled water for 12 h, and germinated on Murashige and Skoog medium (Duchefa Biochemie Kalys, France). Six day-old seedlings of similar size were transferred to expanded vermiculite irrigated with 1/10 Hoagland's N°2 medium, for 5 d. 11 day-old plants were transferred to continuously aerated liquid growth medium (phosphate free 1/10 Hoagland N°2 medium), supplemented or not with 0.5 mM Pb(NO₃)₂. Under these conditions, it was estimated that 77 % of the lead would be as free Pb²⁺ ions (Visual MINTEQ). Seedlings and plants were grown under controlled conditions, as previously described (Brunet *et al.*, 2008). Root, shoot and leaf materials were collected separately after 96 h of hydroponic culture. Roots were washed in phosphate free 1/10 Hoagland N°2 medium and soaked or not in 1 mM EDTA for 1 h. Materials were frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C and duplicates were dried at 35 °C for 7 d.

2. Tolerance index and RWC

Plant tolerance index (IT) and leaf relative water content were determined according to the equations of Wilkins's (Wilkins, 1957) and Barrs and Weatheley (Barrs and Weatheley, 1968), as previously described (Brunet *et al.*, 2008).

3. Total RNA extraction

Total RNA from control and lead-treated roots, stems and leaves (approximately 100 mg of each) was isolated using the Rneasy plant mini kit (Qiagen, France). Procedure included on-

column DNase I treatment with the RNase-free DNase set (Qiagen, France), following the manufacturer's protocols. RNA concentration was determined by spectrophotometry at 260 nm (Nanodrop Noryx, USA) and confirmed by gel electrophoresis in 1% agarose gels ($0.5 \times$ TAE). RNA concentrations were adjusted at $50 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ (shoots, leaves) or $25 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ (roots).

4. cDNA synthesis

Reverse transcription (RT) was performed using the Omnscript RT kit (Qiagen, France). For amplification of partial cDNA, reaction mixtures contained approximately 1400 ng of total RNA from 'Bangladesh' leaves (lead-treated or control plants), $500 \mu\text{M}$ of each dNTP, $1 \mu\text{M}$ of oligo-dT primer, 10 units of enzyme mix, 25 units of RNase inhibitor and $5 \mu\text{L}$ of $10\times$ buffer in final volumes of $50 \mu\text{L}$. Samples were incubated at $37 \text{ }^\circ\text{C}$ for 60 min. For gene expression analysis, 1400 ng of total RNA from 'Bangladesh' and 'Raipur' leaves, shoots and roots were reverse-transcribed as described above.

5. Amplification of partial cDNA

For each target gene, degenerated or species-specific primers were designed from alignments of corresponding sequences previously determined in other leguminous plant species. They were used to isolate partial cDNA sequences by PCR. $1 \mu\text{L}$ of the first strand cDNA synthesis was used as a template. Reaction mixtures contained 20 pmol of each primers and $12.5 \mu\text{L}$ of $2\times$ PCR Master Mix (Promega, France) in final volumes of $25 \mu\text{L}$. The gradient Mastercycler (Eppendorf, France) cycling parameters included an initial denaturation (15 min at $95 \text{ }^\circ\text{C}$), 30-35 cycles (depending on the target gene), as follows: denaturation step 40 s at $95 \text{ }^\circ\text{C}$; annealing step 30 s at $T_m \text{ }^\circ\text{C}$ (Table 1); extension step 30-60 s at $72 \text{ }^\circ\text{C}$, and a final extension step (10 min at $72 \text{ }^\circ\text{C}$).

6. cDNA sequencing and identification

PCR products were cloned into the pGEM-T Easy plasmid (Promega, France) following the manufacturer's instructions and used to transform *Escherichia coli* competent bacteria (GT869) by heat shock. Plasmidic DNA of single colonies was extracted by Wizard[®] Plus SV Minipreps DNA Purification System kit (Promega, France) and PCR with T7 and SP6 primers were performed to confirm proper cloning. Inserts were sequenced on both directions using T7 and SP6 primers by Genoscreen (Lille, France). Sequence identity was determined using

the nucleotide Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) and Fasta (<http://www.ebi.ac.uk/fasta33/>) programs.

7. Gene expression analysis

For each target gene, *Lathyrus sativus* specific primer pairs, featuring no dimerization possibility, were designed from the partial cDNA sequences isolated in this study (<http://www.premierbiosoft.com/netprimer/netprlaunch/netprlaunch.html>). A *Lathyrus* poly-ubiquitine gene was chosen as an internal control and specific primers were designed from a grass pea EST sequence (DY396428). qPCR reactions (10 μ L) contained 1 μ L of cDNA (\approx 50 ng of source RNA), 5 pmol of both sense and antisense primers and 2 μ L of 5 \times LC Fast Start DNA Master^{PLUS} SYBR Green 1 (Roche, France). Real-time PCR reactions were performed using the Light Cycler 2.0 (Roche, France). The cycling parameters were as follows: 10 min at 95 $^{\circ}$ C, 40 cycles (20 sec at 95 $^{\circ}$ C, 20 sec at T_m $^{\circ}$ C and 20 sec at 72 $^{\circ}$ C). Following qPCR reactions, melting/fusion curves were established to verify amplification specificities.

The relative gene expression was calculated as follows:

$$\text{Relative expression} = \frac{E^{(Ct_{\text{target gene of control sample}} - Ct_{\text{target gene of stressed sample}})}}{E^{(Ct_{\text{reference gene of control sample}} - Ct_{\text{reference gene of stressed sample}})}}$$

E = efficiency of target amplification

Ct = threshold cycle

8. Lead content analysis

Dry roots, shoots and leaves (approximately 100 mg each) were digested with suprapur nitric acid (65% m/v; Merck, France) and hydrogen peroxide (30% v/v; Merck, France) at 95 $^{\circ}$. Lead levels were determined by inductively coupled plasma optical emission spectroscopy (ICP-OES), using a Varian Vista MPX instrument.

Results

1. Isolation of grass pea partial cDNA sequences

Partial cDNA sequences were obtained by RT-PCR on leaf total RNA from *Lathyrus sativus* line 'Bangladesh', submitted or not to lead treatment. Degenerated or heterologous primer sequences were chosen in regions specific of the corresponding proteins. These primers (Table 1) were able to amplify partial cDNA sequences encoding putative proteins: a cysteine protease (LsCP), an aspartic protease (LsAP), cytosolic (LsAPXc) and peroxisomal (LsAPXp) ascorbate peroxidases, a phospholipase D α (LsPLD α), a homoglutathione synthase (LshGSHS), a glutathione S-transferase (LsGST), a glutathione reductase (LsGR), a phytochelatin synthase (LsPCS), a heat shock protein 70 (LsHSP70) and a poly-ubiquitin (LspUBQ). Deduced amino acid sequence identification and analysis, using the Blast program (Table 2), revealed that all the isolated sequences contained one or more motifs characterizing the corresponding protein (Fig. 1). LsCP (239 aa) contained the three conserved regions that define the consensus site of cysteine proteases. These motifs were the cysteine domain Q-x(3)-[GE]-x-C-[YW]-x(2)-[STAGC]-[STAGC], the histidine domain [LIVMGSTAN]-x-H-[GSACE]-[LIVM]-x-[LIVMAT]-[LIVMAT]-G-x-[GSADNH] and the asparagine domain [FYCH]-[WI]-[LIVT]-x-[KRQAG]-N-[ST]-W-x(3)-[FYW]-G-x(2)-G-[LFYW]-[LIVMFYF]-x-[LIVMF] (Nieuwenhuizen *et al.*, 2007). LsAP (270 aa) contained the plant specific insertion and the aspartic acid residue characterizing the active site. LsAPXc (195 aa) and LsAPXp (226 aa) presented peroxidases essential residues (Arg38, Trp41, His42, Glu65, Asn71, His143, His163, Arg172, Trp179, Asp208, as numbered from cowpea VucAPX sequence (d'Arcy-Lameta *et al.*, 2006). In addition, LsAPXc presented the Glu112 residue specific to cytosolic APX (Shigeoka *et al.*, 2002; D'Arcy-Lameta *et al.*, 2006). LsPLD α (288 aa) showed the (H-x-K-x(4)-D) motif characterising phospholipases D catalytic site and the highly conserved box B (IYIENQYFL) (Maarouf *et al.*, 1999). LshGSHS (320 aa) included the 14 amino acid residues involved in the catalytic site of several plant and animal hGSHS and GSHS (Frendo *et al.*, 2001). LsGST (66 aa) contained the G-x-[ED]-x(5)-D-[IVL] motif conserved in all glutathione S-transferases and the A-R-F-W-[AVI]-x(2)-[VIA]-[DE]-x-K motif specific of the tau class of GST (Zeng *et al.*, 2005). LsGR (336 aa) included three motifs common to plant GR representing three glutathione binding sites, the NADPH binding site and the redox-active disulfite bridge (Stevens *et al.*, 1997). Sequence analysis of LsGR suggested that it was a cytosolic isoform (in Contour-Ansel *et al.*, 2006). LsPCS (64 aa)

cDNA fragment showed over 75% identity levels to known legume plant PC synthases (Table 2). LsHSP70 sequence (287 aa) was highly similar (up to 83% identity) to regions corresponding to the ATPase domain of HSP 70 sequences. LspUBQ (70 aa) was identical to the corresponding sequence of a previously isolated *Lathyrus* EST (Table 2).

Overall, percentages of identity between the *Lathyrus* sequences isolated here and the corresponding sequences from other leguminous plant species were high (above 75%). This strongly suggested that they were genuine sequences coding regions of the proteins listed above. In addition, the *Lathyrus* sequences always were most similar to sequences from pea (*Pisum sativum* L.), a member of the *Fabeae* tribe, like grass pea. Specific sequences were designed to qPCR amplifications (Table 3).

Table 1 : Heterologous primers used to amplified fragments of *Lathyrus sativus* cDNA coding a cysteine protease (CP), an aspartic protease (AP), a cytosolic (APXc) and a peroxisomal (APXp) ascorbate peroxidases, a phospholipase D α (PLD α), a homoglutathione synthase (hGSHS), a glutathione S-transferase (GST), a glutathione reductase (GR), a phytochelatin synthase (PCS), and a heat shock protein 70 (HSP70) .

Gene	Primer sequence	T _m (°C)
CP	5' GTGTYAATCAKTTTGCTGAT 3' 5' TTCCCATYTTCCATYTTGAA 3'	50
AP	5' GTTTTTGGWGGTGTGACCC 3' 5' CTGCTTCRGCAAACKCMACT 3'	50
APXc	5' CGTTTGGCATGGCACTCTG 3' 5' GCRAARAARGCRTCYTCRTC 3'	56
APXp	5' CCTAACGGTTCGATCCGTAACGAG 3' 5' CATAACAAGTAACTGAGGATCAC 3'	54
PLD α	5' CACCATGATGATTTTCATCAGCC 3' 5' TATCATCAACAATCAT 3'	60
hGSHS	5' GGAAGAGTTCCTGGTGTGGG 3' 5' CCTCCTCCTTCTTTGAGG 3'	51
GST	5' CAGGCTAGATTCTGGGCTG 3' 5' TGGAACAAGTGCTATATCCAC 3'	54
GR	5' GGAGCATCTTATGGAGGTGAAC 3' 5' CAGTTTTTCTTGTCGCCCAG 3'	60
PCS	5' CCTAATGGATGATGTGCCTT 3' 5' CTTCTTTGACAGCGAGCCTT 3'	54
HSP70	5' CAAACACAAAAGAGATG 3' 5' CCCTCCAACAAGAAGAAC 3'	44

Nucleotides are indicated by IUPAC 1-letter codes (N = A + C + G + T; R = A + G; Y = C + T; S = C + G; H = A + C + T; D = A + G + T; M = A + C).

Table 2: Percent identity of deduced grass pea partial LsCP, LsAP, LsAPXc, LsAPXp, LsPLD α , LshGSHS, LsGST, LsGR, LsPCS, LsHSP70 and LspUBQ amino acid sequences with the corresponding regions of related sequences from other species.

Putative proteins	Species	GenBank accession no.	Amino acid (% identity)
LsCP (239 aa)	<i>Pisum sativum</i>	CAA92583	94
	<i>Medicago sativa</i>	ABF18679	91
	<i>Actinidia deliciosa</i>	ABQ10199	82
	<i>Nicotamia benthamiana</i>	AAZ32410	78
LsAP (270 aa)	<i>Glycine max</i>	BAB62890	76
	<i>Vigna unguiculata</i>	AAB03843	76
	<i>Cucurbita pepo</i>	BAA19607	75
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AAC17620	74
LsAPXc (195 aa)	<i>Pisum sativum</i>	CAA43992	98
	<i>Glycine max</i>	BAC92738	92
	<i>Vigna unguiculata</i>	AAB03844	92
	<i>Arachis hypogea</i>	ABM45856	91
LsAPXp (226 aa)	<i>Vigna unguiculata</i>	AAS46016	83
	<i>Cucurbita sp. cv. Kurokawa</i>	BAB64351	80
	<i>Amakuri</i>		
	<i>Gossypium hirsutum</i>	AAB52954	79
	<i>Populus tomentosa</i>	AAV58827	77
LsPLD α (288 aa)	<i>Arachis hypogaea</i>	BAE79735	88
	<i>Vigna unguiculata</i>	AAB51392	86
	<i>Gossypium hirsutum</i>	ABN51235	87
	<i>Ricinus communis</i>	AAB37305	86
LshGSHS (329 aa)	<i>Pisum sativum</i>	AAF98156	96
	<i>Medicago truncatula</i>	AAD29849	87
	<i>Lotus japonicus</i>	AAO92441	82
	<i>Glycine max</i>	CAB91078	79
LsGST (66 aa)	<i>Caragana korshinskii</i>	ABG90381	83
	<i>Glycine max</i>	AAC18566	80
	<i>Vitis vinifera</i>	EF140721	73
	<i>Nicotamia tabacum</i>	P25317	72
LsGR (336 aa)	<i>Pisum sativum</i>	Q43621	96
	<i>Vigna unguiculata</i>	ABB89042	91
	<i>Spinacia oleracea</i>	Q43154	82
	<i>Mesembryanthemum crystallinum</i>	CAC13956	81
LsPCS (64 aa)	<i>Sesbania rostrata</i>	AAY83876	82
	<i>Glycin max</i>	AAL78384	79
	<i>Lotus japonicus</i>	AAQ01752	78
	<i>Solanum tuberosum</i>	CAD68109	62
LsHSP70 (287 aa)	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Q01899	83
	<i>Pisum sativum</i>	P37900	83
	<i>Medicago truncatula</i>	ABE92899	82
	<i>Spinacia oleracea</i>	AAB91473	80
LspUBQ (70 aa)	<i>Lathyrus sativus</i>	DY396428	

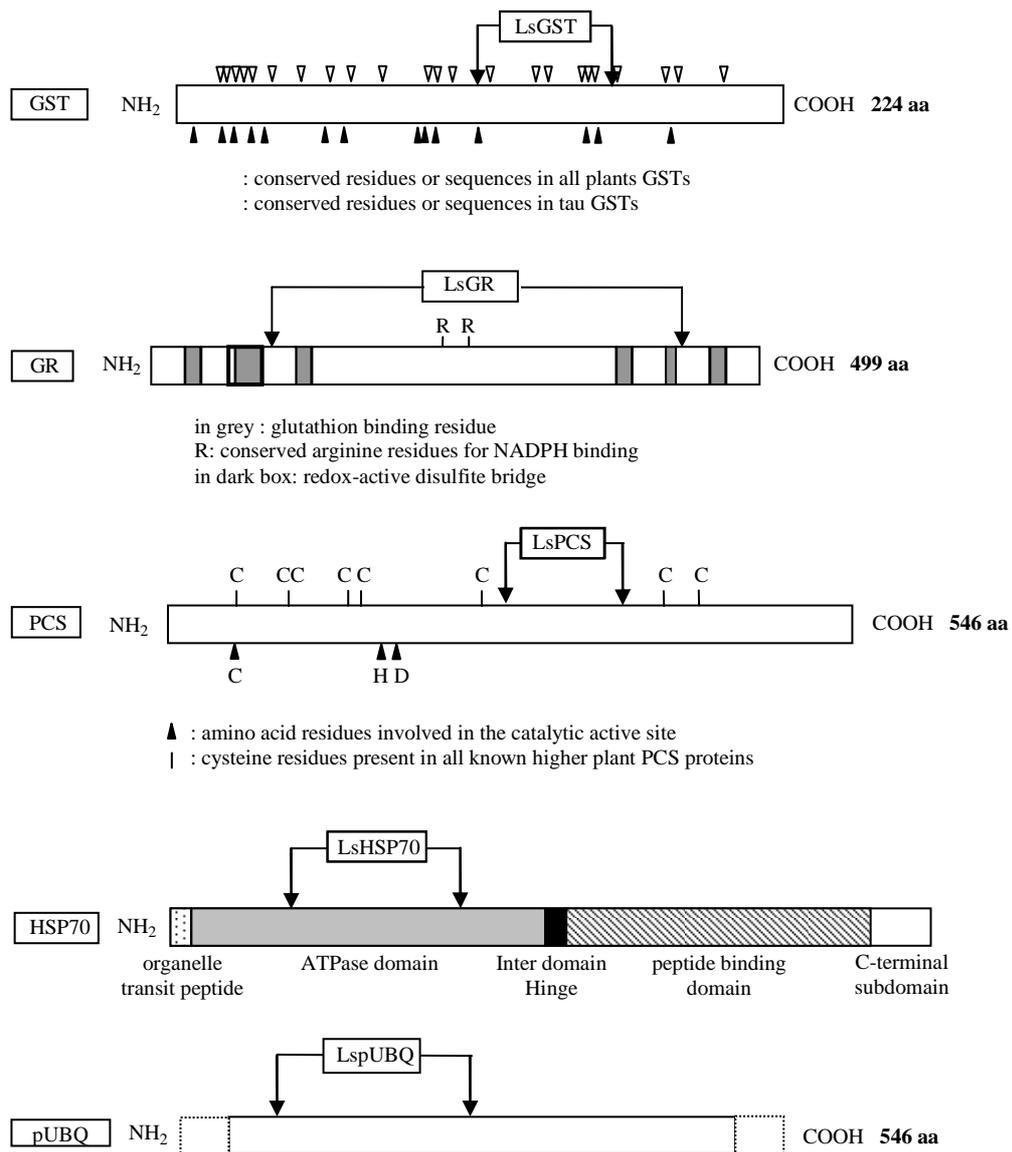


Table 3: Homologous primers designed for each grass pea cDNA sequence and used to study *LsCP*, *LsAP*, *LsAPXc*, *LsAPXp*, *LsPLD α* , *LsGSHS*, *LsGST*, *LsGR*, *LsPCS*, *LsHSP70* and *LspUBQ* gene expression using real time PCR; $T_m = 54^\circ$ for all probes.

Gene	Primer sequence	Product size (bp)
<i>LsCP</i>	5' GTCATAGACTTGGTGCTGCTC 3' 5' ACTAACTGCTGCTCAGAAAGA 3'	232
<i>LsAP</i>	5' GTGCCACAGACTGATAGAATA 3' 5' GTGAAGGAAACATTAGGCAT 3'	223
<i>LsAPXc</i>	5' CAGTTGGCTGGCGTTGTTGCT 3' 5' TCCAGAACGCTCCTTGTGTGC 3'	231
<i>LsAPXp</i>	5' GAGGAAGTGAAGGCAAAGCAT 3' 5' GTCAGTCAAGCCCATAACGATA 3'	213
<i>LsPLDa</i>	5' GACTCTCCTGAAGATGCTGCT 3' 5' TAATCCCATCAGCACTCCA 3'	172
<i>LshGSHS</i>	5' CCTTATTACCTCCACCATTTTC 3' 5' CGAAATAATCCCAACCGAAT 3'	223
<i>LsGST</i>	5' TAGATTCTGGGCTGATTTTGT 3' 5' CTTGTCTCCCAACTCTTGCT 3'	147
<i>LsGR</i>	5' GCCTGCTCCTCACTTAGACC 3' 5' ATGGGCTGTGGGTGATGTAA 3'	183
<i>LsPCS</i>	5' CCTAATGGATGATGTGCCTT 3' 5' CTTCTTTGACAGCGAGCCTT 3'	194
<i>LsHSP70</i>	5' TTTCTTGGGAGGAGAGGACTT 3' 5' AGCAGTGATGAAAGGCAGGTT 3'	190
<i>LspUBQ</i>	5' CAGCAGAGGTTGATCTTTGCA 3' 5' GGCCTCAATATAGGACCCTA 3'	210

2. Plant development and leaf RWC

After 96h of culture in liquid medium supplemented or not with 0.5 mM lead nitrate, all grass pea plants had survived. In the control plants, fold-increases in length for roots and shoots were 2.5 and 1.3, respectively ('Bangladesh' plants) and 1.9 and 1.4 for 'Raipur' plants, respectively (Tables 4 and 5). No elongation was observed in the roots and shoots of the plants exposed to lead (Tables 4 and 5). No significant differences between the tolerance indexes of the two lines over the course of the experiment were observed (TI; Table 6). The leaves of the lead-exposed plants remained green and free of necrotic areas in both lines. Leaf size was reduced in response to the lead treatment. However, the number of leaves per stem was not affected (data not shown). The RWC values in the leaves of grass pea plants were slightly higher in the lead-treated plants than in the control ones (Table 7).

Table 4: Maximum length (cm) of the roots and shoots of grass pea plants (line Bangladesh) exposed to 0.5 mM lead nitrate in a P-free modified Hoagland's medium after 0h and 96h of treatment (n=3).

	roots		shoots	
	control	Pb treated	control	Pb treated
0 h	8.7 ± 1.1	8.5 ± 1.5	18.7 ± 1.4	18.5 ± 0.7
96 h	21.8 ± 2.1	9.0 ± 1.8	24.7 ± 1.1	19.8 ± 2.1

Table 5: Maximum length (cm) of the roots and shoots of grass pea plants (line Raipur) exposed to 0.5 mM lead nitrate in a P-free modified Hoagland's medium after 0h and 96h of treatment (n=3).

	roots		shoots	
	control	Pb treated	control	Pb treated
0 h	12.6 ± 1.2	11.3 ± 2.8	15.3 ± 0.3	14.7 ± 0.3
96 h	24.7 ± 3.9	11.8 ± 1.7	21.7 ± 1.4	16.3 ± 1.1

Table 6: Tolerance indexes (%) of grass pea (lines Bangladesh and Raipur) plants exposed to 0.5 mM lead nitrate in a P-free modified Hoagland's medium after 0h, 24h, 48h, 72h, and 96h of treatment (n=3).

	0h	24h	48h	72h	96h
Bangladesh	98.1 ± 17.3	98.1 ± 11.6	64.3 ± 9.4	57.4 ± 11.5	41.2 ± 8.3
Raipur	89.9 ± 22.4	75.3 ± 18.2	59.8 ± 12.7	54.6 ± 8.2	46.0 ± 7.2

Table 7: Relative water content in grass pea plants, lines Bangladesh and Raipur, grown (96h) in 1/10 modified Hoagland's medium supplemented with 0.5 mM Pb(NO₃)₂ or not. Values are means ± (SD) (n=3).

	C (%)	Pb (%)
Bangladesh	93.1 ± 0.6	97.6 ± 0.8
Raipur	91.2 ± 0.9	97.4 ± 5.6

3. Lead contents

Neither the roots, shoots nor the leaves of the control plants contained detectable amounts of lead (data not shown). The lead-treated plants accumulated large amounts of lead per unit of dry mass in their root systems (139.1 mg gDW⁻¹ and 153.0 mg gDW⁻¹ in 'Bangladesh' and 'Raipur' lines, respectively). Very little amounts of lead were found in the stems of the plants

of both lines and no lead was detected in the leaves (Table 8). Rinsing the roots with EDTA prior to mineralization induced small decreases in the root lead contents, in both lines (Table 8).

Table 8: Lead content (mg Pb / g DW) in grass pea plants, lines Bangladesh and Raipur, grown (96h) in 1/10 modified Hoagland's medium supplemented with 0.5 mM Pb(NO₃)₂ or not. Values are means ± (SD) (n=3).

	Roots		shoots	leaves
	- EDTA rinsing	+ EDTA rinsing		
Bangladesh	139.1 ± 6.9	107.3 ± 18.1	0.5 ± 0.1	nd
Raipur	153.0 ± 7.6	137.8 ± 8.2	1.5 ± 1.0	nd

4. Gene expression

In the roots, where substantial quantities of lead accumulated per unit DW, important increases (more than 2 times) in steady-state accumulation of transcripts were observed for three out of the ten target genes studied here: LsGR, LsGST and LsPLD α . Transcript levels for cytosolic and peroxisomal LsAPX, and LsHSP70 were mildly enhanced (less than 2 times) by the lead treatment. LsPCS, LsGSHS, LsCP and LsAP transcript levels remained unchanged or decreased slightly as compared to control plants (Fig. 2).

In the stems of the lead-treated plants, LsGR, LsGST, LsPLD α , LsAPXc and LsHSP70 genes were over-expressed to similar extents (average fold-increase of 2) in both lines. LsCP and LsAPXp transcripts over-accumulated in only the 'Raipur' and the 'Bangladesh' lines, respectively. LsGSHS, LsPCS and LsAP expression levels remained unchanged as compared with controls (Fig. 2).

Despite the minute amounts of lead found in the leaves, relatively high increases in transcript accumulation were observed, as compared with the root and stem tissues. They concerned LsCP, LsHSP70, LsPCS and LsPLD α (Fig. 2). As was the case in the roots and stems, leaf LsGSHS transcript level remained equivalent to that of the controls.

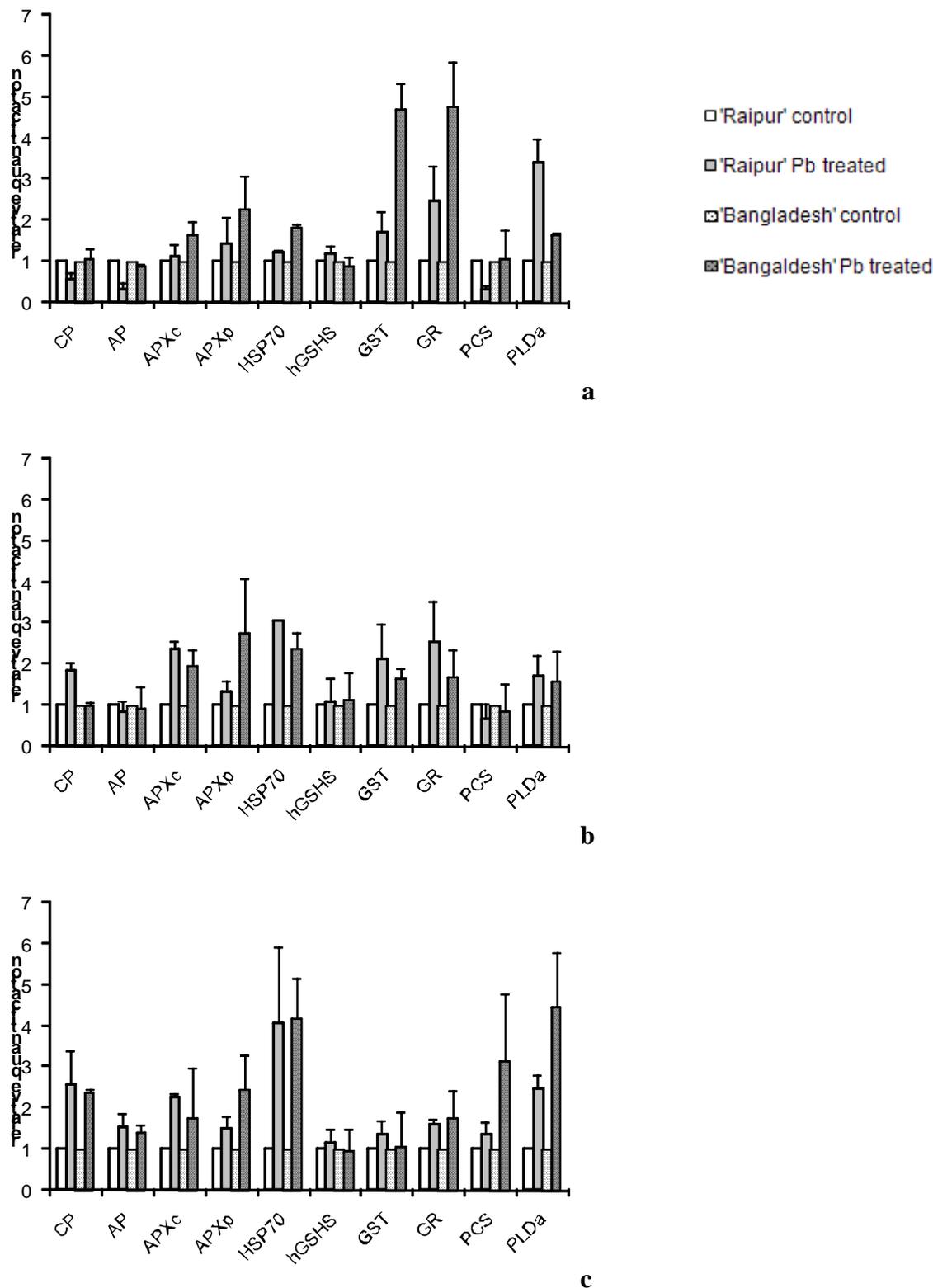


Fig. 2: Relative quantification of CP, AP, APXc, APXc, HSP70, GSHS, GST, GR, PCS and PLD α mRNA transcripts by real time RT-PCR in roots (a), shoots (b) and leaves (c) of grass pea plants, lines Bangladesh and Raipur, grown (96h) in 1/10 modified Hoagland's medium supplemented with 0.5 mM Pb(NO₃)₂ or not. pUBQ was used as housekeeping gene.

Discussion

Hydroponically grown grass pea plants (from local lines Raipur and Bangladesh) exposed to lead nitrate accumulated amounts of lead in their roots that were similar to those found in the roots of acknowledged phytoaccumulators, such as *Brassica juncea* (Meyers *et al.*, 2008). As discussed recently, this characteristic of grass pea could lead to the development of novel systems for the decontamination of lead containing waters (Brunet *et al.*, 2008).

The presence of lead in the nutrient solution inhibited root growth approximately 24h into the treatment with lead nitrate. This is a typical response to lead and has been assigned to an inhibitory effect on both root cell division and elongation (Wierzbicka, 1989; Wozny and Jerczynska, 1991; Seregin and Ivaniov, 1997; Obroucheva *et al.*, 1998; Eun *et al.*, 2000; Malkowski *et al.*, 2002). In addition to root growth, shoot elongation and leaf enlargement were also inhibited, despite the fact that translocation of the pollutant into the stems was minute and below detection level into the leaves. The impact of root lead on the growth of lead-free organs was indicative of two processes. In one of them, a molecular signal, translocated from the contaminated root tissues to the upper parts of the plants induced physiological dormancy in a systemic fashion. This will further be referred to as the direct systemic lead effect. In the second process, lead-induced damage to the roots prevented optimal nutrition, hence the arrest in shoot growth. Mineral imbalances in essential mineral elements like potassium, sodium and mostly calcium have been previously observed in grass pea under these experimental conditions (Brunet *et al.*, 2008). These effects will be categorized as indirect lead effects mediated through pleiotropic impact on mineral nutrition. We further investigated the occurrence of these processes at the cellular level by comparing the steady-state accumulations of a series of ten mRNA transcripts in the roots, stems and leaves. They corresponded to proteins all previously shown to be involved in cellular stress responses implicating or not toxic elements like lead.

The progressive accumulation of LsHsp70 transcripts from roots to leaves, in the lead-treated plants contaminated only in their roots, strongly suggested the development of a direct systemic lead effect, at the transcriptional level. Systemic induction of HSP70 that spread from mechanically damaged or heated leaves to intact ones has been previously observed in tobacco plants (Hamilton and Coleman, 2001). The nature of the molecular signal triggering Hsp70 messenger accumulation in grass pea could be ABA since this phytohormone has been shown to do so in maize mesocotyls (Heikkila *et al.*, 1984). Furthermore, roots are known to

produce ABA in response to stress (Jiang and Hartung, 2008). However, indirect lead effect mediated through perturbancy of mineral nutrition should not be ruled out since nitrate deficiency can triggers accumulation of HSP70 proteins.

Contrary to LsHsp70 transcripts, LsGST and LsGR messengers accumulated mostly in the roots where large quantities of lead were present. These two activities could therefore to be transcriptionally regulated by the presence of lead in grass pea. In two other legume species (horsegram and bengalgram), both GST and GR activity levels were directly related to the amounts of lead accumulated in roots and leaves (Reddy *et al.*, 2005). Lead slightly stimulated the accumulation of ascorbate peroxidase transcripts (both cytosolic and plastidial) in the roots. APX and GR are both involved in the ascorbate-glutathione cycle which corresponds to the main intracellular detoxication pathway for ROS (Noctor and Foyer, 1998). Together, these results suggested that the contaminated grass pea root tissues potentially increased both their capacity of sequestration of lead ions through the formation of glutathione (GSH)-Pb complexes as well as their ROS scavenging capacity, mostly through transcription of a gene coding GR, an enzyme involved in the recycling of cellular GSH/hGSH.

As discussed above for the reduction in shoot growth, stimulation of antioxidant metabolisms is a typical response to exposure to metallic trace elements, like lead (Huang and Cunningham, 1996; Piechalak *et al.*, 2002; Piechalak *et al.*, 2003; Verma and Dubey, 2003). Furthermore, the lack of variation in the accumulation of hGSHS transcripts throughout the plants in response to the lead treatment suggested that grass pea favored glutathione over homoglutathione to mediate cellular responses to lead. The absence of variation in the accumulation of root phytochelatin synthase messengers suggested that the possibility of sequestering lead through formation of phytochelatin-lead complexes is not developed under these experimental conditions, in grass pea plants. Accordingly, the involvement of PC in the processing of lead ions over long-term exposures has been questioned (Clemens, 2006). This is another element showing that glutathione and not its derivatives, like phytochelatins, seems to be a pivotal molecule for cellular responses to the presence of lead in grass pea.

Both increases in the accumulation of LsHsp70 and to a lesser extent of LsAPX and LsPCS in a systemic fashion, as a response to distant exposure to lead could be part of a prevention strategy by the plants. Similarly, a preventive systemic increase in the activities of the ascorbate redox enzymes APX, MDAR and DHAR has been observed in the intact leaves of wheat seedlings accumulating cadmium in their roots only (Paradiso *et al.*, 2008). However,

because HSP70 is considered a marker of early oxidative injury in animal systems (Zourqui *et al.*, 2008), it is possible that the systemic signal could be of oxidative nature. The fact that the genes coding two endoproteases (LsAP and LsCP) were both overexpressed only in the leaves of the grass pea plants is another indication that some oxidative signal was emitted from the roots because removal of oxidatively modified polypeptides is the main function attributed to the corresponding proteins (Pacifici and Dacies, 1993).

The present experiment was carried out on two local lines of grass pea that appear to differ in their strategies to cope with drought stress (Pr Laffray, personal communication). The results presented here did not highlight striking differences between the two lines in their responses to the treatment with lead, either at the phenological or at the cellular levels. Therefore the conclusions brought about by these results apply to both lines equally.

References

- Antosiewicz DM, Wierzbicka M** (1999) Localization of lead in *Allium cepa* L. cells by electron microscopy. *Journal of Microscopy* **195**: 139-146
- Asada K** (1994) Production and action of active oxygen species in photosynthetic tissues. *In* CHFaPM Mullineaux, ed, Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defense Systems in Plants. CRC Press, Boca Raton, pp 77-104
- Barclay LRC** (1988) The cooperative antioxidant role of glutathione with a lipid-soluble and a water-soluble antioxidant during peroxidation of liposomes initiated in the aqueous phase and in the lipid phase. *Journal of Biological Chemistry* **263**: 16138-16142
- Barrs C, Weatheley PE** (1968) A re-examination of the relative turgidity technique for estimating water deficit in leaves. *Australian Journal of Biological Sciences* **15**: 413-428
- Bhattacharya M, Choudhuri MA** (1995) Heavy metal (Pb²⁺ and Cd²⁺) stress induced damages in *Vigna* seedlings and possible involvement of phytochelatin-like substances in mitigation of heavy metal stress. *Indian Journal of Experimental Biology* **33**: 236-238
- Brunet J, Repellin A, Varrault G, Terryn N, Zuily-Fodil Y** (2008) Lead accumulation in the roots of grass pea (*Lathyrus sativus* L.): a novel plant for phytoremediation systems? *C. R. Biologies*
- Brunet J, Repellin A, Varrault G, Terryn N, Zuily-Fodil Y** (2008) Lead accumulation in the roots of grass pea (*Lathyrus sativus* L.): a novel plant for phytoremediation systems? *Comptes Rendus Biologies* **331**: 859-864

- Campbell CG, Mehra RB, Agrawal SK, Chen YZ, Abd El Moneim AM, Khawaja HIT, Yadov CR, Tay JU, Araya WA** (1994) Current status and future strategy in breeding grasspea (*Lathyrus sativus*). *Euphytica* **73**: 167-175
- Chasseaud LF** (1979) The role of glutathione S-transferases in the metabolism of chemical carcinogens and other electrophilic agents. *Advance Cancer Research* **29**: 175-185
- Cho U-H, Park J-O** (2000) Mercury-induced oxidative stress in tomato seedlings. *Plant Science* **156**: 1-9
- Clemens S** (2006) Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. *Biochimie* **88**: 1707-1719
- Croft AM, Pang ECK, Taylor PWJ** (1999) Molecular analysis of *Lathyrus sativus* L. (grasspea) and related *Lathyrus* species. *Euphytica* **107**: 167-176
- Cuypers A, Vangronsveld J, Clijsters H** (2000) Biphasic effect of copper on the ascorbate-glutathione pathway in primary leaves of *Phaseolus vulgaris* seedlings during the early stages of metal assimilation. *Physiologia Plantarum* **110**: 512-517
- D'Arcy-Lameta A, Ferrari-Iliou R, Contour-Ansel D, Pham-Thi AT, Zuily-Fodil Y** (2006) Isolation and characterization of four ascorbate peroxidase cDNAs responsive to water deficit in cowpea leaves. *Annals of Botany* **97**: 133-140
- Dean RT, Fu S, Stocker R, Davies MJ** (1997) Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochemical Journal* **324**: 1-18
- Efremova SM, Margulis BA, Guzhova IV, Itskovich VB, Lauenroth S, Müller WEG, Schröder HC** (2002) Heat shock protein Hsp70 expression and DNA damage in Baikalian sponges exposed to model pollutants and wastewater from Baikalsk Pulp and Paper Plant. *Aquatic Toxicology* **57**: 267-280
- Eun SO, Youn HS, Lee Y** (2000) Lead disturbs microtubule organization in the root meristem of *Zea mays*. *Physiologia Plantarum* **110**: 357-365
- Foyer CH, Descourvieres P, Kunert KJ** (1994) Protection against oxygen radicals: an important defence mechanism studied in transgenic plants. *Plant, Cell & Environment* **17**: 507-523
- Frendo P, Jimenez MJH, Mathieu C, Duret L, Gallesi D, Van de Sype G, Herouart D, Puppo A** (2001) A *Medicago truncatula* Homoglutathione Synthetase Is Derived from Glutathione Synthetase by Gene Duplication. *Plant Physiology* **126**: 1706-1715
- Godbold DL, Kettner C** (1991) Lead influences root growth and mineral nutrition of *Picea abies* seedlings. *Journal of Plant Physiology* **139**: 95-99
- Gupta V, Willits MG, Glazebrook J** (2000) *Arabidopsis thaliana* EDS4 Contributes to Salicylic Acid (SA)-Dependent Expression of Defense Responses: Evidence for Inhibition of Jasmonic Acid Signaling by SA. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **13**: 503-511
- Hamilton EW, Coleman JS** (2001) Heat-shock proteins are induced in unstressed leaves of *Nicotiana attenuata* (Solanaceae) when distant leaves are stressed. *American Journal of Botany* **88**: 950-955
- Heikkila JJ, Papp JET, Schultz GA, Bewley JD** (1984) Induction of Heat Shock Protein Messenger RNA in Maize Mesocotyls by Water Stress, Abscisic Acid, and Wounding. *Plant Physiology* **76**: 270-274

- Hell R, Bergmann L** (1988) Glutathione synthetase in tobacco suspension cultures: catalytic properties and localization. *Physiologia Plantarum* **72**: 70-76
- Hell R, Bergmann L** (1990) γ -glutamylcysteine synthetase in higher plants: catalytic properties and subcellular localization. *Planta* **180**: 603-612
- Hoque R, Hussain M, Kuo YH, Lambein F** (1996) Salinity tolerance and accumulation of neurotoxin and excitatory amino acids in *Lathyrus sativus*. *Bangladesh Journal of Biochemistry* **2**: 15-27
- Huang JW, Cunningham SD** (1996) Lead phytoextraction: species variation in lead uptake and translocation. *New Phytologist* **134**: 75-84
- Jiang F, Hartung W** (2008) Long-distance signalling of abscisic acid (ABA): the factors regulating the intensity of the ABA signal. *J. Exp. Bot.* **59**: 37-43
- Kastori R, Petrovic M, Petrovic N** (1992) Effect of excess lead, cadmium, copper and zinc on water relations in sunflower. *Journal of Plant Nutrition* **15**: 2427-2439
- Kaul AK, Islam MQ, Hamid A** (1986) Screening of *Lathyrus* germplasm of Bangladesh for BOAA content and some agronomic characters. *In Proceedings of the International Symposium on Lathyrus and Lathyrism*. Third World Medical Research Foundation, New York, pp 130-141
- Kinnerseely TAM** (1993) The role of phytochelates in plant growth and productivity. *Journal of Plant Growth Regulation* **12**: 207-217
- Lozano-Rodriguez E, Hernandez LE, Bonay P, Carpena-Ruiz RO** (1997) Distribution of cadmium in shoot and root tissues of maize and pea plants: physiological disturbances. *Journal of Experimental Botany* **48**: 123-128
- Maarouf H, Zuily-Fodil Y, Gareil M, d'Arcy-Lameta A, Thu Pham-Thi A** (1999) Enzymatic activity and gene expression under water stress of phospholipase D in two cultivars of *Vigna unguiculata* L. Walp. differing in drought tolerance. *Plant Molecular Biology* **39**: 1257-1265
- Maitani T, Kubota H, Sato K, Yamada T** (1996) The composition of metals bound to class III metallothionein (phytochelatin and its desglycyl peptide) induced by various metals in root cultures of *Rubia tinctorum*. *Plant Physiology* **110**: 1145-1150
- Malecka A, Jarmuszkiewicz W, Tomaszewska B** (2001) Antioxidative defense to lead stress in subcellular compartments of pea root cells. *Acta Biochimica Polonica* **48**: 687-698
- Malkowski E, Kita A, Galas W, Karcz W, Kuperberg JM** (2002) Lead distribution in corn seedlings (*Zea mays* L.) and its effect on growth and the concentrations of potassium and calcium. *Plant Growth Regulation* **37**: 69-76
- Meister A** (1995) Glutathione metabolism. *Methods Enzymol.* **251**: 3-13
- Metwally A, Finkemeier I, Georgi M, Dietz K** (2003) Salicylic Acid Alleviates the Cadmium Toxicity in Barley Seedlings. *Plant Physiology* **132**: 272-281
- Meyers DER, Auchterlonie GJ, Webb RI, Wood B** (2008) Uptake and localisation of lead in the root system of *Brassica juncea*. *Environmental Pollution* **153**: 323-332
- Mishra RK, Singhal GS** (1992) Function of photosynthetic apparatus of intact wheat leaves under high light and heat stress and its relationship with peroxidation of thylakoid lipids. *Plant Physiology* **98**: 1-6

- Mishra S, Srivastava S, Tripathi RD, Kumar R, Seth CS, Gupta DK** (2006) Lead detoxification by coontail (*Ceratophyllum demersum* L.) involves induction of phytochelatins and antioxidant system in response to its accumulation. *Chemosphere* **65**: 1027-1039
- Navari-Izzo F, Cestone B, Cavallini A, Natali L, Giordani T, Quartacci MF** (2006) Copper excess triggers phospholipase D activity in wheat roots. *Phytochemistry* **67**: 1232-1242
- Nieuwenhuizen NJ, Beuning LL, Sutherland PW, Sharma NN, Cooney JM, Bielecki LRF, Schröder R, MacRae EA, Atkinson RG** (2007) Identification and characterisation of acidic and novel basic forms of actinidin, the highly abundant cysteine protease from kiwifruit. *Functional Plant Biology* **34**: 946-961
- Noctor G, Foyer CH** (1998) Ascorbate and glutathione: Keeping Active Oxygen Under Control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **49**: 249 LP - 279
- Obroucheva NV, Bystrova EI, Ivanov VB, Antipova OV, Seregin IV** (1998) Root growth responses to lead in young maize seedlings. *Plant and Soil* **200**: 55-61
- Pappan K, Wang X** (1999) Molecular and biochemical properties and physiological roles of plant phospholipase D. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* **1439**: 151-166
- Paradiso A, Berardino R, de Pinto MC, Sanita di Toppi L, Storelli MM, Tommasi F, De Gara L** (2008) Increase in ascorbate-glutathione metabolism as local and precocious systemic responses induced by cadmium in durum wheat plants. *Plant and Cell Physiology* **49**: 362-374
- Piechalak A, Tomaszewska B, Baralkiewicz D** (2003) Enhancing phytoremediative ability of *Pisum sativum* by EDTA application. *Phytochemistry* **64**: 1239-1251
- Piechalak A, Tomaszewska B, Baralkiewicz D, Malecka A** (2002) Accumulation and detoxification of lead ions in legumes. *Phytochemistry* **60**: 153-162
- Rashid A, Popovic R** (1990) Protective role of CaCl_2 against Pb^{2+} inhibition in photosystem II. *FEBS Letters* **271**: 181-184
- Rau S, Miersch J, Neumann D, Weber E, Krauss G-J** (2007) Biochemical responses of the aquatic moss *Fontinalis antipyretica* to Cd, Cu, Pb and Zn determined by chlorophyll fluorescence and protein levels. *Environmental and Experimental Botany* **59**: 299-306
- Reddy A, Kumar S, Jyothsnakumari G, Thimmanaik S, Sudhakar C** (2005) Lead induced changes in antioxidant metabolism of horsegram (*Macrotyloma uniflorum* (Lam.) Verdc.) and bengalgram (*Cicer arietinum* L.). *Chemosphere* **60**: 97-104
- Romero-Puertas MC, Palma JM, Gomez M, Del Rio LA, Sandalio LM** (2002) Cadmium causes the oxidative modification of proteins in pea plants. *Plant, Cell & Environment* **25**: 677-686
- Seregin IV, Ivaniov VB** (1997) Histochemical investigation of cadmium and lead distribution in plants. *Fiziol. Rast.* **44**: 915-921
- Sharma P, Dubey RS** (2005) Lead toxicity in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology* **17**: 35-52

- Shigeoka S, Ishikawa T, Tamoi M, Miyagawa Y, Takeda T, Yabuta Y, Yoshimura K** (2002) Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *Journal of Experimental Botany* **53**: 1305-1319
- Singh RP, Tripathi RD, Sinha SK, Maheshwari R, Srivastava HS** (1997) Response of higher plants to lead contaminated environment. *Chemosphere* **34**: 2467-2493
- Spencer PS** (1989) The Grass Pea: Threat and Promise. *In* Third World Medical Research Foundation, New York, p 244
- Vaz Patto MC, Skiba B, Pang ECK, Ochatt SJ, Lambein F, Rubiales D** (2006) Lathyrus improvement for resistance against biotic and abiotic stresses: From classical breeding to marker assisted selection. *Euphytica* **147**: 133-147
- Verma S, Dubey RS** (2003) Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. *Plant Science* **164**: 645-655
- Wang CR, Wang XR, Tian Y, Yu HX, Gu XY, Du WC, Zhou H** (2008) Oxidative stress, defense response, and early biomarkers for lead-contaminated soil in *Vicia faba* seedlings. *Environmental Toxicology and Chemistry* **27**: 970-977
- Wang W, Vinocur B, Shoseyov O, Altman A** (2004) Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends in Plant Science* **9**: 244-252
- Wang X** (2002) Phospholipase D in hormonal and stress signaling. *Current Opinion in Plant Biology* **5**: 408-414
- Wierzbicka M** (1989) Disturbances in cytokinesis caused by inorganic lead. *Environmental and Experimental Botany* **29**: 123-133
- Wilkins DA** (1957) A Technique for the Measurement of Lead Tolerance in Plants. *Nature* **180**: 37-38
- Wozny A, Jerczynska E** (1991) The effect of Lead on early stages of *Phaseolus vulgaris* L. growth in vitro conditions. *Biologia Plantarum* **33**: 32-39
- Xiong Z** (1997) Bioaccumulation and physiological effects of excess lead in a roadside pioneer species *Sonchus oleraceus* L. *Environmental Pollution* **97**: 275-279
- Zeng Q, Lu H, Wang X** (2005) Molecular characterization of a glutathione transferase from *Pinus tabulaeformis* (Pinaceae). *Biochimie* **87**: 445-455

CHAPITRE IV :
ARTICLE N°3 :
ETUDE DE L'EFFET
DE L'EDTA (CHÉLATEUR) SUR
L'ACCUMULATION DE PLOMB LORS D'UNE
EXPOSITION LONGUE (14 JOURS)
CHEZ LE *Lathyrus* LIGNÉE 'BANGLADESH'

Ce travail fait l'objet d'un article en cours de rédaction qui sera soumis pour publication au journal *Chemosphere*, sous le titre « Impact d'un chélateur artificiel sur l'accumulation de plomb dans les plantes de gesse commune (*Lathyrus sativus*, lignée locale 'Bangladesh') ». Le texte en italique correspond à des remarques qui ne figureront pas dans l'article qui sera soumis pour publication.

L'étude de l'accumulation de plomb dans les plantes de gesse commune à la fin d'un traitement de courte durée (5 jours) a montré que le polluant était présent uniquement dans les racines (Brunet *et al.*, soumis). Deux hypothèses peuvent expliquer ce résultat : 1) la durée de l'expérimentation étant courte, les mécanismes de « translocation » du plomb n'ont pu se mettre en place ; 2) le plomb dans les racines peut être fortement lié à certaines structures cellulaires. Afin de tester ces hypothèses, une nouvelle expérimentation a consisté à 1) augmenter la durée de la culture hydroponique de 4 à 14 jours et 2) utiliser un chélateur l'EDTA pour faciliter la translocation du Pb. En effet l'EDTA se complexe avec les ions Pb^{2+} de manière équimolaire, ce qui accroît sa mobilité.

Le matériel végétal considéré dans cette étude est la lignée locale 'Bangladesh'. Elle a été choisie en raison de son meilleur taux de germination, aucune autre différence significative entre elle et l'autre lignée locale 'Raipur' n'ayant été mise en évidence dans les études précédentes.

1. Expérimentation

Des plantules *Lathyrus sativus* de la lignée locale 'Bangladesh' âgées de six jours ont été conditionnées au milieu Hoagland 1/10 sur de la vermiculite, pendant huit jours. Les plantes sont alors placées en culture hydroponique. Cinq milieux de culture ont été testés, tous à base de solution Hoagland 1/10 sans phosphate : 1) témoin, 2) 0.5 mM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, 3) 0.5 mM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ et 0.5 mM EDTA, 4) 0.2 mM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, 5) 0.2 mM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ et 0.2 mM EDTA. La quantité d'EDTA ajoutée a été ajustée afin que tout le Pb présent dans le milieu soit lié à la totalité de l'EDTA. Les plantes ont été récoltées après huit et 14 jours de culture hydroponique. Une partie des racines est rincée pendant une heure dans une solution d'H-EDTA à 1 mM.

Cette expérimentation a permis d'étudier les variations de divers paramètres :

- développement des plantes : longueur des tiges et des racines principales ; indice de tolérance (TI, tolerance index),
- contenu relatif en eau des tissus foliaires (RWC, relatif water content),
- teneurs en Pb dans les racines et les feuilles après minéralisation par spectroscopie (ICP-OES),
- expression par PCR quantitative de gènes impliqués dans la réponse des plantes à la contrainte induite par la présence de Pb : cystéine protéase (CP), homoglutathion synthétase (hGSHS), glutathion réductase (GR) et son système de transport (transporteur CNGC),.

L'isolement d'autres gènes codant des protéines de transport de métaux lourds tels qu'un canal de type ZIP, un symport de type NRAMP et un antiport de type CDF a été tenté par RT-PCR. Les amorces dégénérées ou hétérologues utilisées n'ont pas abouti à des amplifications spécifiques, de nouvelles amorces vont être testées.

2. Principaux résultats

2.1. Isolement d'un ADNc partiel d'un transporteur de type CNGC de *Lathyrus sativus*

Une séquence partielle d'ADNc correspondant à un transporteur de type CNGC a été amplifiée par RT-PCR à partir d'ARN de feuilles de *Lathyrus sativus* avec des amorces dégénérées (sens : 5'TYTTYTAYTGYYTTYTGGTGG^{3'}; anti-sens : 5'TCRTCCATYTTYTCRAACAT^{3'}) correspondant à des régions conservées de séquences de CNGC chez plusieurs espèces végétales. L'analyse de la séquence en acides aminés déduite et sa comparaison avec les bases de données protéiques ont permis de l'identifier : elle correspond à une séquence de CNGC (Fig. 17) présentant 88 % d'identité avec le CNGC d'*Arabidopsis thaliana* (NP200125). Les amorces spécifiques sens LsCNGCF1 (5'AAAGGAGGGATGCAGAACAAT^{3'}) et anti-sens LsSNGCR1 (5'GCACCCTCATCAGCAAATCTA^{3'}) ont été choisies pour les analyses par RT-PCR en temps réel.

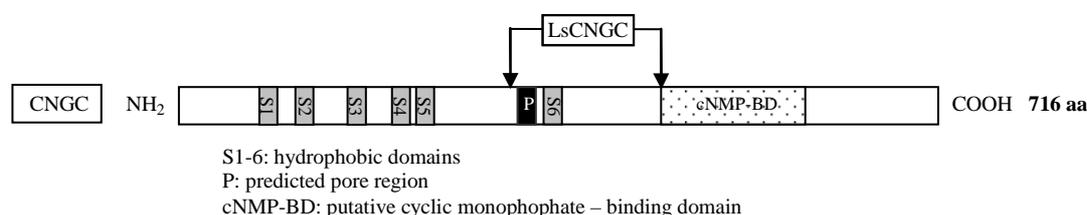


Figure 17: Représentation schématique de la protéine produite par le gène *CNGC*. La région indiquée entre les deux flèches correspond à la séquence protéique déduite de la séquence d'ADNc isolée chez le *Lathyrus sativus*.

2.2. Contenu en Pb dans les plantes de *Lathyrus sativus*

Les plantes cultivées en présence de 0.5 mM de Pb(NO₃)₂ présentent une teneur en Pb dans les racines similaire à celle observée précédemment (en moyenne 138.50 mg Pb/g de masse sèche après 14 jours de culture ; Fig. 18). Dans les plantes traitées au Pb(NO₃)₂ à 0.2 mM, les valeurs obtenues sont légèrement inférieures. Après rinçage de ces racines avec de l'H-EDTA, les quantités de Pb rémanentes (non échangeables) sont de 32.55 et 17.20 mg Pb/g de masse sèche après huit jours de traitement au nitrate de Pb à 0.2 mM et 0.5 mM respectivement. Elles sont de 75.07 et 47.52 mg Pb/g de masse sèche après 14 jours de

traitement au nitrate de Pb à 0.2 mM et 0.5 mM (Fig. 18). Le contenu en Pb dans les tiges et les feuilles de ces plantes est inférieur à 5 mg/g de masse sèche.

L'ajout d'EDTA dans le milieu de culture, diminue fortement la quantité de Pb fixée de manière échangeable. Le Pb absorbé par les plantes, cultivées en présence de 0.2 mM de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ et 0.2 mM d'EDTA, est à huit jours, 2.5 fois moins importante que celui des plantes cultivées avec le Pb seul et à 14 jours 5 fois moins importante (Fig. 18). Pour les plantes cultivées avec 0.5 mM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ et 0.5 mM EDTA, les quantités de Pb absorbées par les plantes sont équivalentes avec ou sans ajout d'EDTA. Fait remarquable, en présence d'EDTA la concentration en Pb dans les racines diminue et celle dans les feuilles augmente atteignant 68.52 mg Pb/g de masse sèche dans les feuilles des plantes cultivées pendant 14 jours (Fig. 18). L'augmentation de la mobilité du Pb par complexation avec l'EDTA change donc sa répartition dans la plante au profit du système foliaire.

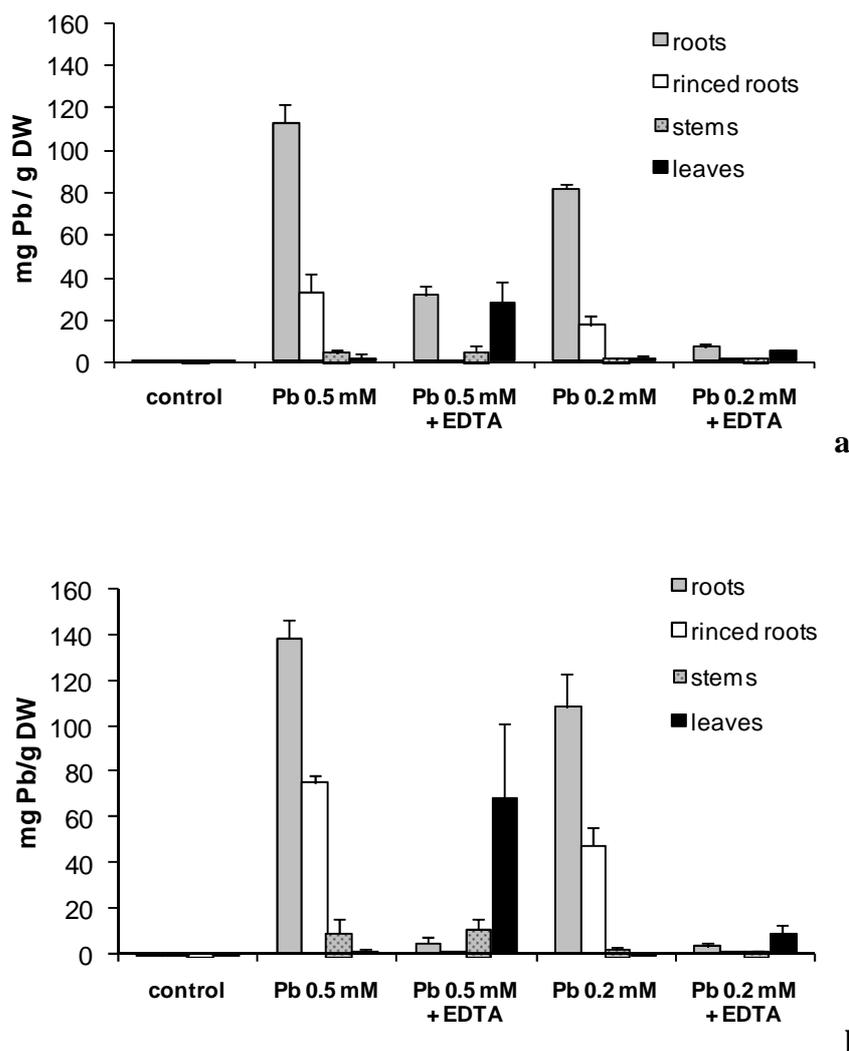


Figure 18 : Contenu en Pb (mg Pb/g de masse sèche) dans les plantes de *Lathyrus sativus*, cultivées pendant 8 (a) et 14 (b) jours dans du milieu Hoagland (1/10) sans phosphate additionné de 0.5 mM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, 0.5 mM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2 + 0.5$ mM EDTA, 0.2 mM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, 0.2 mM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2 + 0.2$ mM EDTA ou non (control). roots : racines ; rinsed roots : racines rincées à l'H-EDTA ; stems : tiges ; leaves : feuilles (n=3).

2.3. Développement des plantes et contenu relatif en eau des feuilles de *Lathyrus sativus*

Par comparaison avec les plantes témoins, l'ajout de Pb accompagné ou non d'EDTA dans le milieu de culture induit une inhibition de la croissance des racines et des tiges (Tableau 14). Ceci se traduit par de faibles indices de tolérance (Tableau 15). Après 14 jours l'indice le plus faible est corrélé à la chute la plus forcée l'indice (- 8.4 %) et ceci pour le traitement 0.5 mM et EDTA.

Comme dans le cas de l'étude précédente, le traitement par le Pb induit une réduction de la surface foliaire des plantes. Cependant un fait nouveau intervient : le développement de chloroses dans les feuilles des plantes cultivées en présence de Pb et d'EDTA (données non fournies).

Les valeurs du RWC des plantes cultivées en présence de 0.5 mM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ sont plus élevées que celles des témoins, quel que soit la durée du traitement (Tableau 16). Les valeurs sont plus faibles chez les plantes traitées avec 0.2 mM de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ qu'avec 0.5 mM de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (Tableau 16). Au niveau hydrique, à huit jours, une forte concentration en Pb/EDTA (0.5 mM) a le même effet qu'une faible teneur (0.2 mM).

treatment	root length (cm)		
	0 d	8 d	14 d
control	8.6 ± 1.9	29.2 ± 4.5	33 ± 4.4
Pb 0.5 mM	8.6 ± 1.6	8.8 ± 1.7	8.7 ± 2.1
Pb 0.5 mM + EDTA	10.5 ± 1.6	10 ± 1.1	8.5 ± 3.0
Pb 0.2 mM	13.1 ± 1.2	10.9 ± 1.1	10.9 ± 0.8
Pb 0.2 mM + EDTA	9.0 ± 3.3	8.2 ± 3.5	8.8 ± 3.0

treatment	stem length (cm)		
	0 d	8 d	14 d
control	14.1 ± 1.2	32.1 ± 2.3	41.5 ± 3.8
Pb 0.5 mM	13.0 ± 1.5	15.2 ± 1.7	15.4 ± 1.9
Pb 0.5 mM + EDTA	12.1 ± 1.4	14.7 ± 1.3	14.9 ± 1.3
Pb 0.2 mM	13.1 ± 1.2	15.1 ± 1.3	15.2 ± 1.4
Pb 0.2 mM + EDTA	12.3 ± 1.6	15.8 ± 1.5	16.4 ± 1.8

Tableau 14 : Longueur maximale des racines (root) et tiges (stem) de *Lathyrus sativus* cultivées dans du milieu Hoagland (1/10) sans phosphate additionné de 0.5 mM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, 0.5 mM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ + 0.5 mM EDTA, 0.2 mM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, 0.2 mM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ + 0.2 mM EDTA ou non (control) (n=4).

Tableau 15 : Indices de tolérance (%) des plantes de *Lathyrus sativus* cultivées 8 et 14 jours dans du milieu Hoagland (1/10) sans phosphate additionné de 0.5 mM Pb(NO₃)₂, 0.5 mM Pb(NO₃)₂ + 0.5 mM EDTA, 0.2 mM Pb(NO₃)₂, 0.2 mM Pb(NO₃)₂ + 0.2 mM EDTA.

treatment	TI (%)	
	8 d	14 d
Pb 0.5 mM	30.1	26.4
Pb 0.5 mM + EDTA	34.2	25.8
Pb 0.2 mM	37.3	33.0
Pb 0.2 mM + EDTA	28.1	26.7

Tableau 16: Contenu relatif en eau dans les feuilles de *Lathyrus sativus* cultivées 8 et 14 jours dans du milieu Hoagland (1/10) sans phosphate additionné de 0.5 mM Pb(NO₃)₂, 0.5 mM Pb(NO₃)₂ + 0.5 mM EDTA, 0.2 mM Pb(NO₃)₂, 0.2 mM Pb(NO₃)₂ + 0.2 mM EDTA ou seul (control). ND : non déterminé (feuilles sénéscentes).

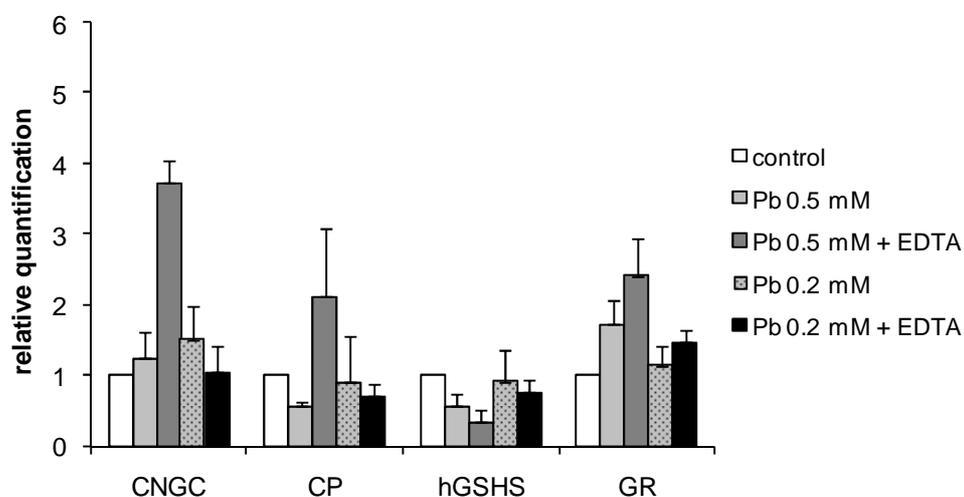
treatment	RWC (%)	
	8 d	14 d
Control	93.4 ± 4.73	91.10 ± 3.51
Pb 0.5 mM	94.4 ± 2.85	94.71 ± 1.91
Pb 0.5 mM + EDTA	83.86 ± 7.58	ND
Pb 0.2 mM	82.76 ± 7.58	89.89 ± 5.82
Pb 0.2 mM + EDTA	95.10 ± 1.06	ND

2.4. Analyse de l'expression des gènes ciblés

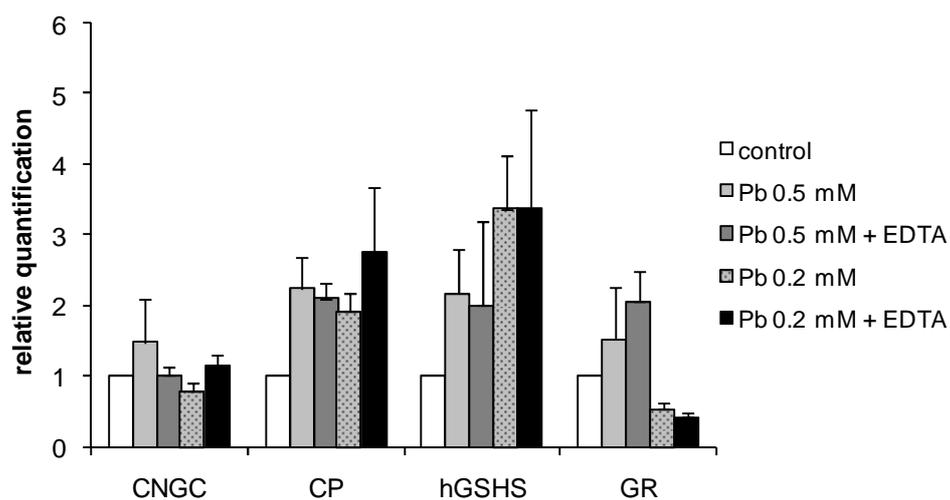
Dans les racines, l'accumulation de transcrits *LshGSHS* est inversement liée à la quantité de Pb dans le milieu de culture, avec un effet légèrement négatif de l'EDTA (Fig. 19). L'expression de la *LsCP* varie peu en réponse au Pb par rapport aux témoins. L'accumulation de transcrits de *LsGR* est positivement reliée à la quantité de Pb dans le milieu, avec un effet légèrement stimulant de l'EDTA. Le gène codant le transporteur CNGC (*LsCNGC*) présente peu de variation dans son expression sauf en présence de 0.5 mM de Pb(NO₃)₂ et d'EDTA, ce qui représente un effet très positif sur l'accumulation du Pb (Fig. 19).

Au niveau des feuilles, peu de variations sont observés dans l'expression de *LsCNGC* (Fig. 19). La stimulation (multiplié par deux) de l'accumulation de transcrits de *LsCP* est généralisée quel que soit le traitement (Fig. 19). Une forte stimulation de l'accumulation de transcrits de *LshGSHS* est observée avec d'une manière générale le maintien de la tendance remarquée dans les racines, c'est-à-dire la limitation de l'augmentation de l'accumulation de

ce transcrit pour la concentration la plus élevée de Pb. La relation entre les niveaux d'expression de la *LsGR* et d'exposition au Pb est identique à celle observée dans les racines.



a



b

Figure 19 : Quantification des transcrits d'ARNm de *LsCNGC*, *LsCP*, *LshGSHS* et *LsGR* par PCR en temps réel (qPCR) dans les racines (a) et feuilles (b) de plantes de *Lathyrus sativus*, cultivées, huit jours, dans du milieu Hoagland (1/10) sans phosphate additionné de 0.5 mM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, 0.5 mM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2 + 0.5$ mM EDTA, 0.2 mM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, 0.2 mM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2 + 0.2$ mM EDTA ou non (control). *LspUBQ* a été utilisé comme gène de référence (n=3).

3. Discussion

Comme l'avait montré les cultures précédentes, les plantes cultivées en présence de Pb (0.2 mM et 0.5 mM Pb(NO₃)₂) cessent de grandir.

Comme observé précédemment à la fin du traitement des plantes au nitrate de Pb, la majorité du Pb accumulé se situe dans les racines. La quantité totale de Pb fixée (représentant le Pb échangeable et non échangeable) est déjà très importante après 96 h de culture (Brunet *et al.*, soumis) et augmente peu lors d'une culture plus longue, ce qui signifie que les sites de liaisons du Pb à l'extérieur des racines sont rapidement saturés. Le Pb peut se lier sur des sites échangeables des parois cellulaires ou y précipiter sous forme de carbonate de Pb (Jarvis et Leung, 2002). Les quantités de Pb non échangeables sont quant à elles différentes suivant la durée du traitement. La quantité de Pb non échangeable est mesurée sur les racines ayant subi un rinçage avec une solution d'H-EDTA (1 mM). Chez les plantes cultivées en présence de 0.5 mM de Pb(NO₃)₂ pendant huit jours, 29 % du Pb total dans les racines n'est pas affecté par le chélateur. Précédemment, un rinçage réalisé avec une solution d'EDTA (1 mM) après 96 h de traitement au nitrate de Pb (0.5 mM) conservait 77 % du Pb total des racines. L'H-EDTA apparaît donc comme un meilleur déssorbeur du Pb échangeable.

Après 14 jours de culture, les racines rincées à l'H-EDTA (1 mM) présentent 54 % de Pb non échangeable. Ceci indique que leur capacité d'absorption et d'accumulation du Pb n'avait pas atteint son maximum après huit jours de culture. Il est donc possible que les quantités de Pb absorbées par les racines de *Lathyrus sativus* après 14 jours de culture ne correspondent pas à leur capacité maximale d'accumulation.

Après 14 jours de culture, très peu de plomb est transporté vers les parties aériennes. Il est à noter que contrairement à ce qui avait été observé après cinq jours de traitement, les quantités de Pb détectées dans les feuilles ne sont plus négligeables. L'immobilisation du Pb dans les racines est couramment observé chez les Fabacées (légumineuses) (Piechalak *et al.*, 2002), c'est pourquoi l'ajout d'un chélateur tel que l'EDTA est fréquemment employé (Huang *et al.*, 1997; Epstein *et al.*, 1999; Luo *et al.*, 2005). Les ions Pb liés à l'EDTA traversent plus facilement la membrane plasmique, facilitant ainsi son absorption (Vassil *et al.*, 1998; Sarret *et al.*, 2001; Huang *et al.*, 2008). Dans le cas du *Lathyrus sativus*, la quantité de Pb absorbée (non échangeable) par les plantes n'augmente pas lorsque les ions Pb sont complexés avec

l'EDTA. Comme il était possible de s'y attendre, le stockage dans les racines diminue au profit de l'accumulation vers les parties aériennes. La quantité de Pb dans les feuilles des plantes traitées au $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (0.5 mM) et EDTA est multipliée par 65. L'EDTA a préalablement été montré comme facilitant le transport du Pb via le xylème (Huang *et al.*, 1997). Pour cela le complexe Pb-EDTA doit intégrer la voie symplastique.

Le CNGC est le premier canal membranaire dont l'implication dans le transport du Pb à travers la membrane plasmique a été démontré (Arazi *et al.*, 1999). L'accumulation de son transcrit est fortement stimulée dans les racines des plantes cultivées en présence de 0.5 mM de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ et EDTA, racines dans lesquelles le Pb ne s'accumule pas. Ceci pourrait indiquer que les canaux CNGC ont facilité l'entrée du Pb complexé dans les cellules et permis son transport par la voie symplastique. Un deuxième système de transporteur sera nécessaire afin que le plomb sorte de cette voie de transport et passe dans le xylème.

D'autre part la formation de complexe Pb-EDTA permet chez certaines espèces végétales de diminuer les effets délétères que le Pb a sur les plantes (Vassil *et al.*, 1998; Piechalak *et al.*, 2003). Dans le cas du *Lathyrus* la quantité de Pb liée à l'extérieur et à l'intérieur des racines est diminuée, indiquant que la chélation entre l'EDTA et le Pb inhibe bien les capacités de liaison de ce dernier aux structures cellulaires. Par contre il n'évite pas l'inhibition du développement des plantes. Mais nous ne savons pas ce qu'il advient des complexes Pb-EDTA dans les cellules, mais le Pb localisé dans les feuilles induit une chlorose de ces dernières indiquant qu'il demeure toxique.

L'accumulation de transcrits de *LsCP* au niveau des racines ne varie pas significativement en fonction des traitements, ceci pourrait indiquer que le transport du Pb-EDTA par la voie symplastique n'induit pas une augmentation de la quantité de protéines à dégrader. Dans les feuilles, le gène *LsCP* est surexprimé chez toutes les plantes traitées, indépendamment de la localisation du Pb ou de la concentration en Pb du milieu. La présence de Pb dans le milieu de culture semble systématiquement induire la surexpression de *LsCP*. De plus cette réponse s'inscrit dans la durée puisqu'elle subsiste après huit jours de traitement.

Dans les racines, l'expression de la *LshGSHS* reste équivalente à celle des témoins alors que dans les feuilles elle augmente en fonction de la quantité de Pb présent dans le milieu de culture et indépendamment de la présence de l'EDTA. Cette augmentation d'accumulation de transcrit peut signifier une induction de la synthèse de hGSH dans les feuilles permettant ainsi l'augmentation de molécules de hGSH disponibles pour se lier au Pb (Reddy *et al.*, 2005) ou

directement au radicaux oxygénés (Barclay, 1988) et/ou une activation du fonctionnement d'un cycle tel que le cycle ascorbate-glutathion mais fonctionnant avec l'homoglutathion (Iturbe-Ormaetxe et al 2001). De plus, nous avons montré précédemment (Brunet *et al.*, soumis) qu'après cinq jours de culture en présence de nitrate de Pb (0.5 mM), l'hGSH ne paraissait pas impliqué dans les réponses du *Lathyrus*. Lors d'un traitement plus long une néo synthèse d'hGSH semble s'effectuer ceci pourrait correspondre à l'épuisement du stock d'hGSH dans ces plantes. Enfin l'induction dans les racines et dans les feuilles de l'expression de la *LsGR* en présence d'une forte quantité de Pb indique une mobilisation plus importante de GSH dans le cycle ascorbate glutathion et ainsi peut être une augmentation de la prise en charge des ROS (Reddy *et al.*, 2005; Mishra *et al.*, 2006).

Les différents traitements appliqués aux plantes de *Lathyrus sativus* dans cette étude ont permis de mettre en évidence la présence indispensable de l'EDTA dans le transport du Pb absorbé par les racines vers les parties aériennes. Les variations dans l'expression des gènes permettent de penser que les réponses du système antioxydatif via le cycle ascorbate-glutathion sont surtout affectées par la quantité de Pb dans le milieu plus que par la forme sous laquelle il s'y trouve (chélaté ou non) ou bien même par sa présence dans l'organe étudié. Ceci concorderait avec l'hypothèse que nous avons faite dans l'étude précédente sur l'induction d'un signal systémique en réponse à la présence de Pb dans le milieu de culture. De plus une augmentation de la synthèse d'hGSH indiquerait l'implication de cette molécule dans la prise en charge du Pb et/ou des ROS lors d'une culture de plus longue.

CHAPITRE V :
PROJET D'ARTICLE N°4 :
CARACTÉRISATION D'UN ADNC COMPLET
DE CYSTÉINE PROTÉASE ISOLÉ DE
FEUILLES DE *Lathyrus sativus* L.

1. Introduction

Il existe deux grandes catégories de protéases : les endoprotéases et les exoprotéases. Les exopeptidases hydrolysent les protéines par l'extrémité C-terminale : carboxypeptidases ou N-terminale : aminopeptidases. Les endoprotéases ou protéinases sont des enzymes intervenant dans la dégradation des protéines cellulaires en acides aminés. Elles interviennent aussi bien dans la régulation de processus au cours de l'ontogénèse (croissance et développement) qu'en réponse aux contraintes environnementales. Elles hydrolysent les liaisons peptidiques et sont classées en fonction de l'acide aminé situé dans leur site actif. Il existe ainsi quatre catégories majeures d'endoprotéases : les cystéines protéases, les serines protéases, les metalloprotéases et les aspartiques protéases.

Il existe 826 protéases chez *Arabidopsis thaliana*, regroupées en une soixantaine de familles, 678 protéases ont été trouvées chez *Oryza sativa* (van der Hoorn, 2008). Parmi ces protéases plus d'une centaine sont des cystéines protéases. Il existe une base de données : MEROPS (<http://merops.sanger.ac.uk/>) qui regroupe 66524 peptidases dont les protéases, leurs substrats et leurs inhibiteurs connus (Rawlings *et al.*, 2008). D'après la nomenclature de la base de données MEROPS ces protéinases sont représentées par la lettre C. Il existe un grand nombre de familles de protéinases C (indiquées par un numéro de 1 à 89) déterminées d'après leur structure et leur fonction. La famille des C1 est celle des papaines et de ses homologues (cathepsines, procaricaïne...). Les papaines sont des endopeptidases ayant comme substrat préférentiel les acides aminés aromatiques ou hydrophobes.

Dans le génome complètement séquencé d'*Arabidopsis thaliana*, 41 peptidases C1 ont été identifiées, 44 dans celui d'*Oryza sativa*, cinq chez *Phaseolus vulgaris*, six chez *Pisum sativum*, huit chez *Glycine max* mais aucune encore chez le *Lathyrus sativus* (MEROPS).

Cette famille C1 se divise en deux sous familles C1A et C1B. Les protéases à cystéine de la sous famille C1A présentent des ponts disulfures et s'accumulent dans les vésicules, vacuoles ou dans l'apoplaste. Au contraire, les protéases C1B n'ont pas de ponts disulfures et sont localisées dans le cytoplasme (Rawlings *et al.*, 2006). Seules les plantes contiennent des protéases C1A (van der Hoorn, 2008). Ces protéinases sont synthétisées sous la forme d'une préproprotéase non active, composée du domaine protéase C1 précédé d'un prodomaine auto-inhibiteur et d'un peptide signal (Taylor *et al.*, 1995). Le site actif de ces protéinases C1A contient une cystéine et une histidine. Deux autres acides aminés jouent un rôle important dans la catalyse : une glutamine, précédent la cystéine du site actif et qui induit la formation

d'un « oxyanion hole », et une asparagine qui oriente le noyau imidazole de l'histidine catalytique (Lewis *et al.*, 1981; Rawlings et Barrett, 1993).

Les cystéines protéases peuvent posséder un peptide signal. Cette séquence constituée de 15 à 30 acides aminés se retrouve à l'extrémité N-terminale des protéines destinées à traverser la membrane du réticulum endoplasmique. Il permet leur passage dans l'appareil de Golgi et leur exportation dans des vésicules (van Vliet *et al.*, 2003).

Les protéases de type papaine sont impliquées dans la perception des pathogènes, la résistance aux maladies, la défense contre les insectes et la sénescence (van der Hoorn, 2008). Une augmentation variable de l'accumulation du transcrit d'une cystéine protéase chez l'arachide a été observée en réponse à différents degrés de sécheresse (Drame *et al.*, 2007), de plus ce gène répond à la présence de Pb dans le milieu de culture des plantes de *Lathyrus sativus* (Brunet *et al.*, soumis).

Dans la mesure où les protéinases à cystéines interviennent majoritairement dans les processus de dégradation cellulaire en réponse aux contraintes biotiques et abiotiques, il nous a semblé important de tenter d'obtenir la séquence complète de l'ORF d'une cystéine protéase de *Lathyrus sativus* et d'en étudier la structure.

2. Isolement d'un l'ADNc complet codant une cystéine protéase putative chez *Lathyrus sativus*

2.1. Isolement d'une région de l'ADNc d'une cystéine protéase chez *Lathyrus sativus*

Un fragment de l'ADNc d'une cystéine protéase de *Lathyrus sativus* a été isolé à partir d'ARN totaux de feuilles de plantes de la lignée 'Bangladesh'. Cette séquence de 721 paires de bases (pb) a été isolée par RT-PCR à l'aide d'amorces dégénérées (sens : potCPF1 5' GTGTYAATCAKTTTGCTGAT^{3'} ; anti-sens : potCPR2

5' TTCCCCATYTCCATYTTGAA^{3'}). La séquence de ces amorces a été déterminée à partir de séquences consensus identifiées par alignement des séquences protéiques de cystéine protéases C1A de *Pisum sativum* (Z68291), de *Medicago sativa* (DQ492683) et de *Brassica oleracea* (AF454960) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Le fragment isolé des feuilles de *Lathyrus sativus* a été nommé *LsCP*.

La séquence du fragment d'ADNc *LsCP* est proche d'un fragment des séquences de cystéine protéase présentes chez d'autres plantes de la famille des *Fabaceae* (*Pisum sativum*, *Medicago sativa*, *Cicer arietinum* et *Glycine max*) mais diffère de celle d'une *Campanulaceae* (*Platycodon grandiflorus*) et d'une *Rutaceae* (*Citrus sinensis*) (Tableau 17).

Tableau 17 : Pourcentage d'identité entre la séquence nucléotidique partielle de 721 pb d'un ADNc de cystéine protéase putative de feuilles de *Lathyrus sativus* et les séquences correspondantes d'ARNm d'autres espèces végétales. Le nom de la séquence est celui correspondant à la référence GenBank.

Espèce végétale	Séquence	Identité (%)	Accession dans GenBank
<i>Pisum sativum</i>	ARNm d'une cystéine protéase	95	Z68291.1
<i>Medicago sativa</i>	ARNm d'une cystéine protéase (CP1)	92	DQ492683.1
<i>Cicer arietinum</i>	ARNm partiel d'une cystéine protéase (gene cacG2)	90	X93220.2
<i>Glycine max</i>	ARNm d'une putative cystéine protéase	82	EF440354.1
<i>Platycodon grandiflorus</i>	ARNm d'une cystéine protéase (PgCP2)	78	AB363729.1
<i>Citrus sinensis</i>	ARNm d'une cystéine protéase	77	EF690284.1

2.2. Isolement de la région 5' de l'ADNc *LsCP* de *Lathyrus sativus* codant pour une cystéine protéase putative

A partir de la séquence partielle *LsCP*, des amorces strictes ont été dessinées pour l'amplification par 5' RACE PCR (5'/3' RACE Kit, 2nd Generation (Roche, France)) de l'extrémité 5' de *LsCP*. La réaction a été réalisée à partir de l'extrait d'ARN totaux utilisé pour l'isolement de *LsCP* et avec les amorces spécifiques anti-sens suivantes :

LsCPraceR1 : 5' CTCGTCAGGAAGATTAGCAT^{3'}

LsCPraceR2 : 5' CCTTCAGAGTAGCAGAGCAA^{3'}

LsCPraceR3 : 5' GAGCAGCACCAAGTCTATGA^{3'}

L'amplification avec l'amorce LsCPraceR1 a permis d'obtenir un fragment de cystéine protéase putative d'environ 500 pb, celle avec LsCPraceR2 un fragment de 450 pb et finalement celle avec LsCPraceR3 un fragment de 432 pb. Ce fragment a été cloné et 3 clones ont été séquencés. Les séquences obtenues étaient identiques.

Cette séquence correspondant à la région 5' de l'ADNc *LsCP* a été analysée par le logiciel BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) et a été identifiée comme un ADNc partiel de cystéine protéase. Cette séquence est proche de celles de trois Fabacées (légumineuses) (*Pisum sativum*, *Medicago sativa* et *Cicer arietinum*) (Tableau 18).

Tableau 18 : Pourcentage d'identité entre la séquence nucléotidique partielle de la région 5' d'un ADNc de cystéine protéase putative de feuilles de *Lathyrus sativus* et les séquences correspondantes d'ARNm d'autres espèces végétales. Le nom de la séquence est celui correspondant à la référence GenBank.

Espèce végétale	Séquence	Identité (%)	Accession dans GenBank
<i>Pisum sativum</i>	ARNm d'une cystéine protéase	95	Z68291.1
<i>Medicago sativa</i>	ARNm d'une cystéine protéase (CP1)	84	DQ492683.1
<i>Cicer arietinum</i>	ARNm partiel d'une cystéine protéase (gene cacG2)	84	X93220.2
<i>Arabidopsis thaliana</i>	ARNm d'une peptidase de type cystéine	74	NM_125429.3
<i>Brassica oleracea</i>	ARNm d'une cystéine protéase associée à la sénescence (CP5)	73	AF454960.1
<i>Brassica napus</i>	ARNm de cystéine protéase	73	DQ209288

2.3. Isolement de la région 3' de l'ADNc *LsCP* de *Lathyrus sativus* codant pour une cystéine protéase putative

La région 3' de l'ADNc *LsCP* de cystéine protéase de *Lathyrus sativus* a été obtenue par 3' RACE PCR avec l'amorce sens spécifique *LsCPraceF1* (5' CTTGCTGTTGGATACGGAAT^{3'}). Son identification s'est faite après analyse de la séquence avec le logiciel BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Cette séquence est comme la précédente proche de celle des Fabacées (légumineuses) (Tableau 19).

Tableau 19 : Pourcentage d'identité entre la séquence nucléotidique partielle de la région 3' d'un ADNc de cystéine protéase putative de feuilles de *Lathyrus sativus* et les séquences correspondantes d'ARNm d'autres espèces végétales. Le nom de la séquence est celui correspondant à la référence GenBank.

Espèce végétale	Séquence	Identité (%)	Accession dans GenBank
<i>Pisum sativum</i>	ARNm d'une cystéine protéase	94	Z68291.1
<i>Medicago sativa</i>	ARNm d'une cystéine protéase (CP1)	84	DQ492683.1
<i>Cicer arietinum</i>	ARNm partiel d'une cystéine protéase (gene cacG2)	82	X93220.2
<i>Arabidopsis thaliana</i>	ARNm d'une putative cystéine protéase	81	NM_114400.3
<i>Brassica oleracea</i>	ARNm d'une cystéine protéase associée à la sénescence (CP5)	81	AF454960.1
<i>Arabidopsis thaliana</i>	ARNm d'une peptidase de type cystéine	81	NM_125429.3

2.4. Assemblage de trois fragments d'ADNc de cystéine protéase putative de feuilles de *Lathyrus sativus*

La réunion des trois fragments d'ADNc de cystéine protéase de *Lathyrus sativus* : *LsCP* (721 pb), la région 5' (432 pb) et la région 3' (363 pb)

(http://www.bioinfo.hku.hk/services/analyseseq/cgi-bin/cap_in.pl) a donné une séquence nucléotidique de 1346 pb (Fig. 20). Après retrait des nucléotides non spécifiques de cette séquence, c'est à dire rajoutés par les amorces des réactions 5' et 3' RACE PCR, la séquence obtenue est constituée de 1285 pb et est nommée *LsCPI* (Fig. 21).

région5' GACCACGCGTATCGATGTCGACTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGAGAGTAAAAGTTAGAACTTT
 région5' TAGTACCAGAGTTTTGGGAGAGTGAGATGGCACAGTGGTCGTTGCTTATCGTTTTTGTCT
 région5' GCGTCACCACCGCCGCTGCCGATTCCAGCTTCCATGACTCCAATCCTATTCGAATGGTCT
 région5' CCGACGCGGAGGAACAGTTACTTCAGGTGATCGGAGAAAGCCGTCACGCTGTCTCTTTCG
 région5' CCCGTTTCGCTAACAGATACGGTAAGCTATACGATAGCGTTGATGAGATGAAGCTTCGGT
 région5' TTAAGATCTTCTCGGAGAATCTTGAACCTATCAGGTCTACTAATAAGAGACGACTCAGTT
 région5' ACAAGCTTGGTGTTAATCATTTTTGCTGATTGGACTTGGGAGGAGTTTAAAAGTCATAGAC
 LsCP GTGTCAATCATTTTTGCTGATTGGACTTGGGAGGAGTTTAAAAGTCATAGAC
 région5' TTGGTGCTGCTC
 LsCP TTGGTGCTGCTCAAAATTGCTCTGCTACTCTGAAGGGTAACCATAAGATTACTGATGCTA
 LsCP ATCTTCCTGACGAGAAAGACTGGAGGAAAGAAGGTATAGTCAGTGAAGTTAAAGATCAAG
 LsCP GCCACTGCGGATCATGCTGGACATTCCAGCACAACTGGAGCGTTGGAATCAGCTTACGCAC
 LsCP AGGCATTCCGAAAGAATATCTCTCTTTCTGAGCAGCAGTTAGTGGACTGTGCTGGTGTCT
 LsCP TCAATAACTTTGGATGCAGCGGTGGGTTGCCGTCACAAGCCTTTGAATACATTAAATACA
 LsCP ATGGTGGCCTTGAGACAGAAGAAACATATCCCTACACTGGAAGTAATGGTCTCTGCAAAT
 LsCP TTACATCTGAAAATGTTGCTCTTAAAGTCCTTGGCTCTGTCAACATCACCTTGGGTTCTG
 LsCP AGGATGAATTGAAACATGCAGTTGCTTTTGGCTCGGCCCGTTAGTGTGGCATTGAGGTGG
 LsCP TGCATGACTTCAGATTATACAAGAGTGGAGTTTACACTAGTACAGCTTGTGGCAACACAC
 LsCP CCATGGATGTGAATCATGCTGTTCTTGGCTGTTGGATACGGAATTGAAGACGGCATAACCAT
 région3' CTTGCTGTTGGATACGGAATTGAAGACGGCATAACCAT
 LsCP ATTGGCACATTAATAAATTCGTGGGGAGGTGATTGGGGTGACCATGGCTACTTCAAAACGG
 région3' ATTGGCACATTAATAAATTCGTGGGGAGGTGATTGGGGTGACCATGGCTACTTCAAAATGG
 LsCP AGATGGGGAA
 région3' AAATGGGGAAGAATATGTGTGGTGTGCTACATGCTCCTCCTATCCTGTTGTGGCCTAAA
 région3' AGGCAAATAGGGTGATGATGCCAAAAGGATGCCTTGGTGACTTCCATCTTACACGTTAC
 région3' CTCTGTAGTTATTCATCTTAAACGTAAAATGCAGTGAGATAATGATAAGTCTTTGTTGAT
 région3' GTTAATCTGTAAAATAAGTTTGAATTGAGACTCAATTTCTTCTAAAAGAAAAAAAAAAAA
 région3' AAAAGTCGACATCGATACGCGTGGTC

Figure 20 : Assemblage des trois fragments isolés de la cystéine protéase de *Lathyrus sativus* (1346 pb) ; la région 5' est surlignée en bleu, la région LsCP en rose et la région 3' en jaune.

AGAGTAAAAGTTAGAAACTTTTAGTACCAGAGTTTTGGGAGAGTGAATGACACAGTGGT 60
 S K S . K L L V P E F W E S E M A Q W S
 CGTTGCTTATCGTTTTGTTCTGCGTCACCACCGCCGCTGCCGGATTGAGTTCATGACT 120
 L L I V L F C V T T A A A G F S F H D S
 CCAATCCTATTTCGAATGGTCTCCGACGCGGAGGAACAGTTACTTCAGGTGATCGGAGAAA 180
 N P I R M V S D A E E Q L L Q V I G E S
 GCGTACAGCTGTCTCTTTTCGCCCCGTTTCGCTAACAGATACGGTAAGCTATACGATAGCG 240
 R H A V S F A R F A N R Y G K L Y D S V
 TTGATGAGATGAAGCTTCGGTTTTAAGATCTTCTCGGAGAATCTTGAACCTATCAGGTCTA 300
 D E M K L R F K I F S E N L E L I R S T
 CTAATAAGAGACGACTCAGTTACAAGCTTGGTGTAAATCATTTTTGCTGATTGGACTTGGG 360
 N K R R L S Y K L G V N H F A D W T W E
 AGGAGTTTAAAAGTCATAGACTTGGTGTGCTCAAAATTGCTCTGCTACTCTGAAGGTA 420
 E F K S H R L G A A Q N C S A T L K G N
 ACCATAAGATTACTGATGCTAATCTTCTGACGAGAAAGACTGGAGGAAAGAAGGTATAG 480
 H K I T D A N L P D E K D W R K E G I V
 TCAGTGAAGTTAAAGATCAAGGCCACTGCGGATCATGCTGGACATTGAGCACAACCTGGAG 540
 S E V K D Q G H C G S C W T F S T T G A
 CGTTGGAATCAGCTTACGCACAGGCATTTCGAAAGAATATCTCTCTTTCTGAGCAGCAGT 600
 L E S A Y A Q A F G K N I S L S E Q Q L
 TAGTGGACTGTGCTGGTCTTTCAATAACTTTGGATGCAGCGGTGGGTTGCCGTCACAAG 660
 V D C A G A F N N F G C S G G L P S Q A
 CTTTGAATACATTAAATACAATGGTGGCCTTGAGACAGAAGAAACATATCCCTACACTG 720
 F E Y I K Y N G G L E T E E T Y P Y T G
 GAAGTAATGGTCTCTGCAAATTTACATCTGAAAATGTTGCTCTTAAAGTCCTTGGCTCTG 780
 S N G L C K F T S E N V A L K V L G S V
 TCAACATCACCTTGGGTTCTGAGGATGAATTGAAACATGCAGTTGCTTTTGCTCGGCCCG 840
 N I T L G S E D E L K H A V A F A R P V
 TTAGTGTGGCATTGAGGTGGTGCATGACTTACAGATTATAACAAGAGTGGAGTTTACACTA 900
 S V A F E V V H D F R L Y K S G V Y T S
 GTACAGCTTGTGGCAACACACCCATGGATGTGAATCATGCTGTTCTTGTGTTGGATACG 960
 T A C G N T P M D V N H A V L A V G Y G
 GAATTGAAGACGGCATAACCATATTGGCACATTAATAATTCGTGGGGAGGTGATTGGGGTG 1020
 I E D G I P Y W H I K N S W G G D W G D
 ACCATGGCTACTTCAAATGGAAATGGGAAGAATATGTGTGGTGTGCTACATGCTCCT 1080
 H G Y F K M E M G K N M C G V A T C S S
 CCTATCCTGTTGTGGCCTAAAAGGCAAATAGGGTGTGATGCCAAAAGGATGCCTTGGT 1140
 Y P V V A K A N R V M M P K R M P W .
 GACTTCCATCTTACACGTTACCTCTGTAGTTATTCATCTTAAACGTAAAATGCAGTGAGA 1200
 L P S Y T L P L . L F I L N V K C S E I
 TAATGATAAGTCTTTGTTGATGTTAATCTGTAATAAAGTTTGGAAATTGAGACTCAATTT 1260
 M I S L C . C . S V K . V W N . D S I S
 CTTCTAAAAGAAAAAAAAAAAAAA 1285
 S K R K K K K

Figure 21 : Séquence nucléotidique et séquence d'acides aminés déduite de l'ADNc complet de *Lathyrus sativus* *LsCPI* codant une cystéine protéase putative. La séquence codante est en gras, la méthionine de départ est surlignée en rouge, bases conservées du contexte du codon de départ en gras et surligné, le codon stop en vert, la queue polyA en bleu foncé, les trois motifs des sites actifs en rose, jaune et orange, la séquence NTIR du propeptide N-terminal en gris et les différents sites de phosphorylation (S, Y, T) en marron. Les quatre résidus catalytiques sont soulignés, le site de clivage du peptide signal est indiqué par une flèche et les motifs des sites de glycosylation sont en italique et en rouge.

L'analyse de la séquence nucléotidique de *LsCPI* sur BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) indique une séquence de cystéine protéase correspondant à un ADNc complet. *LsCPI* présente plus de 80 % d'identité avec quatre séquences d'ARNm de cystéine protéase de Fabacée (Tableau 20).

Les extrémités 5' et 3' ont permis de dessiner des amorces justes et d'amplifier par PCR l'ADNc complet (One step RT-PCR Kit (Qiagen, France)).

Tableau 20 : Pourcentage d'identité entre la séquence nucléotidique *LsCPI* de cystéine protéase de *Lathyrus sativus* et les séquences d'ARNm d'autres espèces végétales. Le nom de la séquence est celui correspondant à la référence GenBank.

Espèce végétale	Séquence	Identité (%)	Accession dans GenBank
<i>Pisum sativum</i>	ARNm d'une cystéine protéase	95	Z68291.1
<i>Medicago sativa</i>	ARNm d'une cystéine protéase (CP1)	88	DQ492683.1
<i>Cicer arietinum</i>	ARNm partiel d'une cystéine protéase (gene cacG2)	87	X93220.2
<i>Glycine max</i>	ARNm complet d'une putative cystéine protéase	82	EF440354.1
<i>Citrus sinensis</i>	ARNm d'une cystéine protéase	76	EF690284.1
<i>Arabidopsis thaliana</i>	ARNm d'une putative cystéine protéase AALP (At5g60360)	75	BT000676.1

2.5. Analyse structurale de l'ADNc complet *LsCPI*

L'analyse de la séquence *LsCPI* (http://bioinfo.hku.hk/services/analyseseq/cgi-bin/traduc_in.pl) a permis de localiser la phase de lecture (Fig. 21).

La séquence complète de 427 acides aminés contient un ORF de 351 acides aminés entre la méthionine de départ à +48 et le codon stop à +1098.

Les séquences de l'ADNc *LsCPI* et de la protéine déduite a été analysée (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/fasta33/index.html>) pour en déduire les pourcentages d'identité (séquence nucléotidique) et de similarité (fonction des acides aminés) avec les séquences les plus proches (Tableau 21, Fig. 22).

Tableau 21 : Pourcentage d'identité et de similarité entre la séquence protéique LsCPI de cystéine protéase de *Lathyrus sativus* et les séquences les plus proche d'autres espèces végétales.

Espèce végétale	Séquence	Identité (%)	Similarité (%)	Référence UniProt
<i>Pisum sativum</i>	Cystéine protéase	95.4	98.6	Q41057
<i>Medicago sativa</i>	Cystéine protéase	90.6	97.4	Q1KK73
<i>Actinidia deliciosa</i>	Cystéine protéase Cp1	77.1	90.4	A5HIJ1
<i>Citrus sinensis</i>	Cystéine protéase Cp	74.4	90.6	A7LAB9
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Thiol protéase aleurain	73.7	93.7	Q8H166
<i>Brassica oleracea</i>	Cystéine protéase associée à la sénescence	73.4	92.6	Q8W178

```

LsCP1      -----MAQWSSLIVLFCVTTAAAGFSFHDSNPIRMVS-----DAEEQLLQVIGESRHAVSFARFANRYGKLYDSVDEMCLRFKIFSENLELIRSTNKRRLSYKLGVNHFADWTWEEFKS
P.sativum  -----MAQWSSLIVLFCVASAAAGFSFHDSNPIRMVS-----DVEEQLLQVIGESRHAVSFARFANRYGKRYDSVDEMCLRFKIFSENLELIRSSNKRRLSYKLGVNHFADWTWEEFRS
M.sativa   -----MAQWTLIVVFCVATAAAGLSFHDSNPIRMVS-----DMEKQLLQVIGESRHAVSFARFANRYGKRYDTVDEMKRFRKIFSENLQLIESTNKKRLGYTLGVNHFADWTWEEFRS
A.deliciosa ---MARTSFSLIILIIACVAGASSASTFDENPIRTVVSDALREFETSILSVLGDSTRHALSFARFAHRYGKRYETAETKLRFAIFSENLKLIRSHNKKGLSYTLGVNHFADWTWEEFRR
C.sinensis MARPVQLVSSVILLLLCCAAAASASASFDDSNPIRLVSSDGLRDFFTSVLQVIGQARHALSFARFARRYGKIYESVVEEMKLRFAFATFSKNLIDLIRSTNCKGLSYRGLGNKFADWSWEEFQR
A.thaliana --MSAKTILSSVVLVVAASAAANIGFDESNPIRMVS-DGLREVEESVSQILGQSRHVLSFARFTHRYGKKYQNVEEMKLRFSIFKENLDLIRSTNKKGLSYKLGVNQFADLTWQEFQR
B.oleracea -MMSVRTILPSAVLLILIAASTAESIGFDESNPIRMVS-DRLREVEESVVQILGQSRHVISFARFAHRYGKRYENAEEMKLRFSIFKENLDLIRSTNKKGLSYKLGVNQFADMTWQEFQR
          :::   :  ::   *.:.*** *   : * .: .:***:*.:*****.:*** *.:.* * * * *.:**.* * * : * * *.:*** *.:***:
LsP1      HRLGAAQNCSATLKGNHKITDANLPDEKDWKREGIVSEVKDQGHGCGSCWTFSTTGALESAYAQAFGKNI SLSEQQLVDCAGAFNNFGCSGGLPSQAFEYIKYNGGLEETEETYPYTGSNGL
P.sativum HRLGAAQNCSATLKGNHKITDANLPDEKDWKREGIVSEVKDQGHGCGSCWTFSTTGALESAYAQAFGKNI SLSEQQLVDCAGAFNNFGCSGGLPSQAFEYIKYNGGLETEEAYPYTGSNGL
M.sativa  HRLGAAQNCSATLKGNHKITDVLVPAEKDWKREGIVSEVKDQGHGCGSCWTFSTTGALESAYAQAFGKNI SLSEQQLVDCAGAFNNFGCNGGLPSQAFEYIKYNGGLETEEAYPYTGQNGP
A.deliciosa HRLGAAQNCSATTKGNHKLTEEALPEMKDWRVSGIVSPVKDQGHGCGSCWTFSTTGALEAAYHQAFGKGISLSEQQLVDCAGAFNNFGCSGGLPSQAFEYVKYNGGLDTEEAYPYTGKNGE
C.sinensis HRLGAAQNCSATTKGNHKLTAADVLPETKDWRESGIVSPVKDQGHGCGSCWTFSTTGSLEAAYHQAFGKGISLSEQQLVDCAGAFNNQCSGGLPSQAFEYIKYNGGLDTEEAYPYTGKDGV
A.thaliana TKLGAAQNCSATLKGSHKVTAEALPETKDWREDGIVSPVKDQGGCGSCWTFSTTGALEAAYHQAFGKGISLSEQQLVDCAGAFNNYGCNGGLPSQAFEYIKSNGGLDTEKAYPYTGKDET
B.oleracea TKLGAAQNCSATLKGTHKLTGEALPETKDWREDGIVSPVKDQGGCGSCWTFSTTGALEAAYHQAFGKGISLSEQQLVDCAGAFNNYGCNGGLPSQAFEYIKSNGGLDTEEAYPYTGEDGT
          :***** ** .:.* ** **** .*** ***** :*:* ***. *****. ***** ** * * .*****:* ****:*:*:*:*:*.:
LsCP1      CKFTSENVALKVLGSVNITLGAEDELKHAVAFARPVSVAFEVVHDFRLYKSGVYTSTACGNTPMDVNHAVLAVGYGIEDGIPYWHIKNSWGGDWGDHGYFKMEMGKNMCGVATCSSYPVVA
P.sativum  CKFRSEHVAVKVLGSVNITLGAEDELKHAIARFPVSVAFEVVHDFRLYKSGVYTSTACGSTPMDVNHAVLAVGYGIEDGIPYWLKNSWGGDWGDHGYFKMEMGKNMCGVATCSSYPVVA
M.sativa   CKFTSEDAVAVQVLGSVNITLGAEDELKHAVAFARPVSVAFEVVDFRLYKKGVYTSTTCGNTPMDVNHAVLAVGYGIEDGVPYWLKNSWGGDWGDHGYFKMEMGKNMCGVATCSSYPVVA
A.deliciosa CKFSSENVGVQVLDSVNITLGAEDELKHAVAFVRPVSVAFQVNVGFRLYKEGVYTSDTTCGRTPMDVNHAVLAVGYGVENGVPYWLKNSWGADWGDHGYFKMEMGKNMCGVATCASYPVIA
C.sinensis CKFSSENVGVQVLDSVNITLGAEDELQHAVGLVLRPVSVAFEVVDGFRFYKSGVYSSTKCGNTPMDVNHAVVAVGYGVEDGVPYWLKNSWGENWGDHGYFKIKMGKNMCGIATCASYPVVA
A.thaliana CKFSAENVGVQVLNSVNITLGAEDELKHAVGLVLRPVSAFEVIHSAFRLYKSGVYTDSHCGSTPMDVNHAVLAVGYGVEDGVPYWLKNSWGADWGDHGYFKMEMGKNMCGIATCASYPVVA
B.oleracea CKYSAENVGVEVLDSVNITLGAEDELKHAVGLVLRPVSAFEVIHSAFRLYKSGVYSDSHCGQTPMDVNHAVLAVGYGIEDGVPYWLKNSWGADWGDHGYFKMEMGKNMCGIATCASYPVVA
          **: .*. *.:**.******:***:*.:..***:***:..**:*.*.***:.. ** *****:*****:***:*** ***** :*** *****:*****:***:***:

```

Figure 22 : Comparaison de la séquence en acides aminés de la cystéine protéase de *Lathyrus sativus* LsCP1 avec les séquences homologues d'autres espèces : *Pisum sativum* (Q41057), *Medicago sativa* (Q1KK73), *Actinidia deliciosa* (A5HIJ1), *Citrus sinensis* (A7LAB9), *Arabidopsis thaliana* (Q8H166) et *Brassica oleracea* (Q8W178). En gris (*) sont représentés les acides aminés conservés dans les sept séquences ; (:) représente les fortes similarités ; (.) représente les similarités plus faibles

3. Caractéristiques de la séquence nucléotidique *LsCPI* codant une cystéine protéase putative chez *Lathyrus sativus*

3.1. Détermination de séquences spécifiques

La phase codante de *LsCPI* a été déterminée précédemment entre l'ATG en position +47 et le TAA en position +1098, formant ainsi une ORF de 1053 pb (Fig. 21). Joshi a montré qu'il existait un contexte conservé autour de l'ATG de départ : aaA(A/C)aAUGGCu. L'analyse des nucléotides autour de l'ATG de départ de *LsCPI* permet de retrouver une grande partie de ces bases et ainsi confirmer la fonction de départ de ce codon (Joshi *et al.*, 1997) (Fig. 21).

La queue de polyA contient 20 adénines et débute à +1266 (Fig. 21). Cette séquence polyadénylée est partielle car en général elle s'étend sur environ 200 pb ou plus.

3.2. Cartographie de restriction

Une analyse de la séquence *LsCPI* avec le logiciel « restriction map » (http://www.bioinformatics.org/sms2/rest_map.html) permet de déterminer le nombre et la position des sites de restriction. Plusieurs sites de restriction se trouvent sur la séquence dont : AluI, BglII, DraI, HindIII, NcoI et SpeI. Par contre les sites BamHI, EcoRI et XbaI sont absents.

3.3. Analyse de la fréquence des bases

L'analyse de la fréquence des bases (<http://mobylye.pasteur.fr/cgi-bin/MobylyePortal/portal.py?form=tacg>) montre que la séquence de *LsCPI* est plus riche en A et T qu'en G et C (Tableau 22).

Tableau 22 : Fréquence des différentes bases dans la séquence *LsCPI*.

Base	Fréquence (%)
T	28.58
C	19.94
A	26.12
G	25.36
G+C	45.30
A+T	54.70

4. Caractéristiques de la séquence protéique LsCP1 de cystéine protéase de *Lathyrus sativus*

4.1. Structure générale de la LsCP1

L'analyse de la protéine déduite de *LsCP1* (http://bioinfo.hku.hk/services/analyseq/cgi-bin/mwcalc_in.pl) indique un point isoélectrique de 6.59 et une masse moléculaire de 38 700 Da.

L'étude de l'usage des codons dans la séquence codante de LsCP1 (<http://mobyli.pasteur.fr/cgi-bin/MobyliPortal/portal.py?form=cusp>) a permis de montrer que certains codons ne sont jamais utilisés dans la séquence de cystéine protéase du *Lathyrus sativus* comme GTA (V), ACG (T) et CGC (R).

L'analyse par « Prosite » (<http://www.expasy.ch/tools/scanprosite/>) a permis de localiser deux sites actifs de cystéine protéase. Le premier est un site actif « cystéine » (référence Uniprot PS00139) et est situé entre les acides aminés 151 et 162 : QGHCGSCWTFST (Fig. 21), correspondant au motif : Q-{V}-x-{DE}-[GE]-{F}-C-[YW]-{DN}-x-[STAGC]-[STAGCV]. Le deuxième est un site actif « histidine » eucaryotique (référence Uniprot PS00639) localisé entre les acides aminés 295 et 305 : VNHAVLAVGYG (Fig. 21), correspondant au motif : [LIVMGSTAN]-{IEVK}-H-[GSACE]-[LIVM]-{GPSI}-[LIVMAT](2)-G-{SLAG}-[GSADNH].

Un troisième site actif non localisé par le logiciel est cependant présent sur la séquence LsCP1, il s'agit d'un site actif « asparagine » correspondant au motif : [FYCH]-[WI]-[LIVT]-x-[KRQAG]-N-[ST]-W-x(3)-[FYW]-G-x(2)-G-[LFYW]-[LIVMFYF]-x-[LIVMF] (Nieuwenhuizen *et al.*, 2007) situé entre les acides aminés 312 et 331 : YWHIKNSWGGDWGDHGYFKM (Fig. 21).

L'analyse par « InterProScan Sequence Search » (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/InterProScan/>) a permis de confirmer la position des deux premiers sites actifs et l'appartenance de LsCP1 à la famille des peptidases C1A. Deux domaines caractéristiques de ces protéases sont également présents : un domaine protéase C1A en C-terminal (référence Uniprot PF00112) et un domaine inhibiteur de la protéase (I29).

La comparaison de la séquence protéique LsCP1 avec la base de donnée MEROPS permet de confirmer l'appartenance de cette protéine à la famille des protéases C1A de type papaine et de la classer parmi les aleuraïnes (identifiant MEROPS : C01.041). Cette analyse nous donne aussi l'emplacement des résidus catalytiques, Gln, Cys, His et Asn respectivement en position 151, 157, 296 et 316 (Fig. 21). Ces résultats sont en accord avec l'analyse « Prosite » précédente.

4.2. Recherche d'un peptide signal

Un peptide signal est constitué de trois zones distinctes : une région N-terminal ('n-region') qui contient souvent des acides aminés chargés positivement, une région hydrophobe ('h-region') composé d'au moins six acides aminés et une région C-terminale ('c-region') de résidus non chargés contenant en position -3 et -1 le site de clivage.

La méthode NNs (neural networks) a été utilisée par le logiciel « SignalP 3.0 » (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) (Emanuelsson *et al.*, 2007) et les résultats indiquent la présence d'un peptide signal à +47, avec un site de clivage entre les acides aminés 18 et 19 (Fig. 21). La 'n-region' se situerait entre les acides aminés 1 et 5, la 'h-region' entre les 6 et 14 et la 'c-region' entre 15 et 18.

La présence de la séquence N-P-I-R au 26^{ème} acide aminé dans le propeptide N-terminal indique que la protéine LsCP1 sera dirigée après bourgeonnement de l'appareil de Golgi vers les vacuoles lytiques (Matsuoka et Nakamura, 1991; Holwerda *et al.*, 1992; Nakamura et Matsuoka, 1993; Paris *et al.*, 1996; Vitale et Raikhel, 1999)

4.3. Recherche des sites de glycosylation et de phosphorylation

La glycosylation des protéines se fait au niveau du réticulum endoplasmique puis de l'appareil de golgi, après l'élimination du peptide signal.

La recherche des sites de glycosylation et donc des asparagines prédites pour être N-glycosylées (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>): Asn-X(sauf Pro)-Ser/Thr, a mis en évidence trois sites de glycosylation au niveau des Asn 117, 177 et 246 sur LsCP1 (Fig. 21).

La phosphorylation des protéines enzymatiques est le plus souvent nécessaire à leur activation et participe à la régulation de leur activité.

La recherche de ces sites de phosphorylation sur LsCP1

(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>) a donné de nombreux sites au niveau de huit serines, trois thréonines et cinq tyrosines (Fig. 21).

4.4. Recherche d'un peptide de transit chloroplastique

Un grand nombre de protéines des chloroplastes sont des protéines codées par le génome nucléaire et synthétisées dans le cytoplasme avant d'être importées dans le chloroplaste grâce à un peptide de transit chloroplastique (Weil, 1998). La recherche de ce type de signal (<http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/>) s'est révélée négative pour LsCP1.

5. Discussion

Un nouvel ADNc complet de cystéine protéase a été isolé à partir de feuilles de *Lathyrus sativus*. La séquence d'ADNc *LsCP1* est composée de 1285 pb et après traduction donne une protéine de 351 acides aminés. La comparaison de cette séquence protéique avec les bases de données protéiques et l'étude de sa structure permettent de l'identifier comme étant une cystéine protéase de la famille des C1A de type papaine. Cette séquence est composée dans la région N-terminale d'un peptide signal et d'un domaine inhibiteur de la protéase (I29). La région C-terminale contient un domaine caractéristique des protéases C1A, portant les trois sites actifs nécessaires à l'activité catalytique (Fig. 23). De plus cette séquence protéique présente des sites de glycosylation et de phosphorylation nécessaires à la maturation et à l'activation de la protéine. La présence du peptide signal permet de prédire la localisation de la protéine LsCP1 dans la 'voix sécrétoire', ce qui correspondrait à une localisation lysosomale.

Les cystéines protéases étant essentielles dans la régulation de l'accumulation des protéines non fonctionnelles, et suivant le modèle établi au laboratoire dans la voie lysosomale responsable de l'autolyse cellulaire adaptative (ACA), l'expression du gène codant cette nouvelle cystéine protéase LsCP1 pourrait être étudiée en réponse à diverses contraintes ou stimuli tels que la sécheresse, la salinité excessive ou les phytohormones (ABA ou acide jasmonique). Les variations de l'accumulation des transcrits en réponse au Pb ont été étudiées et sont décrites chapitres III et IV. La production de la protéine LsCP1 dans un système hétérologue eucaryotique (baculovirus/cellules d'insectes) pourrait permettre l'étude de ses caractéristiques biochimiques et fonctionnelles *in vitro*. Si la production de la protéine est

suffisante, l'obtention d'anticorps polyclonaux permettrait d'étudier par hybridation Western, les modalités de la traduction en réponse à divers contraintes abiotiques.

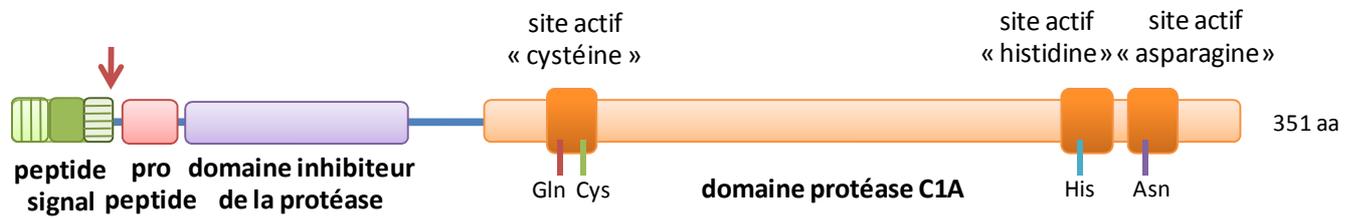


Figure 23 : Schéma de la cystéine protéase LsCP1 isolée chez *Lathyrus sativus* (351 acides aminés). Dans le peptide signal : 'n-region' : , 'h-region' :  ; 'c-region' : . Le site de clivage est signalé par une flèche. Gln, Cys, His et Asn représentent les acides aminés catalytiques.

CHAPITRE VI :
ÉTUDE PRÉLIMINAIRE :
ISOLEMENT D'UN ADNc PARTIEL CODANT
UNE PROTÉINE DE TYPE ABC ET SES
RÉPONSES CHEZ DES PLANTES DE
***Lathyrus sativus* L. EXPOSÉES AU PLOMB**

1. Introduction

La famille des protéines de type « ATP-binding cassette » (ABC) est une des plus grandes connues chez les plantes. Ces protéines ont, suivant leur sous classe, des rôles différents. Elles sont impliquées notamment dans le transport polaire de l'auxine, le catabolisme des lipides, la détoxification de xénobiotiques, la résistance aux maladies et le fonctionnement des stomates (Rea, 2007). Une grande majorité de ces protéines sont donc des transporteurs dont certaines interviennent dans le transport des métaux lourds (cf Etat des connaissances paragraphe 3.2.2.).

Toutes les protéines ABC sont formées à la base d'un ou de deux domaines NBD (nucléotide binding domain) et suivant la sous famille peuvent présenter un ou plusieurs domaines transmembranaires, un domaine de liaisons, une extension à l'extrémité C-terminale et un peptide signal (Sanchez-Fernandez *et al.*, 2001).

Les protéines ABC comportent 13 sous familles classées en trois catégories : les transporteurs ABC entiers : MDR (multidrug resistance), PDR (pleiotropic drug resistance), MRP (multidrug resistance-associated protein) et AOH (ABC1 homolog), les demi transporteurs ABC : PMP (peroxisomal membrane protein), WBC (white-brown complex homolog), ATH (ABC2 homolog), ATM (ABC transporter of mitochondria) et TAP (transporter associated with antigen processing) et les protéines ABC solubles : GCN (general control non-repressible), RLI (RNase L inhibitor), SMC (structural maintenance of chromosomes) et NAP(non-intrinsic ABC protein) (Sanchez-Fernandez *et al.*, 2001).

Parmi les protéines ABC solubles, les protéines de la sous famille des GCN (general control non-repressible) sont formées de deux NBD et ne contiennent pas de domaine transmembranaire (Sanchez-Fernandez *et al.*, 2001). Elles n'interviennent donc pas dans des phénomènes de transport (Verrier *et al.*, 2008). Chez la levure, ces protéines régulent la traduction des protéines (Vazquez de Aldana *et al.*, 1994) et chez l'homme, elles participent à la réponse inflammatoire impliquant les cytokines (Sanchez-Fernandez *et al.*, 2001).

Chez *Arabidopsis thaliana*, cinq ORF ont été mis en évidence comme codant pour des protéines de cette sous famille GCN (Sanchez-Fernandez *et al.*, 2001).

2. Isolement d'un ADNc partiel correspondant à une partie de la séquence d'une protéine de type ABC

Un fragment d'ADNc de GCN de *Lathyrus sativus* (*LsGCN*) a été isolé à partir d'ARN totaux des feuilles de plantes de la lignée 'Bangladesh'. Cette séquence de 993 pb a été isolée par RT-PCR à l'aide d'amorces hétérologues (sens : 5' AAAGGCTTGAGGAAATA 3' ; anti-sens : 5' TGCTTTTCTGACCACCTG 3').

L'analyse de cette séquence *LsGCN*, traduite en acides aminés, a permis de mettre en évidence la présence partielle de deux cassettes liant l'ATP appelées NBDs (nucleotide-binding domains) (Davies et Coleman, 2000). La séquence *LsGCN* contient un motif 'Walker A' [AG]-x(4)-G-K-[ST] retrouvé chez de nombreuses ATPases (Walker *et al.*, 1982) et une signature spécifique des protéines de type ABC encore appelée motif C [LIVMFY]-S-[SG]-G-x(3)[RKA]-[LIVMYA]-x-[LIVMF]-[AG] (Bairoch, 1992) (Fig. 24).

De plus, cette séquence présente de fortes identités avec une protéine ABC de type GCN d'*Arabidopsis thaliana* et avec des protéines de type ABC mais dont la catégorie n'est pas déterminée d'*Oryza sativa* et de *Glycine max* (Tableau 23).

De part sa structure composée de deux domaines NBD, cette séquence *LsGCN* semble correspondre à une protéine de type ABC et plus particulièrement à la sous famille GCN (general control non-repressible). Cette classification devra être confirmée après l'obtention de la séquence complète de cet ADNc chez le *Lathyrus* par 5' et 3' RACE PCR.

Les protéines de type ABC ayant des structures communes, il sera nécessaire de prendre des amorces correspondant à des séquences de domaines spécifiques se trouvant dans la sous famille sélectionnée de transporteurs ABC, afin d'en isoler un et de tester son rôle dans le transport du Pb.

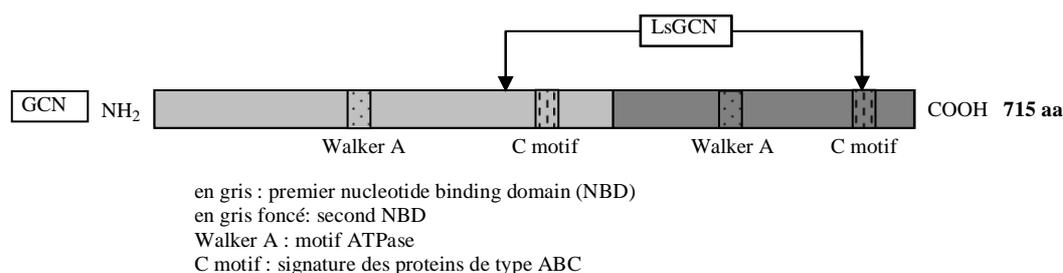


Figure 24 : Schéma représentant la structure de la protéine codée par le gène de GCN. Les flèches représentent le fragment isolé chez le *Lathyrus sativus* LsGCN.

Espèces	Numéro d'accès GenBank	Identité (%)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	AAQ65167	90
<i>Oryza sativa</i>	BAD23048	87
<i>Glycine max</i>	AAL66714	80

Tableau 23 : Pourcentage d'identité et de similarité entre la séquence en acides aminés de LsGCN d'une protéine de type ABC de *Lathyrus sativus* et les séquences les plus proches d'autres espèces végétales

3. Expression du gène codant pour une protéine GCN

LsGCN ne correspond pas à une protéine de transport, cependant son expression dans des plantes exposées au Pb a été analysée.

3.1. Expérimentation

Des plantules *Lathyrus sativus* de la lignée locale 'Bangladesh' âgées de six jours ont été conditionnées au milieu Hoagland 1/10 sur de la vermiculite, pendant huit jours. Ces plantes sont alors placées en culture hydroponique. Cinq milieux de culture sont testés, tous à base de solution Hoagland 1/10 sans phosphate : 1) témoin, 2) 0.5 mM Pb(NO₃)₂, 3) 0.5 mM Pb(NO₃)₂ et 0.5 mM EDTA, 4) 0.2 mM Pb(NO₃)₂, 5) 0.2 mM Pb(NO₃)₂ et 0.2 mM EDTA. Les plantes sont récoltées après 8 et 14 jours de culture hydroponique. Une partie des racines est rincée pendant une heure dans une solution d'H-EDTA à 1 mM.

Les analyses d'accumulation de transcrits de *LsGCN* ont été effectuées par PCR en temps réel (amorces spécifiques sens : 5'CGAGTCACGAGCAGCATCTAT^{3'} et anti-sens : 5'CGATTCAAGCCATAAGACAGC^{3'}) à partir d'extraits d'ARN totaux de racines et de

feuilles de plantes cultivées pendant huit jours dans les conditions de contraintes citées ci-dessus.

3.2. Résultats

L'expression de *LsGCN* ne varie pas dans les racines des plantes exposées au Pb quelque soit la composition du milieu (Fig. 25). L'accumulation de son transcrite est en moyenne multipliée par trois dans les feuilles des plantes traitées au Pb avec ou sans EDTA par rapport aux témoins (Fig. 25). Les différences entre les traitements ne semblent pas significatives.

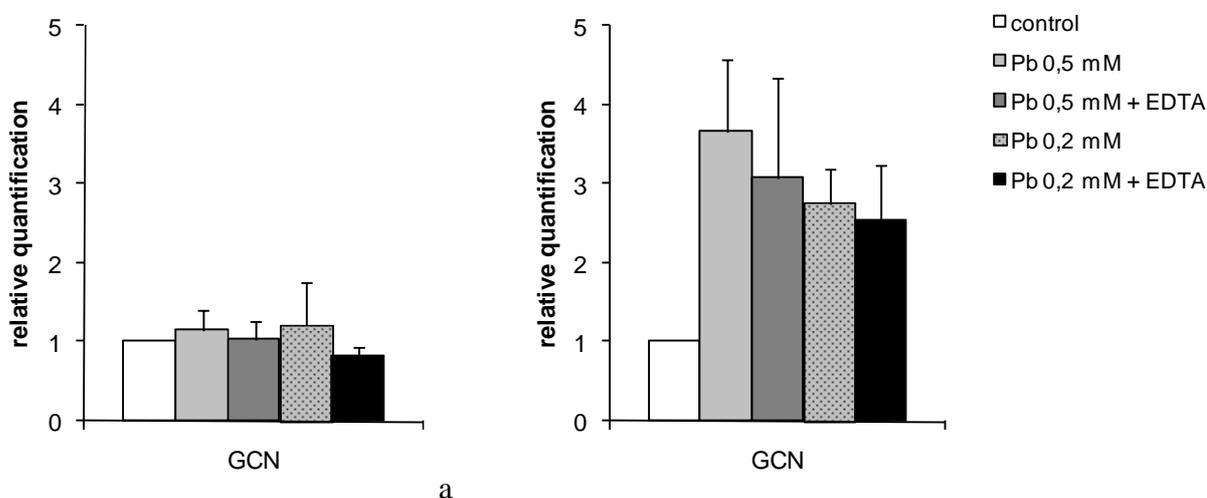


Figure 25 : Quantification des transcrits d'ARNm de *LsGCN* par PCR en temps réel dans les racines (a) et feuilles (b) de plantes de *Lathyrus sativus*, cultivées, huit jours, dans du milieu Hoagland (1/10) sans phosphate additionné de 0.5 mM $Pb(NO_3)_2$, 0.5 mM $Pb(NO_3)_2$ + 0.5 mM EDTA, 0.2 mM $Pb(NO_3)_2$, 0.2 mM $Pb(NO_3)_2$ + 0.2 mM EDTA ou non (control). *LspUBQ* a été utilisé comme gène de référence (n=3).

3.3. Discussion

Les quantités de Pb accumulées dans les plantes de cette étude correspondent à celles accumulées par les plantes de l'étude présentée dans le chapitre IV, les conditions de culture étant identiques (Fig. 18).

L'expression de *LsGCN* n'est pas dépendante de la présence de Pb dans les racines car le degré d'expression ne varie pas quelque soit le traitement. Par contre, l'accumulation de son transcrite est observée dans les feuilles de toutes les plantes exposées au Pb (Pb seul ou Pb-EDTA) et ne contenant pas obligatoirement de Pb (Fig. 18). L'expression de *LsGCN* semble

donc impliquée par la seule présence du Pb dans le milieu de culture. Cette réponse pourrait être induite par le signal systémique se produisant chez les plantes de *Lathyrus* en réponse au Pb (Brunet *et al.*, soumis).

Les protéines GCNs se retrouvent aussi bien chez les eucaryotes que chez les procaryotes et y sont connues pour participer dans des fonctions de régulation (Dassa et Bouige, 2001). Par exemple, chez la levure, la protéine GCN20 a été montrée s'associant avec la protéine GCN1 afin de stimuler l'activité de GCN2. La kinase GCN2 phosphoryle ensuite le facteur d'initiation de la traduction eIF2 et conduit à l'augmentation de la traduction de l'activateur transcriptionnel GCN4 (Marton *et al.*, 1997).

Malgré l'identification des séquences EST de quatre des cinq AtGCNs et l'isolement de séquences similaires chez *Oryza sativa*, le rôle de ces protéines solubles n'est pas défini chez les plantes. Il est possible, par comparaison, de supposer qu'elles interviennent dans des processus de régulation de la traduction des protéines qui seraient induits non pas par la présence de Pb directement mais par un signal systémique qu'il induit chez les plantes de *Lathyrus sativus*.

PARTIE 4 :
DISCUSSION GÉNÉRALE
ET PERSPECTIVES

Discussion générale

L'objectif de ce travail de thèse était d'étudier les réponses phénologiques et moléculaires de deux lignées de *Lathyrus sativus*, 'Bangladesh' et 'Raipur', en réponse à la présence d'un métal lourd, le plomb, dans le milieu de culture. Les réponses moléculaires étudiées correspondent aux analyses d'expression de gènes impliqués dans les réponses cellulaires à la contrainte oxydative, dans les processus d'autolyse cellulaire ainsi que dans les processus de transport du plomb dans les plantes. Les variations dans l'expression d'un gène ne correspondent pas obligatoirement à des variations dans l'activité enzymatique de la protéine codée par le gène. Cependant, dans certains cas ce parallèle a été mis en évidence. C'est le cas de la phospholipase D α (Wang, 2002). Chez le *Lathyrus*, des études complémentaires en cours semblent montrer une corrélation entre l'augmentation de l'expression du gène codant la glutathion réductase et l'activité de cette enzyme (D. Contour-Ansel, communication personnelle). Pour les autres gènes sélectionnés pour ce travail, le lien entre les variations de leur expression et une variation d'activité enzymatique reste une hypothèse étayée par des comparaisons avec des études effectuées chez d'autres espèces végétales.

La culture en hydroponie a été choisie pour les expériences afin de contrôler la quantité de plomb disponible pour les plantes. Après la mise au point d'un nouveau système de culture hydroponique adapté aux lignées considérées, différentes variables ont été prises en compte pour la réalisation des expériences. Ce sont les suivantes :

- 1- la durée de l'exposition au polluant
- 2- la concentration en plomb et sa mobilité
- 3- la nature des tissus végétaux concernés par la présence du plomb

Les résultats expérimentaux vont être discutés dans le texte qui suit en fonction de ces variables afin de mettre en évidence les stratégies de réponse au plomb mises en œuvre chez cette espèce végétale. La variable « génotype » n'est pas retenue car malgré des différences dans leurs réponses à une sécheresse contrôlée, les deux lignées de *Lathyrus sativus* choisies dans ce travail ne présentent pas de différence notable concernant leurs réponses au plomb.

1- Influence de la durée de l'exposition au nitrate de plomb de plantes de *Lathyrus sativus* sur l'accumulation du polluant

Les durées d'exposition des plantes au nitrate de plomb ont varié entre 4 et 14 jours.

Les plantes de *Lathyrus sativus* accumulent rapidement des quantités importantes de plomb. Dès 4 jours de culture en présence de Pb ($0.5 \text{ mM Pb(NO}_3)_2$) les teneurs en métal dans les plantes de la lignée 'Bangladesh' sont en moyenne de 140 mg de Pb par g de matière sèche. Cette valeur n'augmente que faiblement dans la suite du traitement et atteint après 14 jours de culture 153 mg de Pb par g de matière sèche.

La teneur en plomb des plantes de *Lathyrus* est en partie formée par le plomb lié à des sites échangeables à la surface des racines. Ces sites semblent rapidement se saturer en plomb puisque peu de variations s'observent au niveau de la teneur en plomb totale dans les racines entre quatre et 14 jours de traitement.

La teneur en plomb non échangeable quant à elle augmente avec la durée du traitement ($0.5 \text{ mM Pb(NO}_3)_2$). Alors qu'elle ne représente, après huit jours de culture, qu'un tiers de la teneur en plomb totale dans les racines, elle en représente la moitié à 14 jours (75.07 mg Pb/ g de matière sèche). Cette variation indique que la quantité de plomb non échangeable accumulée par les racines de *Lathyrus* n'a peut être pas atteint son maximum après 4 jours de culture, en continuant le traitement les plantes seraient peut être capables d'accumuler plus de plomb échangeable que de non échangeable.

Une plus faible concentration en nitrate de Pb (0.2 mM) dans le milieu de culture correspond à des profils d'accumulation identiques à ceux décrits pour 0.5 mM de $\text{Pb(NO}_3)_2$.

2- Influence de la concentration en nitrate de plomb dans le milieu de culture et de sa mobilité sur les teneurs en plomb absorbé dans les plantes de *Lathyrus sativus*

Deux concentrations de nitrate de plomb ont été utilisées dans ce travail : 0.2 mM et 0.5 mM .

Si l'on établit une correspondance entre ces concentrations en $\text{Pb(NO}_3)_2$ et les teneurs en plomb mesurées dans divers sites contaminés (Tableau 2), il apparaît que 0.2 mM de $\text{Pb(NO}_3)_2$ et 0.5 mM de $\text{Pb(NO}_3)_2$ correspondent à des teneurs en plomb de sédiments miniers hautement contaminés (approximativement 10 et 22 g de Pb par kg de sol, pour un sol argileux type à la capacité au champ).

Quelque soit la quantité de plomb dans le milieu, la grande majorité du métal accumulée dans les plantes de *Lathyrus* se situe au niveau des racines. Après 14 jours de culture en présence de 0.2 mM ou 0.5 mM de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ en moyenne 2.53 et 11.10 mg respectivement de Pb par g de matière sèche se retrouve dans les tiges des plantes de *Lathyrus*, et la teneur en plomb des feuilles est quasiment nulle.

Les teneurs totales en plomb fixé par les plantes varient en fonction de la concentration en $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ dans le milieu de culture (+ 30 % en présence de 0.5 mM par rapport à 0.2 mM). On peut alors se demander si les capacités maximales de fixation ont été atteintes.

Chez de nombreuses espèces végétales, la relative immobilité du plomb dans la plante peut être réduite par l'ajout d'un chélateur tel que l'EDTA dans le milieu de culture (Evangelou *et al.*, 2007). La complexation de l'EDTA avec le plomb facilite leur entrée dans le symplasme (Evangelou *et al.*, 2007), limite les liaisons avec les molécules biologiques et permet ainsi au plomb d'être transporté au delà des racines (Blaylock *et al.*, 1997; Jarvis et Leung, 2002). C'est le cas chez le *Lathyrus*. En effet, les plantes exposées à 0.5 mM de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ et EDTA pendant 14 jours ne présentent plus qu'une faible proportion de plomb dans leurs racines, la quasi totalité se retrouvant dans les feuilles. La quantité de plomb dans les feuilles de ces plantes est multipliée par 65 par rapport aux feuilles des plantes exposées au plomb sans EDTA. Le transport des complexes Pb-EDTA est un phénomène relativement lent car après 8 jours de culture, la moitié du plomb total contenu dans la plante est encore présent dans les racines. L'augmentation de l'expression d'un gène codant un transporteur spécifique du plomb (CNGC) (Arazi *et al.*, 1999) dans les racines traitées au plomb et EDTA (0.5 mM), suggère son implication dans le transport des complexes Pb-EDTA à travers la membrane plasmique et ainsi son entrée dans la voie de transport vers les parties aériennes. Contrairement à ce qui vient d'être discuté, l'effet de l'EDTA sur le transport du plomb est négatif chez les plantes cultivées en présence de 0.2 mM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ où l'ajout d'EDTA dans le milieu de culture diminue la teneur en plomb dans les plantes entières. Après 14 jours de traitement, la teneur en plomb dans les racines est seulement de 3.56 mg de Pb par g de matière sèche et la quantité de Pb/EDTA transportée dans les feuilles reste faible et n'atteint que 8.86 mg de Pb par g de matière sèche.

3- Réponses des différents organes des plantes de *Lathyrus sativus* à la présence de nitrate de plomb dans le milieu de culture

Les diverses analyses ont été réalisées dans les trois organes suivants des plantes : racines, tiges et feuilles. Les tiges ont été considérées comme un compartiment potentiellement important dans les mécanismes d'acquisition du plomb chez le *Lathyrus* car elles sont ailées, ce qui semble leur permettre de jouer un rôle non négligeable dans l'activité photosynthétique (D. Laffray, communication personnelle).

Le développement et en particulier la croissance racinaire du *Lathyrus sativus* sont fortement inhibés dès 24 h de traitement, pour les deux lignées et en réponse aux deux concentrations de Pb. Cette inhibition conduit à un arrêt de croissance. Ce phénomène est fréquemment décrit et est notamment dû à une carence des plantes en éléments nutritifs, ce qui a été montré chez les plantes de *Lathyrus* dans cette étude. Une autre raison peut être l'inhibition de la division cellulaire (Wierzbicka, 1989; Wozny et Jerczynska, 1991; Eun *et al.*, 2000) et de l'élongation des cellules (Seregin et Ivanov, 1997; Obroucheva *et al.*, 1998; Malkowski *et al.*, 2002) provoquée par le Pb. Les feuilles des plantes traitées au plomb sont de même plus petites que celles des plantes témoins.

A l'échelle de la plante entière les *Lathyrus* accumulent, comme beaucoup de Fabacées (légumineuses), le plomb dans leurs racines et en transporte très peu vers les parties aériennes (Piechalak *et al.*, 2002). Ceci peut être dû à son affinité pour les structures végétales de la surface racinaire et/ou à une accumulation du plomb dans l'apoplasme jusqu'au blocage par la bande casparienne (Seregin et Ivanov, 1997; Verma et Dubey, 2003).

A l'échelle des racines, les expériences de désorption avec des chélateurs de forces variées (EDTA et H-EDTA) ont permis de mettre en évidence trois niveaux de fixation du plomb d'intensité variables. Dans la bibliographie, les chélateurs sont utilisés pour éliminer le plomb apoplasmique (Huang et Cunningham, 1996). Dans ce cas, environ 50 % du plomb fixé se retrouverait dans le symplasme. Là, il s'est lié à des composés cellulaires (provoquant des dysfonctionnements métaboliques) ou a été séquestré. Dans les deux cas, le plomb est immobilisé. En l'absence d'analyses microscopiques, il est impossible de confirmer sa localisation intracellulaire. Il apparaît cependant que les cellules des racines subissent une contrainte comme le montre l'augmentation de l'expression de la phospholipase D α qui semble être un marqueur général de contrainte cellulaire (Wang, 2002; Matos *et al.*, 2001). De

plus, l'importante augmentation de la transcription de la glutathion S-transférase dans les racines des plantes exposées au plomb suggère également une augmentation de la formation de complexe glutathion-Pb (Chasseaud, 1979; Reddy *et al.*, 2005). Tous ces résultats suggèrent qu'une portion du plomb fixé par les tissus racinaires est symplasmique. De plus, il semble que la séquestration du plomb sous forme de complexes glutathion-Pb ne suffise pas à protéger les cellules car le plomb induit une augmentation de l'expression de gènes codant des enzymes (ascorbates peroxydases et glutathion réductase) impliquées dans le cycle ascorbate glutathion lui même impliqué dans la prise en charge des ROS générées par le plomb (Malecka *et al.*, 2001).

Alors que le plomb n'est pas transporté vers les feuilles, elles subissent une contrainte cellulaire mise en évidence par l'augmentation de la transcription de la phospholipase D α . Des variations dans l'expression des gènes intervenant dans le cycle ascorbate glutathion (ascorbate peroxydases et glutathion réductase) et de l'autolyse (cystéine protéase et aspartique protéase) sont de plus observées. Ceci traduirait une réaction systémique des racines à la présence de plomb par la transmission d'un signal moléculaire vers les parties aériennes. Maksymiec (2007) a regroupé les molécules pouvant intervenir comme signal lors d'une contrainte métallique : la systémine, l'acide salicylique et les jasmonates (Turner *et al.*, 2002) ainsi que leur précurseur l'acide oxo-phytodiénoïque (Stintzi *et al.*, 2001; Rakwal *et al.*, 2002), l'éthylène (Guo et Ecker, 2004) et l'acide abscissique (Finkelstein *et al.*, 2002) mais aussi les brassinosteroides, les oxydes d'azote (Durner et Klessig, 1999; Bishop et Koncz, 2002), et les ROS (particulièrement H_2O_2) (Lamb et Dixon, 1997; Orozco-Cardenas *et al.*, 2001; Foyer et Noctor, 2003; Rentel et Knight, 2004).

Des hypothèses peuvent être émises sur la nature de ce signal dans les plantes de *Lathyrus sativus* contraintes par le plomb : 1) dans les feuilles des plantes exposées au Pb, les gènes ascorbate peroxydases et glutathion réductase codant pour des enzymes intervenant dans le cycle ascorbate glutathion sont plus exprimés que chez les témoins. Ceci pourrait correspondre à la réponse des cellules foliaires à une molécule de signal de type ROS envoyée par les racines. 2) l'induction de l'expression de HSP 70 peut quant à elle être due à la présence d'un signal de type acide abscissique (Heikkila 1984) ou O_2^- (Efremova *et al.*, 2002; Rau *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2008).

Les réponses induites par le signal ou le signal lui même pourraient endommager des protéines, notamment si le signal est de type ROS. Ceci expliquerait l'augmentation de

l'expression des gènes codant deux protéases (cystéine protéase et aspartique protéase). La plante limite ainsi l'accumulation de protéines anormales en les dégradant. Cela permet aussi la synthèse de nouvelles protéines pour l'adaptation à la contrainte. Ce phénomène d'autolyse a été montré comme un mécanisme de tolérance des plantes à la sécheresse (Zuily-Fodil *et al.*, 1990; Roy-Macauley *et al.*, 1992; Cruz de Carvalho *et al.*, 2001; Dramé *et al.*, 2007).

Alors que l'homoglutathion synthétase n'est pas surexprimée dans les feuilles des plantes exposées quatre jours au Pb, elle l'est après huit jours, ceci impliquerait une augmentation de la synthèse d'homoglutathion induite par l'épuisement de son stock. L'homoglutathion synthétase ne répondrait donc pas directement au signal envoyé par les racines mais au manque d'homoglutathion. Cet homoglutathion a pu être utilisé dans la synthèse d'homophytochélatines (Grill *et al.*, 1986; Klapheck *et al.*, 1995) ou intervenir dans un cycle de type « ascorbate glutathion » mais fonctionnant avec l'homoglutathion (Iturbe-Ormaetxe *et al.*, 2001). Cette voie « parallèle » à celle du glutathion ne semble pas prédominante dans les plantes de *Lathyrus sativus* en réponse au Pb.

4- Conclusion

En conclusion, les plantes de *Lathyrus sativus* présentent une forte tolérance au plomb car elles survivent à la présence de forte concentration de ce métal dans le milieu de culture pendant 14 jours en restant vertes. De plus elles sont capables d'accumuler des quantités de plomb comparables à celles retrouvées dans des plantes réputées pour leur forte capacité d'accumulation telles que *Brassicae juncea* (Meyers *et al.*, 2008).

A l'origine de cette tolérance élevée, plusieurs stratégies de réponses et de défense à la présence de plomb dans le milieu de culture ont été mises en œuvre (Fig. 26).

La première stratégie est celle de l'évitement qui consiste à lier rapidement des quantités importantes de plomb aux sites externes des racines afin de limiter le plomb entrant en contact des cellules. La deuxième stratégie permet de chélater une partie des ions Pb^{2+} entrés dans les cellules avec le GSH afin d'éviter les effets délétères qu'ils pourraient y causer. Dans une troisième stratégie les plantes de *Lathyrus* vont prendre en charge les ROS produits en présence de plomb par activation du cycle ascorbate-gluthathion. La quatrième stratégie va consister en l'envoi par les racines d'un signal systémique préventif vers les parties aériennes. Les feuilles se préparent ainsi à la possible arrivée du plomb en développant

les elles mêmes les mécanismes précédents et en y ajoutant un dernier mécanisme de tolérance qui est l'autolyse cellulaire possiblement adaptative.

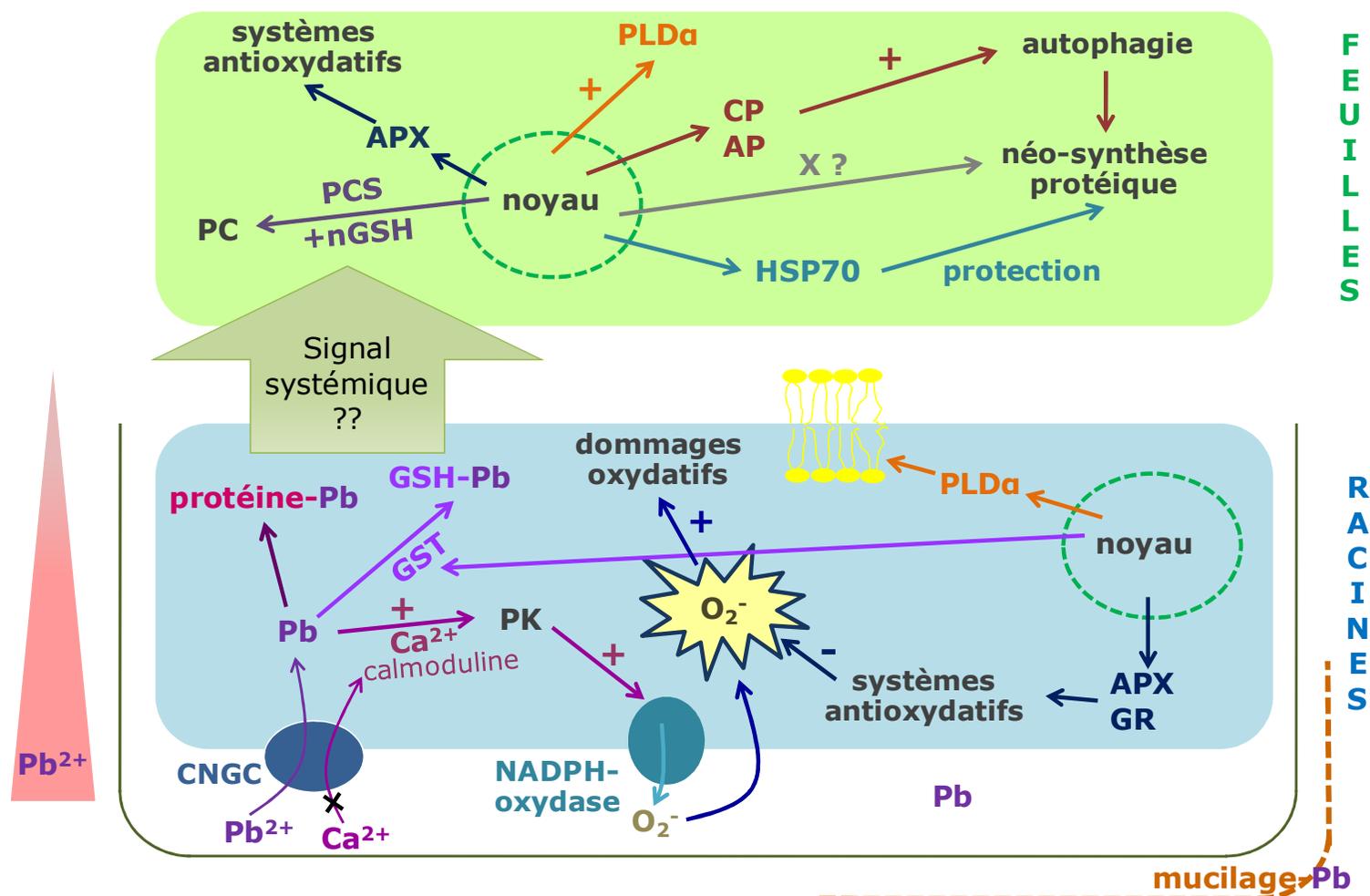


Figure 26 : Schématisation des réponses des plantes de *Lathyrus sativus* à la présence de nitrate de plomb dans le milieu de culture hydroponique.

Perspectives

Dans un premier temps et dans la continuité directe de cette étude, l'analyse des activités des enzymes intervenant dans le cycle ascorbate glutathion (Murshed *et al.*, 2008) et le dosage du glutathion permettrait de définir plus précisément les mécanismes de tolérance du *Lathyrus* à la contrainte oxydative. De même l'analyse des activités protéasiques permettrait d'étudier de façon plus complète les mécanismes de l'autophagie cellulaire chez les plantes de *Lathyrus* exposées au Pb.

Les capacités du *Lathyrus sativus* à accumuler le plomb et à tolérer sa présence indique que cette plante pourrait être utilisée dans un système de dépollution des eaux ou des sols.

De plus la mise au point de plantes transgéniques surexprimant un chélateur interne et/ou un transporteur spécifique du plomb tel que le CNGC, permettrait peut être d'obtenir des plantes capable d'accumuler du plomb dans les parties aériennes. Elles seraient alors utilisables dans des systèmes de dépollution nécessitant la récolte des parties aériennes au lieu de l'arrachage des plantes entières et présenteraient un avantage supplémentaire par sa résistance naturelle à de nombreuses contraintes abiotiques.

Il sera important aussi de tester les capacités de tolérance du *Lathyrus sativus* à d'autres métaux car il est rare qu'un milieu soit pollué par un seul métal. Ces analyses pourraient s'effectuer sur des milieux contenant tout d'abord un seul élément métallique (Cd, Zn, Ni, Cu...) puis un mélange de plusieurs métaux lourds. Ceci permettrait d'étudier les réponses de la plante aux autres métaux mais aussi sa réaction face à la combinaison de plusieurs d'entre eux qui pourrait induire une contrainte différente. De plus un phénomène de compétition entre les différents éléments métalliques pourra se produire permettant de déterminer les « préférences » du *Lathyrus sativus*.

Nous avons ici initié l'étude chez *Lathyrus sativus* de certains mécanismes moléculaires, tels que l'autophagie cellulaire adaptative, répondant à la présence de plomb dans le milieu de culture. Il serait intéressant de comparer ces mécanismes de tolérance avec ceux d'autres variétés de plantes cultivées dans les mêmes conditions. Ce travail permettrait peut être la mise en évidence d'un 'modèle' de réactions communes. Ce modèle pourrait

ensuite être comparé à celui de l'autophagie cellulaire adaptative développé au sein de notre laboratoire en réponse à la sécheresse (Roy-Macauley *et al.*, 1992; El Maarouf *et al.*, 1999; Cruz de Carvalho *et al.*, 2001; D'Arcy-Lameta *et al.*, 2006).

Le passage à une culture sur sol pollué permettrait d'étudier les capacités du *Lathyrus sativus* à extraire le plomb présent dans le sol, c'est-à-dire à absorber le plomb dans la solution du sol (disponible pour les plantes) et rendre une partie du plomb liée aux particules du sol disponible en le dessorbant notamment grâce à des exsudats racinaires.

De plus dans les sols, même pollués, il existe des microorganismes pouvant interagir avec les plantes et notamment les rhizobiums qui peuvent entrer en symbiose avec les Fabacées comme le *Lathyrus sativus*. Cette symbiose peut être un facteur positif au niveau de la nutrition azotée mais peut aussi intervenir au niveau de la tolérance et de l'accumulation du plomb dans les plantes (Zhengwei *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2007; Reichman, 2007). Cette intervention pourrait mener à une augmentation de la quantité de plomb absorbée aussi bien qu'à une diminution, ceci dépendra notamment de la souche de rhizobium concernée (Fitz et Wenzel, 2002).

RÉFÉRENCES

A

- Abd El Moneim AM, van Dorrestein B, Baum M, Ryan J, Bejiga G** (2001) Role of ICARDA in improving the nutritional quality and yield potential of grasspea (*Lathyrus sativus* L.), for subsistence farmers in dry areas. *Lathyrus Lathyrism News Letters* 2: 55-58
- Akashi K, Nishimura N, Ishida Y, Yokota A** (2004) Potent hydroxyl radical-scavenging activity of drought-induced type-2 metallothionein in wild watermelon. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 323: 72-78
- Alonso JM, Hirayama T, Roman G, Nourizadeh S, Ecker JR** (1999) EIN2, a Bifunctional Transducer of Ethylene and Stress Responses in Arabidopsis. *Science* 284: 2148-2152
- Andrés-Colás N, Sancenón V, Rodríguez-Navarro S, Mayo S, Thiele DJ, Ecker JR, Puig S, Peñarrubia L** (2006) The Arabidopsis heavy metal P-type ATPase HMA5 interacts with metallochaperones and functions in copper detoxification of roots. *The Plant Journal* 45: 225-236
- Antosiewicz DM, Hennig J** (2004) Overexpression of LCT1 in tobacco enhances the protective action of calcium against cadmium toxicity. *Environmental Pollution* 129: 237-245
- Antosiewicz DM, Wierzbicka M** (1999) Localization of lead in *Allium cepa* L. cells by electron microscopy. *Journal of Microscopy* 195: 139-146
- Arazi T, Sunkar R, Kaplan B, Fromm H** (1999) A tobacco plasma membrane calmodulin-binding transporter confers Ni²⁺ tolerance and Pb²⁺ hypersensitivity in transgenic plants. *The Plant Journal* 20: 171-182
- Asada K** (1996) Radical production and scavenging in the chloroplast. *In* NR Barker, ed, *Photosynthesis and the environment*. The Netherlands, Kluwer, Dordrecht, pp 123-320
- Asada K** (1997) The role of ascorbate peroxidase and monodehydroascorbate reductase in H₂O₂ scavenging in plants. *In* S J, ed, *Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defences*. Cold Spring Harbor Lab. Press, Cold Spring Harbor, NY
- Assuncao A, Da Costa Martins P, De Folter S, Vooijs R, Aarts GM** (2001) Elevated expression of metal transporter genes in three accessions of the metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Plant Cell Environ.* 24: 217-226
- Axelsen KB, Palmgren MG** (2001) Inventory of the Superfamily of P-Type Ion Pumps in Arabidopsis. *Plant Physiology* 126: 696-706

B

- Bairoch A** (1992) PROSITE: a dictionary of sites and patterns in proteins. *Nucleic Acids Research* 20 (Suppl.): 2013-2018

- Baker AJM, Brooks RR** (1989) Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements - A review of their distribution, ecology and phytochemistry. *In* Biorecovery, Vol 1. AB Academic Publishers, pp 81-126
- Baker AJM, McGrath SP, Reeves RD, Smith JAC** (2000) Metal hyper-accumulator plants: a review of the ecology and physiology of a biological resource for phytoremediation of metal-polluted soils. *In* N Terry, G Banuelos, eds, Phytoremediation of contaminated soil and water. Lewis Publishers CRC, Boca Raton, pp 85-107
- Barclay LRC** (1988) The cooperative antioxidant role of glutathione with a lipid-soluble and a water-soluble antioxidant during peroxidation of liposomes initiated in the aqueous phase and in the lipid phase. *Journal of Biological Chemistry* 263: 16138-16142
- Baumann A** (1885) Das verhalten von zinksatzen gegen pflanzen und imboden. *Landwirtsch. Verss.* 3: 1-53
- Bazzaz FA, Rolfe GL, Windle P** (1974) Differing sensitive of corn and soybean photosynthesis and transpiration to lead contamination. *Journal of Environmental Quality* 3: 156-158
- Belouchi A, Cellier M, Kwan T, Saini HS, Leroux G, Gros P** (1995) The macrophage-specific membrane protein Nramp controlling natural resistance to infections in mice has homologues expressed in the root system of plants. *Plant Molecular Biology* 29: 1181-1196
- Belouchi A, Kwan T, Gros P** (1997) Cloning and characterization of the OsNramp family from *Oryza sativa*, a new family of membrane proteins possibly implicated in the transport of metal ions. *Plant Molecular Biology* 33: 1085-1092
- Berezky Z, Wang H, Schubert V, Ganai M, Bauer P** (2003) Differential Regulation of nramp and irt Metal Transporter Genes in Wild Type and Iron Uptake Mutants of Tomato. *Journal of Biological Chemistry* 278: 24697-24704
- Bernard C, Roosens N, Czernic P, Lebrun M, Verbruggen N** (2004) A novel CPx-ATPase from the cadmium hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *FEBS Letters* 569: 140-148
- Berthelin J** (1983) Microbial weathering processes. *In* WE Krumbein, ed, *Microbial Geochemistry*. Blackwell Scientific Publications, Oxford
- Bishop GJ, Koncz C** (2002) Brassionosteroids and plant steroid hormone signaling. *Plant Cell* 14(Suppl): 97-110
- Blaylock MJ, Huang JW** (2000) Phytoextraction of metals. *In* I Raskin, BD Ensley, eds, *Phytoremediation of toxic metals: using plants to clean up the environment*. John Wiley and Sons, New York, p 53-70
- Blaylock MJ, Salt DE, Dushenkov S, Zakharova O, Gussman C, Kapulnik Y, Ensley BD, Raskin I** (1997) Enhanced accumulation of Pb in Indian mustard by soil-applied chelating agents. *Environmental Science and Technology* 31: 860-865

- Bliefert C, Perraud R** (2001) *Chimie de l'environnement: air, eau, sols, déchets*, Ed De Boeck Université
- Bourdineaud JP, Baudrimont M, Gonzalez P, Moreau JL** (2006) Challenging the model for induction of metallothionein gene expression. *Biochimie Facets of Environmental Nuclear Toxicology* 88: 1787-1792
- Bridgwater AV, Meier D, Radlein D** (1999) An overview of fast pyrolysis of biomass. *Organic Chemistry* 30: 1479-1493
- Brkljacic JM, Samardzic JT, Timotijevic GS, Maksimovic VR** (2004) Expression analysis of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) Metallothionein-like gene (MT3) under different stress and physiological conditions. *Journal of Plant Physiology* 161: 741-746
- Brunet J, Repellin A, Varrault G, Terryn N, Zuily-Fodil Y** (2008) Lead accumulation in the roots of grass pea (*Lathyrus sativus* L.): a novel plant for phytoremediation systems? *Comptes Rendus Biologies* 331: 859-864
- Brunet J, Repellin A, Varrault G, Terryn N, Zuily-Fodil Y** (soumis) Accumulation of lead in the roots of grass pea (*Lathyrus sativus*) plants triggers systemic variation in gene expression in the stems and leaves. *Environmental Pollution*
- Buchanan-Wollaston V, Ainsworth C** (1997) Leaf senescence in *Brassica napus*: cloning of senescence related genes by subtractive hybridisation. *Plant Molecular Biology* 33: 821-834
- Buchner J** (1999) Hsp90 & Co. - a holding for folding. *Trends in Biochemical Sciences* 24: 136-141
- Bukau B, Horwich AL** (1998) The Hsp70 and Hsp60 Chaperone Machines. *Cell* 92: 351-366
- Burzynski M** (1987) The influence of lead and cadmium on the absorption and distribution of potassium, calcium, magnesium and iron in cucumber seedlings. *Acta Physiologiae Plantarum* 9: 229-238
- Byers HG** (1935) Selenium occurrence in certain soils in the United States, with a discussion of the related topics. U.S. Department of Agriculture Technical Bulletin 482: 1-47

C

- Campbell CG** (1997) Grass pea. *Lathyrus sativus* L. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. In GIPGR Institute, ed. Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Rome, Italy
- Campbell CG, Mehra RB, Agrawal SK, Chen YZ, Abd El Moneim AM, Khawaja HIT, Yadov CR, Tay JU, Araya WA** (1993) Current status and future strategy in breeding grasspea (*Lathyrus sativus*). *Euphytica* 73: 167-175

- Chandra Sekhar K, Kamala CT, Chary NS, Balaram V, Garcia G** (2005) Potential of *Hemidesmus indicus* for phytoextraction of lead from industrially contaminated soils. *Chemosphere* 58: 507-514
- Chaney RL, Malik M, Li YM, Brown SL, Brewer EP, Angle JS, Baker AJM** (1997) Phytoremediation of soil metals. *Current Opinion in Biotechnology* 8: 279-284
- Chasseaud LF** (1979) The role of glutathione S-transferases in the metabolism of chemical carcinogens and other electrophilic agents. *Advance Cancer Research* 29: 175-185
- Chaudhry TM, Hayes WJ, Khan AG, Khoo CS** (1998) Phytoremediation - focusing on accumulator plants that remediate metalcontaminated soils. *Austraasian Journal of Ecotoxicology* 4: 37-51
- Chen WM, Wu CH, James EK, Chang J-S** (2007) Metal biosorption capability of *Cupriavidus taiwanensis* and its effects on heavy metal removal by nodulated *Mimosa pudica*. *Journal of Hazardous Materials* In Press, Corrected Proof
- Clemens S** (2001) Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. *Planta* 212: 475-486
- Clemens S** (2006) Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. *Biochimie* 88: 1707-1719
- Clemens S, Antosiewicz DM, Ward JM, Schachtman DP, Schroeder JI** (1998) The plant cDNA LCT1 mediates the uptake of calcium and cadmium in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95: 12043-12048
- Cobbett C, Goldsbrough P** (2002) Phytochelatins and metallothioneins: Roles in Heavy Metal Detoxification and Homeostasis. *Annual Review of Plant Biology* 53: 159-182
- Cruz de Carvalho MH** (2008) Drought stress and reactive oxygen species: Production, scavenging and signaling. *Plant Signaling & Behavior* 3: 156-165
- Cruz de Carvalho MH, Brunet J, Bazin J, Kranner I, d'Arcy-Lameta A, Zuily-Fodil Y, Contour-Ansel D** (soumis) (Homo)glutathion synthetase expression is related to drought-tolerance in cowpea. *Plant Physiology and Biochemistry*
- Cruz de Carvalho MH, d'Arcy-Lameta A, Roy-Macauley H, Gareil M, El Maarouf H, Pham-Thi A, Zuily-Fodil Y** (2001) Aspartic protease in leaves of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp): enzymatic activity, gene expression and relation to drought susceptibility. *FEBS Letters* 492: 242-246

D

- Dalton DA, Russell SA, Hanus FJ, Pascoe GA, Evans HJ** (1986) Enzymatic reactions of ascorbate and glutathione that prevent peroxide damage in soybean root nodules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83: 3811-3815

- D'Arcy-Lameta A, Ferrari-Iliou R, Contour-Ansel D, Pham-Thi AT, Zuily-Fodil Y** (2006) Isolation and characterization of four ascorbate peroxidase cDNAs responsive to water deficit in cowpea leaves. *Annals of Botany* 97: 133-140
- Dassa E, Bouige P** (2001) The ABC of ABCs: a phylogenetic and functional classification of ABC systems in living organisms. *Research in Microbiology* 152: 211-229
- Davies TGE, Coleman JOD** (2000) The *Arabidopsis thaliana* ATP-binding cassette proteins: an emerging superfamily. *Plant, Cell & Environment* 23: 431-443
- de Abreu CA, de Abreu MF, andrade JC** (1998) Distribution of lead in the soil profile evaluated by DTPA and Mehlich-3 solutions. *Bragantia* 57: 185-882
- Dean RT, Fu S, Stocker R, Davies MJ** (1997) Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochemical Journal* 324: 1-18
- del Rio LA, Sandalio LM, Altomare DA, Zilinskas BA** (2003) Mitochondrial and peroxisomal manganese superoxide dismutase: differential expression during leaf senescence. *Journal of Experimental Botany* 54: 923-933
- Delhaize E, Kataoka T, Hebb DM, White RG, Ryan PR** (2003) Genes Encoding Proteins of the Cation Diffusion Facilitator Family That Confer Manganese Tolerance. *Plant Cell* 15: 1131-1142
- Dizengremel P, Le Thiec D, Bagard M, Jolivet Y** (2008) Ozone risk assessment for plants: Central role of metabolism-dependent changes in reducing power. *Environmental Pollution* 156: 1-15
- Drame KN, Clavel D, Repellin A, Passaquet C, Zuily-Fodil Y** (2007) Water deficit induces variation in expression of stress-responsive genes in two peanut (*Arachis hypogaea* L.) cultivars with different tolerance to drought. *Plant Physiology and Biochemistry* 45: 236-243
- Durner J, Klessig DF** (1999) Nitric oxide as signal in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 2: 369-374

E

- Eapen S, D'Souza SF** (2005) Prospects of genetic engineering of plants for phytoremediation of toxic metals. *Biotechnology Advances* 23: 97-114
- Efremova SM, Margulis BA, Guzhova IV, Itskovich VB, Lauenroth S, Müller WEG, Schröder HC** (2002) Heat shock protein Hsp70 expression and DNA damage in Baikalian sponges exposed to model pollutants and wastewater from Baikalsk Pulp and Paper Plant. *Aquatic Toxicology* 57: 267-280
- Eide D, Broderius M, Fett J, Guerinot ML** (1996) A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93: 5624-5628

- El Maarouf H, Zuily-Fodil Y, Gareil M, d'Arcy-Lameta A, Thu Pham-Thi A** (1999) Enzymatic activity and gene expression under water stress of phospholipase D in two cultivars of *Vigna unguiculata* L.Walp. differing in drought tolerance. *Plant Molecular Biology* 39: 1257-1265
- Elmayan T, Tepfer M** (1994) Synthesis of a bifunctional metallothionein/ β -glucuronidase fusion protein in transgenic tobacco plants as a means of reducing leaf cadmium levels. *The Plant Journal* 6: 433-440
- Emanuelsson O, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H** (2007) Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools. 2: 953-971
- Epelde L, Hernández-Allica J, Becerril JM, Blanco F, Garbisu C** (2008) Effects of chelates on plants and soil microbial community: Comparison of EDTA and EDDS for lead phytoextraction. *Science of The Total Environment* 401: 21-28
- Epstein AL, Gussman CD, Blaylock MJ, Yermiyahu U, Huang JW, Kapulnik Y, Orser CS** (1999) EDTA and Pb-EDTA accumulation in *Brassica juncea* grown in Pb-amended soil. *Plant and Soil* V208: 87-94
- Ernst WHO** (1998) Effects of heavy metals in plants at the cellular and organismic level. *In* GSaB Markert, ed, *Ecotoxicology*. J Wiley and Sons Inc and Spectrum Akademischer Verlag, p 587–620
- Esfandiari E, Shakiba MR, Mahboob SA, Alyari H, Shahabivand S** (2008) The effect of water stress on the antioxidant content, protective enzyme activities, proline content and lipid peroxidation in wheat seedling. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 11: 1916-1922
- Eun SO, Youn HS, Lee Y** (2000) Lead disturbs microtubule organization in the root meristem of *Zea mays*. *Physiologia Plantarum* 110: 357-365
- Evangelou MWH, Ebel M, Schaeffer A** (2007) Chelate assisted phytoextraction of heavy metals from soil. Effect, mechanism, toxicity, and fate of chelating agents. *Chemosphere* 68: 989-1003

F

- Fan TWM, Colmer TD, Lane AN, Higashi RM** (1993) Determination of Metabolites by ¹H NMR and GC: Analysis for Organic Osmolytes in Crude Tissue Extracts. *Analytical Biochemistry* 214: 260-271
- Fels L, Wunsch M, Baranowski J, Norska-Borowka I, Price R, Taylor S, Patel S, De Broe M, Elsevier M, Lauwerys R, Roels H, Bernard A, Mutti A, Gelpi E, Rosello J, Stolte H** (1998) Adverse effects of chronic low level lead exposure on kidney function-a risk group study in children. *Nephrology Dialysis Transplantation* 13: 2248-2256

- Finkelstein RR, Gampala SSL, Rock CD** (2002) Abscisic acid signaling in seeds and seedlings. *Plant Cell* 14: 15-45
- Fitz WJ, Wenzel WW** (2002) Arsenic transformations in the soil-rhizosphere-plant system: fundamentals and potential application to phytoremediation. *Journal of Biotechnology* 99: 259-278
- Foyer CH, Halliwell B** (1976) The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: A proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta* 133: 21-25
- Foyer CH, Noctor G** (2003) Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiologia Plantarum* 119: 355-364
- Frendo P, Gallesi D, Turnbull R, Van de Sype G, Hérouart D, Puppo A** (1999) Localisation of glutathione and homogluthione in *Medicago truncatula* is correlated to a differential expression of genes involved in their synthesis. *The Plant Journal* 17: 215-219
- Frydman F** (2001) Folding of newly translated proteins in vivo: the role of molecular chaperones. *Annual Review of Biochemistry* 70: 603-647

G

- Gadd GM** (1990) Heavy metal accumulation by bacteria and other microorganisms. *Cellular and Molecular Life Sciences* 46: 834-840
- Gaither LA, Eide DJ** (2001) Eukaryotic zinc transporters and their regulation. *BioMetals* 14: 251-270
- Gallego SM, Benavides M, Tomaro ML** (2002) Involvement of an antioxidant defence system in the adaptive response to heavy metal ions in *Helianthus annuus* L. cells. *Plant Growth Regulation* 36: 267-273
- Garbisu C, Alkorta I** (2001) Phytoextraction: a cost-effective plant-based technology for the removal of metals from the environment. *Bioresource Technology* 77: 229-236
- Garcia JS, Gratao PL, Azevedo RA, Arruda MAZ** (2006) Metal Contamination Effects on Sunflower (*Helianthus annuus* L.) Growth and Protein Expression in Leaves During Development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 8623-8630
- Gaxiola RA, Fink GR, Hirschi KD** (2002) Genetic Manipulation of Vacuolar Proton Pumps and Transporters. *Plant Physiology* 129: 967-973
- Ghosh M, Spingh SP** (2005) A review on phytoremediation of heavy metals and utilization of its byproducts. *Applied Ecology and Environmental Research* 3: 1-18
- Gisbert C, Ros R, De Haro A, Walker DJ, Pilar Bernal M, Serrano R, Navarro-Avino J** (2003) A plant genetically modified that accumulates Pb is especially promising for phytoremediation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 303: 440-445

- Grčman H, Vodnik D, Velikonja-Bolta S, Lestan D** (2003) Ethylenediaminedissuccinate as a New Chelate for Environmentally Safe Enhanced Lead Phytoextraction. *Journal of Environmental Quality* 32: 500-506
- Grill E, Gekeler W, Winnacker E-L, Zenk HH** (1986) Homo-phytochelatins are heavy metal-binding peptides of homo-glutathione containing Fabales. *FEBS Letters* 205: 47-50
- Grotz N, Fox T, Connolly E, Park W, Guerinot M, Eide D** (1998) Identification of a family of zinc transporter genes from *Arabidopsis* that respond to zinc deficiency. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 7220-7224
- Gruenheid S, Cellier M, Vidal SM, Gros P** (1995) Identification and characterization of a second mouse Nramp gene. *Genomics* 25: 514-525
- Guerinot M** (2000) The ZIP family of metal transporters. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1465: 190-198
- Guo H, Ecker JR** (2004) The ethylene signaling pathway: new insights. *Current Opinion in Plant Biology* 7: 40-49
- Gupta M, Rai UN, Tripathi RD, Chandra P** (1995) Lead induced changes in glutathione and phytochelatin in *Hydrilla verticillata* (l. f.) Royle. *Chemosphere* 30: 2011-2020
- Gupta M, Tripathi RD, Rai UN, Haq W** (1999) Lead induced synthesis of metal binding peptides (Phytochelatins) in submerged macrophyte *Vallisneria spiralis* L. *Physiology and Molecular Biology of Plants* 5: 173-180
- Gupta AK, Dwivedi S, Sinha S, Tripathi RD, Rai UN, Singh SN** (2007) Metal accumulation and growth performance of *Phaseolus vulgaris* grown in fly ash amended soil. *Bioresource Technology* 98: 3404-3407

H

- Hall JL, Williams LE** (2003) Transition metal transporters in plants. *Journal of Experimental Botany* 54: 2601-2613
- Hamilton EW, Coleman JS** (2001) Heat-shock proteins are induced in unstressed leaves of *Nicotiana attenuata* (Solanaceae) when distant leaves are stressed. *American Journal of Botany* 88: 950-955
- Hanbury CD, Siddique KHM, Galwey NW, Cocks PS** (1999) Genotype-environment interaction for seed yield and ODAP concentration of *Lathyrus sativus* L. and *L. cicera* L. in Mediterranean-type environments. *Euphytica* 110: 45-60
- Hanbury CD, White CL, Mullan BP, Siddique KHM** (2000) A review of the potential of *Lathyrus sativus* L. and *L. cicera* L. grain for use as animal feed. *Animal Feed Science and Technology* 87: 1-27

- Hartl FU** (1996) Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* 381: 571-580
- Haussling M, Jorns CA, Lehmbecker G, Hecht-Buchholz C, Marschner H** (1988) Ion and water uptake in relation to root development of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst). *Journal of Plant Physiology* 133: 486-491
- Heikkila JJ, Papp JET, Schultz GA, Bewley JD** (1984) Induction of Heat Shock Protein Messenger RNA in Maize Mesocotyls by Water Stress, Abscisic Acid, and Wounding. *Plant Physiology* 76: 270-274
- Hell R, Bergmann L** (1988) Glutathione synthetase in tobacco suspension cultures: catalytic properties and localization. *Physiologia Plantarum* 72: 70-76
- Hell R, Bergmann L** (1990)?-glutamylcysteine synthetase in higher plants: catalytic properties and subcellular localization. *Planta* 180: 603-612
- Henry JR** (2000) An overview of the phytoremediation of lead and mercury. National Network of environmental management studies (NMES)
- Higgins CF** (1992) ABC transporters: from microorganisms to man. *Annual Review of Cell Biology* 8: 67-113
- Hirschi K** (2001) Vacuolar H⁺/Ca²⁺ transport: who's directing the traffic? *Trends in Plant Science* 6: 100-104
- Hirschi KD, Zhen RG, Cunningham KW, Rea PA, Fink GR** (1996) CAX1, an H⁺/Ca²⁺ antiporter from Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93: 8782-8786
- Hoagland DR, Arnon DI** (1938) The water-culture method for growing plants without soil. Univ. Calif. Coll. Agric. Exp. Sta. Circ. Berkeley: 347-353
- Holwerda BC, Padgett HS, Rogers JC** (1992) Proaleurain Vacuolar Targeting Is Mediated by Short Contiguous Peptide Interactions. *Plant Cell* 4: 307-318
- Hoque R, Hussain M, Kuo YH, Lambein F** (1996) Salinity tolerance and accumulation of neurotoxin and excitatory amino acids in *Lathyrus sativus*. *Bangladesh Journal of Biochemistry* 2: 15-27
- HSDB** (2000) Plomb. In NLo Medicine, ed, Hasardous Substances Data Bank,
- Huang H, Li T, Tian S, Gupta DK, Zhang X, Yang X** (2008) Role of EDTA in alleviating lead toxicity in accumulator species of *Sedum alfredii* H. *Bioresource Technology* 99: 6088-6096
- Huang JW, Cunningham SD** (1996) Lead phytoextraction: species variation in lead uptake and translocation. *New Phytologist* 134: 75-84
- Huang JW, Jianjun C, Berti WR, Cunningham SD** (1997) Phytoremediation of lead-contaminated soils: role of synthetic chelates in lead phytoextraction. *Environmental Science and Technology* 31: 800-805

Huffaker RC (1990) Proteolytic activity during senescence of plants. *New Phytologist* 116: 199-231

Hussain D, Haydon MJ, Wang Y, Wong E, Sherson SM, Young J, Camakaris J, Harper JF, Cobbett CS (2004) P-Type ATPase Heavy Metal Transporters with Roles in Essential Zinc Homeostasis in Arabidopsis. *Plant Cell* 16: 1327-1339

I

Iqbal J, Mushtaq S (1987) Effect of lead on germination, early seedling growth, soluble protein and acid phosphatase content in *Zea mays*. *Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research* 30: 853-856

Islam E, Yang X, Li T, Liu D, Jin X, Meng F (2007) Effect of Pb toxicity on root morphology, physiology and ultrastructure in the two ecotypes of *Elsholtzia argyi*. *Journal of Hazardous Materials* 147: 806-816

Iturbe-Ormaetxe I, Matamoros MA, Rubio MC, Dalton DA, Becana M (2001) The antioxidants of legume nodule mitochondria. *The American Phytopathological Society* 14: 1189-1196

IUCSID (1996) Lead. *In* EC ISPRA, ed, International Uniform Chemical Information Database,

J

Jana S, Choudhuri MA (1984) Synergistic effects of heavy metal pollutants on senescence in submerged aquatic plants. *Water, Air, and Soil Pollution* 21: 351-357

Jarvis MD, Leung DWM (2002) Chelated lead transport in *Pinus radiata*: an ultrastructural study. *Environmental and Experimental Botany* 48: 21-32

Jasinski M, Ducos E, Martinoia E, Boutry M (2003) The ATP-Binding cassette transporters: structure, function, and gene family comparison between rice and Arabidopsis. *Plant Physiology* 131: 1169-1177

Joshi CP, Zhou H, Huang X, Chiang VL (1997) Context sequences of translation initiation codon in plants. *Plant Molecular Biology* 35: 993-1001

Juste C, Chassin P, Gomez A, Linères M, Mocquot B (1995) Les micropolluants métalliques dans les boues résiduelles de stations d'épuration urbaines. *In* I- ADEME, ed, Collection Valorisation agricole des boues d'épuration. I. Kimber

K

Kabata-Pendias A, Pendias H (1992) Trace Metals in Soils and Plants, Ed Boca Raton, London

- Kaiser BN, Moreau S, Castelli J, Thomson R, Lambert A, Bogliolo S, Puppo A, Day DA** (2003) The soybean NRAMP homologue, GmDMT1, is a symbiotic divalent metal transporter capable of ferrous iron transport. *The Plant Journal* 35: 295-304
- Kamiya T, Maeshima M** (2004) Residues in Internal Repeats of the Rice Cation/H⁺ Exchanger Are Involved in the Transport and Selection of Cations. *Journal of Biological Chemistry* 279: 812-819
- Kaul AK, Islam MQ, Hamid A** (1986) Screening of Lathyrus germplasm of Bangladesh for BOAA content and some agronomic characters. *In* AKKD Combes, ed, Proceedings of the International Symposium on Lathyrus and Lathyrism. Third World Medical Research Foundation, New York, pp 130-141
- Kim D, Bovey L, Kushnir S, Noh EW, Martinoia E, Lee Y** (2006) AtATM3 Is Involved in Heavy Metal Resistance in Arabidopsis. *Plant Physiology* 140: 922-932
- Kim D, Gustin JL, Lahner B, Persans MW, Baek D, Yun D, Salt DE** (2004) The plant CDF family member TgMTP1 from the Ni/Zn hyperaccumulator *Thlaspi goesingense* acts to enhance efflux of Zn at the plasma membrane when expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Plant Journal* 39: 237-251
- Kinnersely TAM** (1993) The role of phytochelates in plant growth and productivity. *Journal of Plant Growth Regulation* 12: 207-217
- Klapheck S** (1988) Homoglutathione: isolation, quantification and occurrence in legumes. *Physiologia Plantarum* 74: 727-732
- Klapheck S, Schlunz S, Bergmann L** (1995) Synthesis of Phytochelatins and Homo-Phytochelatins in *Pisum sativum* L. *Plant Physiology* 107: 515-521
- Köhler C, Merkle T, Neuhaus G** (1999) Characterisation of a novel gene family of putative cyclic nucleotide- and calmodulin-regulated ion channels in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 18: 97-104
- Köhler C, Neuhaus G** (2000) Characterisation of calmodulin binding to cyclic nucleotide-gated ion channels from *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters* 471: 133-136
- Kopittke PM, Asher CJ, Menzies NW** (2008) Prediction of Pb speciation in concentrated and dilute nutrient solutions. *Environmental Pollution* 153: 548-554
- Korenkov V, Hirschi K, Crutchfield J, Wagner G** (2007) Enhancing tonoplast Cd/H⁺ antiport activity increases Cd, Zn, and Mn tolerance, and impacts root/shoot Cd partitioning in *Nicotiana tabacum* L. *Planta* 226: 1379-1387
- Korshunova YO, Eide D, Gregg Clark W, Lou Guerinot M, Pakrasi HB** (1999) The IRT1 protein from *Arabidopsis thaliana* is a metal transporter with a broad substrate range. *Plant Molecular Biology* 40: 37-44
- Kos B, Lestan D** (2003) Influence of a biodegradable ([S,S]-EDDS) and nondegradable (EDTA) chelate and hydrogel modified soil water sorption capacity on Pb phytoextraction and leaching. *Plant and Soil* 253: 403-411

- Kozaki A, Takeba G** (1996) Photorespiration protects C3 plants from photooxidation. *Nature* 384: 557-560
- Krämer U** (2005) MTP1 mops up excess zinc in Arabidopsis cells. *Trends in Plant Science* 10: 313-315
- Krause GH** (1994) The role of oxygen in photoinhibition of photosynthesis. *In* MP Foyer CH, ed, Causes of photooxidative stress and amelioration of defense systems in plants. CRC Press, Boca Raton, p 43–76
- Kulli B, Balmer M, Krebs R, Lothenbach B, Geiger G, Schulin R** (1999) The influence of nitrilotriacetate on heavy metal uptake of lettuce and ryegrass. *Journal of Environmental Quality* 28: 1699-1705
- Kumar PBAN, Dushenkov V, Motto H, Raskin I** (1995) Phytoextraction: The Use of Plants To Remove Heavy Metals from Soils. *Environmental Science & Technology* 29: 1232-1238
- Kunst L, Samuels AL** (2003) Biosynthesis and secretion of plant cuticular wax. *Prog Lipid Res.* 42: 51-80
- Kurepa J, Smalle JA** (2008) Structure, function and regulation of plant proteasomes. *Biochimie Cellular proteolysis* 90: 324-335

L

- Lai H, Chen Z** (2005) The EDTA effect on phytoextraction of single and combined metals-contaminated soils using rainbow pink (*Dianthus chinensis*). *Chemosphere* 60: 1062-1071
- Lamb C, Dixon R** (1997) The oxidative burst in plant disease resistance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48: 251-275
- Lee M, Lee K, Lee J, Noh EW, Lee Y** (2005) AtPDR12 Contributes to Lead Resistance in Arabidopsis. *Plant Physiology* 138: 827-836
- Leng Q, Mercier RW, Yao W, Berkowitz GA** (1999) Cloning and first functional characterization of a plant cyclic nucleotide-gated cation channel. *Plant Physiology* 121: 753-761
- Lewis S, Donkin ME, Depledge MH** (2001) Hsp70 expression in Enteromorpha intestinalis (Chlorophyta) exposed to environmental stressors. *Aquatic Toxicology* 51: 277-291
- Lewis SD, Johnson FA, Shafer JA** (1981) Effect of cysteine-25 on the ionization of histidine-159 in papain as determined by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. Evidence for a his-159--Cys-25 ion pair and its possible role in catalysis. *Biochemistry* 20: 48-51

- Lin J-L, Ho H-H, Yu C-C** (1999) Chelation therapy for patients with elevated body lead burden and progressive renal insufficiency: a randomized, controlled trial. *Annals of Internal Medicine* 130: 7-13
- Lindquist S, Craig EA** (1988) The Heat-Shock Proteins. *Annual Review of Genetics* 22: 631-677
- Liu J, Zhou Q, Sun T, Ma LQ, Wang S** (2008) Growth responses of three ornamental plants to Cd and Cd-Pb stress and their metal accumulation characteristics. *Journal of Hazardous Materials* 151: 261-267
- Lopez ML, Peralta-Videa JR, Benitez T, Gardea-Torresdey JL** (2005) Enhancement of lead uptake by alfalfa (*Medicago sativa*) using EDTA and a plant growth promoter. *Chemosphere* 61: 595-598
- López-Millán A, Ellis D, Grusak M** (2004) Identification and Characterization of Several New Members of the ZIP Family of Metal Ion Transporters in *Medicago truncatula*. *Plant Molecular Biology* 54: 583-596
- Luo C, Shen Z, Li X** (2005) Enhanced phytoextraction of Cu, Pb, Zn and Cd with EDTA and EDDS. *Chemosphere* 59: 1-11

M

- Maeshima M** (2001) TONOPLAST TRANSPORTERS: Organization and Function. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 52: 469-497
- Malecka A, Jarmuszkiewicz W, Tomaszewska B** (2001) Antioxidative defense to lead stress in subcellular compartments of pea root cells. *Acta Biochimica Polonica* 48: 687-698
- Malkowski E, Kita A, Galas W, Karcz W, Kuperberg JM** (2002) Lead distribution in corn seedlings (*Zea mays* L.) and its effect on growth and the concentrations of potassium and calcium. *Plant Growth Regulation* 37: 69-76
- Marschner H** (1995) *Mineral Nutrition of Higher Plants*, San Diego
- Marton MJ, Vazquez de Aldana CR, Qiu H, Chakraborty K, Hinnebusch AG** (1997) Evidence that GCN1 and GCN20, translational regulators of GCN4, function on elongating ribosomes in activation of eIF2 α kinase GCN2. *Mol. Cell. Biol.* 17: 4474-4489
- Matamoros MA, Baird LM, Escuredo PR, Dalton DA, Minchin FR, Iturbe-Ormaetxe I, Rubio MC, Moran JF, Gordon AJ, Becana M** (1999) Stress-Induced Legume Root Nodule Senescence. Physiological, Biochemical, and Structural Alterations. *Plant Physiology* 121: 97-112
- Matamoros MA, Dalton DA, Ramos J, Clemente MR, Rubio MC, Becana M** (2003) Biochemistry and Molecular Biology of Antioxidants in the Rhizobia-Legume Symbiosis. *Plant Physiology* 133: 499-509

- Matos AR, d'Arcy-Lameta A, Franca M, Petres S, Edelman L, Kader J-C, Zuily-Fodil Y, Pham-Thi AT** (2001) A novel patatin-like gene stimulated by drought stress encodes a galactolipid acyl hydrolase. *FEBS Letters* 491: 188-192
- Matsuoka K, Nakamura K** (1991) Propeptide of a precursor to a plant vacuolar protein required for vacuolar targeting. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88: 834-838
- McCarthy I, Romero-Puertas MC, Palma JM, Sandalio LM, Corpas FJ, Gómez M, del Río LA** (2001) Cadmium induces senescence symptoms in leaf peroxisomes of pea plants. *Plant, Cell and Environment* 24: 1065-1073
- Meers E, Ruttens A, Hopgood MJ, Samson D, Tack FMG** (2005) Comparison of EDTA and EDDS as potential soil amendments for enhanced phytoextraction of heavy metals. *Chemosphere* 58: 1011-1022
- Mehra RK, Kodati R, Abdullah R** (1995) Chain length-dependent Pb(II)-coordination in phytochelatins. *Biochemical Biophysical Research Communications* 215: 730-738
- Mehra RK, Tripathi RD** (2000) Phytochelatins and metal tolerance. *In* SBAaM Agrawal, ed, *Environmental Pollution and Plant Responses*. Lewis Publishers, USA
- Meister A** (1995) Glutathione metabolism. *Methods Enzymol.* 251: 3-13
- Mejare M, Bülow L** (2001) Metal-binding proteins and peptides in bioremediation and phytoremediation of heavy metals. *Trends in Biotechnology* 19: 67-73
- Mendoza-Cózatl DG, Moreno-Sánchez R** (2006) Control of glutathione and phytochelatin synthesis under cadmium stress. Pathway modeling for plants. *Journal of Theoretical Biology* 238: 919-936
- Meyers DER, Auchterlonie GJ, Webb RI, Wood B** (2008) Uptake and localisation of lead in the root system of *Brassica juncea*. *Environmental Pollution* 153: 323-332
- Miller G, Shulaev V, Mittler R** (2008) Reactive oxygen signaling and abiotic stress. *Physiologia Plantarum* 133: 481-489
- Mills RF, Francini A, Ferreira da Rocha PSC, Baccarini PJ, Aylett M, Krijger GC, Williams LE** (2005) The plant P1B-type ATPase AtHMA4 transports Zn and Cd and plays a role in detoxification of transition metals supplied at elevated levels. *FEBS Letters* 579: 783-791
- Mills RF, Krijger GC, Baccarini PJ, Hall JL, Williams LE** (2003) Functional expression of AtHMA4, a P_{1B}-type ATPase of the Zn/Co/Cd/Pb subclass. *The Plant Journal* 35: 164-176
- Minguzzi C, Vergnano O** (1948) Il contenuto di nichel nelli ceneri di *Alyssum bertlonii* Desv. *Atti della Societa Toscana di Science Naturali* 55: 49-77
- Mishra S, Srivastava S, Tripathi RD, Kumar R, Seth CS, Gupta DK** (2006) Lead detoxification by coontail (*Ceratophyllum demersum* L.) involves induction of

- phytochelatins and antioxidant system in response to its accumulation. *Chemosphere* 65: 1027-1039
- Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F** (2004) Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science* 9: 490-498
- Mizuno T, Usui K, Horie K, Nosaka S, Mizuno N, Obata H** (2005) Cloning of three ZIP/Nramp transporter genes from a Ni hyperaccumulator plant *Thlaspi japonicum* and their Ni²⁺-transport abilities. *Plant Physiology and Biochemistry* 43: 793-801
- Moran JF, Iturbe-Ormaetxe I, Matamoros MA, Rubio MC, Clemente MR, Brewin NJ, Becana M** (2000) Glutathione and Homoglutathione Synthetases of Legume Nodules. Cloning, Expression, and Subcellular Localization. *Plant Physiology* 124: 1381-1392
- Morel JL, Mench M, Guckert A** (1986) A measurement of Pb, Cu, Cd binding with mucilage exudates from maize (*Zea mays* L.) roots. *Biology and Fertility of Soils* 2: 29-34
- Morlot M** (1996) AGHTM Aspects analytiques du plomb dans l'environnement, Ed lavoisier TEC&DOC
- Muehlbauer FJ, Tullu A** (1997) NewCROP FactSHEET – *Lathyrus sativus*. In <http://www.hort.purdue.edu/newcrop/CropFactSheets/grasspea.html>,
- Murshed R, Lopez-Lauri F, Sallanon H** (2008) Microplate quantification of enzymes of the plant ascorbate-glutathione cycle. *Analytical Biochemistry* 383: 320-322
- Murti VVS, Seshadri TR, Venkitasubramanian TA** (1964) Neurotoxic compounds of the seeds of *lathyrus sativus*. *Phytochemistry* 3: 73-78

N

- Nagata T, Iizumi S, Satoh K, Kikuchi S** (2008) Comparative molecular biological analysis of membrane transport genes in organisms. *Plant Molecular Biology* 66: 565-585
- Nakamura K, Matsuoka K** (1993) Protein targeting to the vacuole in plant cells. *Plant Physiology* 101: 1-6
- Nelson N** (1999) Metal ion transporters and homeostasis. *The EMBO Journal* 18: 4361-4371
- Nies DH, Silver S** (1995) Ion efflux systems involved in bacterial metal resistances. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 14: 186-199
- Nieuwenhuizen NJ, Beuning LL, Sutherland PW, Sharma NN, Cooney JM, Bielecki LRF, Schröder R, MacRae EA, Atkinson RG** (2007) Identification and characterisation of acidic and novel basic forms of actinidin, the highly abundant cysteine protease from kiwifruit. *Functional Plant Biology* 34: 946-961
- Noctor G, Foyer CH** (1998) Ascorbate and glutathione: Keeping Active Oxygen Under Control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49: 249 LP - 279

O

- Obroucheva NV, Bystrova EI, Ivanov VB, Antipova OV, Seregin IV** (1998) Root growth responses to lead in young maize seedlings. *Plant and Soil* 200: 55-61
- Orozco-Cardenas ML, Narvaez-Vasquez J, Ryan CA** (2001) Hydrogen peroxide acts as a second messenger for the induction of defense genes in tomato plants in response to wounding, systemin, and methyl jasmonate. *Plant Cell* 13: 179-191
- Ortega-Villasante C, Hernandez LE, Rellan-Alvarez R, Del Campo FF, Carpena-Ruiz RO** (2007) Rapid alteration of cellular redox homeostasis upon exposure to cadmium and mercury in alfalfa seedlings. *New Phytologist* 176: 96-107
- Ouziad F, Hildebrandt U, Schmelzer E, Bothe H** (2005) Differential gene expressions in arbuscular mycorrhizal-colonized tomato grown under heavy metal stress. *Journal of Plant Physiology* 162: 634-649

P

- Paff SW, Bosilovich BE** (1995) Use of lead reclamation in secondary lead smelters for the remediation of lead contaminated sites. *Journal of Hazardous Materials* 40: 139-164
- Palma JM, Sandalio LM, Javier Corpas F, Romero-Puertas MC, McCarthy I, del Rio LA** (2002) Plant proteases, protein degradation, and oxidative stress: role of peroxisomes. *Plant Physiology and Biochemistry* 40: 521-530
- Palmiter RD, Huang L** (2004) Efflux and compartmentalization of zinc by members of the SLC30 family of solute carriers. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* 447: 744-751
- Panda GC, Das SK, Chatterjee S, Maity PB, Bandopadhyay TS, Guha AK** (2006) Adsorption of cadmium on husk of *Lathyrus sativus*: Physico-chemical study. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 50: 49-54
- Paris N, Stanley CM, Jones RL, Rogers JC** (1996) Plant Cells Contain Two Functionally Distinct Vacuolar Compartments. *Cell* 85: 563-572
- Paulsen IT, Saier JMH** (1997) A Novel Family of Ubiquitous Heavy Metal Ion Transport Proteins. *Journal of Membrane Biology* 156: 99-103
- Pena LB, Pasquini LA, Tomaro ML, Gallego SM** (2006) Proteolytic system in sunflower (*Helianthus annuus* L.) leaves under cadmium stress. *Plant Science* 171: 531-537
- Pena LB, Zawoznik MS, Tomaro ML, Gallego SM** (2008) Heavy metals effects on proteolytic system in sunflower leaves. *Chemosphere* 72: 741-746
- Pence NS, Larsen PB, Ebbs SD, Letham DLD, Lasat MM, Garvin DF, Eide DJ, Kochian LV** (2000) The molecular physiology of heavy metal transport in the Zn/Cd

- hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 97: 4956-4960
- Peuke AD, Rennenberg H** (2005) Phytoremediation. EMBO reports 6: 497-501
- Piechalak A, Tomaszewska B, Baralkiewicz D** (2003) Enhancing phytoremediative ability of *Pisum sativum* by EDTA application. Phytochemistry 64: 1239-1251
- Piechalak A, Tomaszewska B, Baralkiewicz D, Malecka A** (2002) Accumulation and detoxification of lead ions in legumes. Phytochemistry 60: 153-162
- Pilon-Smits E** (2005) Phytoremediation. Annual Review of Plant Biology 56: 15-39
- Potters G, Pasternak TP, Guisez Y, Palme KJ, Jansen MAK** (2007) Stress-induced morphogenic responses: growing out of trouble? Trends in Plant Science 12: 98-105
- Purvis AC** (1997) Role of the alternative oxidase in limiting superoxide production by plant mitochondria. Physiologia Plantarum 100: 165-170

R

- Rakwal R, Tamogami S, Agrawal GK, Iwahashi H** (2002) Octadecanoid signaling component "burst" in rice (*Oryza sativa* L.) seedling leaves upon wounding by cut and treatment with fungal elicitor chitosan. Biochemical and Biophysical Research Communications 295: 1041-1045
- Rao SLN, Adiga PR, Sarma PS** (1964) Isolation and characterization of β -oxalyl-L- α , β -diaminopropionic acid: A neurotoxin from the seeds of *Lathyrus sativus*. Biochemistry 3: 432-436
- Rashid A, Camm EL, Ekramoddoullah KM** (1994) Molecular mechanism of action of Pb and Zn²⁺ on water oxidizing complex of photosystem II. FEBS Letters 350: 296-298
- Raskin I, Ensley BD** (2000) Phytoremediation of toxic metals; using plants to clean up the environment. John Wiley & Sons, New York
- Raskin I, Smith RD, Salt DE** (1997) Phytoremediation of metals: using plants to remove pollutants from the environment. Current Opinion in Biotechnology 8: 221-226
- Rau S, Miersch J, Neumann D, Weber E, Krauss G-J** (2007) Biochemical responses of the aquatic moss *Fontinalis antipyretica* to Cd, Cu, Pb and Zn determined by chlorophyll fluorescence and protein levels. Environmental and Experimental Botany 59: 299-306
- Rausser WE** (1999) Structure and fonction of metal chelators produced by plants. Cell Biochemistry and Biophysics 31: 19-48
- Rawlings ND, Barrett AJ** (1993) Evolutionary families of peptidases. Biochem J. 290: 205–218
- Rawlings ND, Fraser FR, Yin Kok C, Kong J, Barret AJ** (2008) MEROPS: the peptidase database. Nucleic Acids Research 36: D320-D325

- Rawlings ND, Morton FR, Barrett AJ** (2006) MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res.* 34: 270-272
- Rawlings ND, Tolle DP, Barret AJ** (2004) MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Research* 32: D160–D164
- Rea P** (1999) MRP subfamily ABC transporters from plants and yeast. *Journal of Experimental Botany* 50: 895-913
- Rea PA** (2007) Plant ATP-binding cassette transporters. *Annual Review of Plant Biology* 58: 347-375
- Reddy A, Kumar S, Jyothsnakumari G, Thimmanaik S, Sudhakar C** (2005) Lead induced changes in antioxidant metabolism of horsegram (*Macrotyloma uniflorum* (Lam.) Verdc.) and bengalgram (*Cicer arietinum* L.). *Chemosphere* 60: 97-104
- Reeves RD, Baker AJM** (2000) Metal-accumulating plants. In RaBD Ensley, ed, *Phytoremediation of Toxic Metals: Using Plants to Clean-Up the Environment*. John Wiley and Sons, New York, pp 193-230
- Reichman SM** (2007) The potential use of the legume-rhizobium symbiosis for the remediation of arsenic contaminated sites. *Soil Biology and Biochemistry* 39: 2587-2593
- Rentel MC, Knight MR** (2004) Oxidative Stress-Induced Calcium Signaling in Arabidopsis. *Plant Physiology* 135: 1471-1479
- Reuveny E, Narahashi T** (1991) Potent blocking action of lead on voltage-activated calcium channels in human neuroblastoma cells SH-SY5Y. *Brain Research* 545: 312-314
- Romero-Puertas MC, Palma JM, Gomez M, Del Rio LA, Sandalio LM** (2002) Cadmium causes the oxidative modification of proteins in pea plants. *Plant, Cell & Environment* 25: 677-686
- Roy-Macauley H, Zuily-Fodil Y, Kidric M, Pham Thi AT, Vieira da Silva J** (1992) Effect of drought stress on proteolytic activities in Phaseolus and Vigna leaves from sensitive and resistant plants. *Physiologia Plantarum* 85: 90-96
- Rudakova EV, Karakis KD, E.T. S** (1988) The role of plant cell walls in the uptake and accumulation of metal ions. *Fiziol. Biochim. Kult. Rast.* 20: 3-12
- Ruley AT, Sharma NC, Sahi SV, Singh SR, Sajwan KS** (2006) Effects of lead and chelators on growth, photosynthetic activity and Pb uptake in *Sesbania drummondii* grown in soil. *Environmental Pollution (Soil and Sediment Remediation)* 144: 11-18

S

- Salt DE, Wagner GJ** (1993) Cadmium transport across tonoplast of vesicles from oat roots. Evidence for a Cd²⁺/H⁺ antiport activity. *Journal of Biological Chemistry* 268: 12297-12302

- Sanchez-Fernandez R, Davies TGE, Coleman JOD, Rea PA** (2001) The Arabidopsis thaliana ABC Protein Superfamily, a Complete Inventory. *Journal of Biological Chemistry* 276: 30231-30244
- Sandalio LM, del Río LA** (1987) Localization of superoxide dismutase in glyoxysomes from *Citrullus vulgaris*. Functional implications in cellular metabolism. *Journal of Plant Physiology* 127: 395-409
- Sarret G, Vangronsveld J, Manceau A, Musso M, D'Haen J, Menthonnex J-J, Hazemann J-L** (2001) Accumulation forms of Zn and Pb in *Phaseolus vulgaris* in the presence and absence of EDTA. *Environment science and technology* 35: 2854-2859
- Schachtman DP, Kumar R, Schroeder JI, Marsh EL** (1997) Molecular and functional characterization of a novel low-affinity cation transporter (LCT1) in higher plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94: 11079-11084
- Schuurink RC, Shartzler SF, Fath A, Jones RL** (1998) Characterization of a calmodulin-binding transporter from the plasma membrane of barley aleurone. *The Proceedings of the National Academy of Sciences (US)* 95: 1944-1949
- Seregin IV, Ivaniov VB** (1997) Histochemical investigation of cadmium and lead distribution in plants. *Fiziol. Rast.* 44: 915-921
- Seregin IV, Ivaniov VB** (2001) Physiological aspects of cadmium and lead toxic effects on higher plants. *Russian Journal of Plant Physiology* 48: 606-630
- Seregin IV, Ivanov VB** (1997) Histochemical investigation of cadmium and lead distribution in plants. *Russian Journal of Plant Physiology* 44: 791-796
- Sharma P, Dubey RS** (2005) Lead toxicity in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 17: 35-52
- Shigaki T, Pittman JK, Hirschi KD** (2003) Manganese Specificity Determinants in the Arabidopsis Metal/H⁺ Antiporter CAX2. *Journal of Biological Chemistry* 278: 6610-6617
- Shringarpure R, Grune T, Mehlhase J, Davies KJA** (2003) Ubiquitin conjugation is not required for the degradation of oxidized proteins by proteasome. *Journal of Biological Chemistry* 278: 311-318
- Simons TJB, Pocock G** (1987) Lead Enters Bovine Adrenal Medullary Cells Through Calcium Channels. *Journal of Neurochemistry* 48: 383-389
- Skipsey M, Andrews CJ, Townson JK, Jepson I, Edwards R** (1997) Substrate and thiol specificity of a stress-inducible glutathione transferase from soybean. *FEBS Letters* 409: 370-374
- Solioz M, Vulpe C** (1996) CPx-type ATPases: a class of P-type ATPases that pump heavy metals. *Trends in Biochemical Sciences* 21: 237-241

- Solomon M, Belenghi B, Delledonne M, Menachem E, Levine A** (1999) The involvement of cysteine proteases and protease inhibitor genes in the regulation of programmed cell death in plants. *Plant Cell* 11: 431-443
- Somerville C, Browse J, Jaworski JG, Ohlrogge JB** (2000) Lipids. *In* GW Buchanan BB, Jones RL, ed, *Biochemistry and molecular biology of plants*. American Society of Plant Physiologists, Rockville, p 456–527
- Stefanov K, Seizova K, Popova I, Petkov VL, Kimenov G, Popov S** (1995) Effects of lead ions on the phospholipid composition in leaves of *Zea mays* and *Phaseolus vulgaris*. *Journal of Plant Physiology* 147: 243-246
- Sterckeman T, Douay F, Proix N, Fourrier H** (2000) Vertical distribution of Cd, Pb and Zn in soils near smelters in the North of France. *Environmental Pollution* 107: 377-389
- Stintzi A, Weber H, Reymond P, Browse J, Farmer EE** (2001) Plant defense in the absence of jasmonic acid: the role of cyclopentanones. *The Proceedings of the National Academy of Sciences (US)* 98: 12837-12842
- Sunkar R, Kaplan B, Bouche N, Arazi T, Dolev D, Talke IN, Maathuis FJM, Sanders D, Bouchez D, Fromm H** (2000) Expression of a truncated tobacco NtCBP4 channel in transgenic plants and disruption of the homologous Arabidopsis CNGC1 gene confer Pb²⁺ tolerance. *The Plant Journal* 24: 533-542

T

- Tabata K, Kashiwagi S, Mori H, Ueguchi C, Mizuno T** (1997) Cloning of a cDNA encoding a putative metal-transporting P-type ATPase from *Arabidopsis thaliana*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1326: 1-6
- Taiz L, Zeiger E** (1991) Water and plant cells. *In* T Benjamin, ed, *Plant Physiology*. Cummings Publishing Company, Redwood, California, pp 61-80
- Talke IN, Blaudez D, Maathuis FJM, Sanders D** (2003) CNGCs: prime targets of plant cyclic nucleotide signalling? *Trends in Plant Science* 8: 286-293
- Tandy S, Bossart K, Mueller R, Ritschel J, Hauser L, Schulin R, Nowack B** (2004) Extraction of Heavy Metals from Soils Using Biodegradable Chelating Agents. *Environmental Science and Technology* 38: 937-944
- Tandy S, Schulin R, Nowack B** (2006) The influence of EDDS on the uptake of heavy metals in hydroponically grown sunflowers. *Chemosphere* 62: 1454-1463
- Tanhan P, Kruatrachue M, Pokethitiyook P, Chaiyarat R** (2007) Uptake and accumulation of cadmium, lead and zinc by Siam weed [*Chromolaena odorata* (L.) King & Robinson]. *Chemosphere* 68: 323-329
- Taylor MAJ, Baker KC, Briggs GS, Connerton IF, Cummings NJ, Pratt KA, Revell DF, Freedman RB, Goodenough PW** (1995) Recombinant pro-regions from papain and

- papaya proteinase IV are selective high affinity inhibitors of the mature papaya enzymes. *Protein Engineering* 8: 59-62
- Teckle Haimanot R, Feleke A, Lambein F** (2005) Is lathyrism still endemic in northern Ethiopia? – The case of Legambo Woreda (district) in the South Wollo Zone, Amhara National Regional State. *Ethiopian Journal of Health Development* 19: 230-236
- Theodoulou FL** (2000) Plant ABC transporters. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1465: 79-103
- Thomine S, Lelièvre F, Debarbieux E, Schroeder JI, Barbier-Brygoo E** (2003) AtNRAMP3, a multispecific vacuolar metal transporter involved in plant responses to iron deficiency. *The Plant Journal* 34: 685-695
- Thomine S, Wang R, Ward JM, Crawford NM, Schroeder JI** (2000) Cadmium and iron transport by members of a plant metal transporter family in Arabidopsis with homology to Nramp genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97: 4991-4996
- Turner JG, Ellis C, Devoto A** (2002) The jasmonate signal pathway. *Plant Cell* 14: 153-164
- V**
- Vallee BL, Ulmer DD** (1972) Biochemical effects of mercury, cadmium and lead. 41: 91-128
- van Assche F, Clijsters H** (1990) Effects of metal on enzyme activity in plants. *Plant, Cell & Environment* 13: 195-206
- van der Hoorn RAL** (2008) Plant Proteases: From Phenotypes to Molecular Mechanisms. *Annual Review of Plant Biology* 59: 191-223
- van der Zaal BJ, Neuteboom LW, Pinas JE, Chardonens AN, Schat H, Verkleij JAC, Hooykaas PJJ** (1999) Overexpression of a Novel Arabidopsis Gene Related to Putative Zinc-Transporter Genes from Animals Can Lead to Enhanced Zinc Resistance and Accumulation. *Plant Physiology* 119: 1047-1056
- Van Montagu M, Inze D** (1992) Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 43: 81-116
- van Vliet C, Thomas EC, Merino-Trigo A, Teasdale RD, Gleeson PA** (2003) Intracellular sorting and transport of proteins. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 83: 1-45
- Vassil AD, Kapulnik Y, Raskin I, Salt DE** (1998) The role of EDTA in lead transport and accumulation by Indian Mustard. *Plant Physiology* 117: 447-453
- Vaz Patto MC, Skiba B, Pang ECK, Ochatt SJ, Lambein F, Rubiales D** (2006) Lathyrus improvement for resistance against biotic and abiotic stresses: From classical breeding to marker assisted selection. *Euphytica* 147: 133-147

- Vazquez de Aldana CR, Wek RC, San Segundo P, Truesdell AG, Hinnebusch AG** (1994) Multicopy tRNA genes functionally suppress mutations in yeast eIF-2 kinase GCN2: Evidence for separate pathways coupling GCN4 expression to uncharged tRNA. *Mol. Cell. Biol.* 14: 7920-7932
- Verma S, Dubey RS** (2003) Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. *Plant Science* 164: 645-655
- Verrier PJ, Bird D, Burla B, Dassa E, Forestier C, Geisler M, Klein M, Kolukisaoglu Ü, Lee Y, Martinoia E, Murphy A, Rea PA, Samuels L, Schulz B, Spalding EJ, Yazaki K, Theodoulou FL** (2008) Plant ABC proteins - a unified nomenclature and updated inventory. *Trends in Plant Science* 13: 151-159
- Vidal SM, Malo D, Vogán K, Skamene E, Gros P** (1993) Natural resistance to infection with intracellular parasites: Isolation of a candidate for Bcg. *Cell* 73: 469-485
- Vierling E** (1991) The roles of heat shock proteins in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 42
- Vierstra RD** (2003) The ubiquitin/26S proteasome pathway, the complex last chapter in the life of many plant proteins. *Trends in Plant Science* 8: 135-142
- Vitale A, Raikhel NV** (1999) What do proteins need to reach different vacuoles? *Trends in Plant Science* 4: 149-155
- Vranova E, Inze D, Van Breusegem F** (2002) Signal transduction during oxidative stress. *Journal of Experimental Botany* 53: 1227-1236

W

- Walker JE, Saraste M, Runswick MJ, Gay NJ** (1982) Distantly related sequences in α - and β -subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide-binding fold. *EMBO Journal* 1: 945-951
- Walker WM, Miller JE, Hassett JJ** (1977) Effect of lead and cadmium upon the calcium, magnesium, potassium, and phosphorus concentration in young corn plants. *Soil Science* 124: 145-151
- Wang CR, Wang XR, Tian Y, Yu HX, Gu XY, Du WC, Zhou H** (2008) Oxidative stress, defense response, and early biomarkers for lead-contaminated soil in *Vicia faba* seedlings. *Environmental Toxicology and Chemistry* 27: 970-977
- Wang W, Vinocur B, Shoseyov O, Altman A** (2004) Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends in Plant Science* 9: 244-252
- Wei W, Chai T, Zhang Y, Han L, Xu J, Guan Z** (2008) The *Thlaspi caerulescens* NRAMP homologue TcNRAMP3 is capable of divalent cation transport. *Molecular Biotechnology*

- Weil J-H** (1998) Biosynthèse et transport des protéines. *In* Masson, ed, *Biochimie générale*, Paris, pp 395-432
- Wierzbicka M** (1989) Disturbances in cytokinesis caused by inorganic lead. *Environmental and Experimental Botany* 29: 123-133
- Wierzbicka M, Antosiewicz D** (1993) How lead can easily enter the food chain - a study of plant roots. *Science of The Total Environment* 1993: 423-429
- Wilkins DA** (1957) A Technique for the Measurement of Lead Tolerance in Plants. *Nature* 180: 37-38
- Williams LE, Pittman JK, Hall JL** (2000) Emerging mechanisms for heavy metal transport in plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1465: 104-126
- Wojas S, Ruszczyńska A, Bulska E, Wojciechowski M, Antosiewicz DM** (2007) Ca²⁺-dependent plant response to Pb²⁺ is regulated by LCT1. *Environmental Pollution* 147: 584-592
- Wozny A, Jerczyńska E** (1991) The effect of Lead on early stages of *Phaseolus vulgaris* L. growth in vitro conditions. *Biologia Plantarum* 33: 32-39
- Wu J, Hsu FC, Cunningham SD** (1999) Chelate-assisted Pb phytoextraction: Pb availability, uptake and translocation constraints. *Environmental Science and Technology* 33: 1898-1904
- Wu LH, Luo YM, Xing XR, Christie P** (2004) EDTA-enhanced phytoremediation of heavy metal contaminated soil with Indian mustard and associated potential leaching risk. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 102: 307-318

Y

- Yang X, Feng Y, He Z, Stoffella PJ** (2005) Molecular mechanisms of heavy metal hyperaccumulation and phytoremediation. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 18: 339-353
- Ye ZH, Baker AJM, Wong MH, Willis AJ** (1997) Zinc, lead and cadmium tolerance uptake and accumulation by *Typha latifolia*. *New Phytol.* 136: 469-480
- Yeagan R, Maiti I, Nielsen M, Hunt A, Wagner G** (1992) Tissue partitioning of cadmium in transgenic tobacco seedlings and field grown plants expressing the mouse metallothionein I gene. *Transgenic Research* 1: 261-267

Z

- Zhao H, Eide D** (1996) The yeast ZRT1 gene encodes the zinc transporter protein of a high-affinity uptake system induced by zinc limitation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93: 2454-2458

Zhao H, Eide DJ (1996) The ZRT2 Gene Encodes the Low Affinity Zinc Transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* 271: 23203-23210

Zhengwei Z, Fang W, Lee HY, Yang Z (2005) Responses of *Azorhizobium caulinodans* to cadmium stress. *FEMS Microbiology Ecology* 54: 455-461

Zuily-Fodil Y, Vasquez Tello A, Vieira da Silva J (1990) Effect of water deficit on cell permeability and on chloroplast integrity. *Bulletin de la Société Botanique de France* 137:115-123

Zuily-Fodil Y, Vasquez Tello A, Vieira da Silva J (1990) Effect of water deficit on cell permeability and on chloroplast integrity. *Bulletin de la Société Botanique de France* 137: 115-123

ANNEXES

Annexe 1 :

Article soumis dans PPB

Running title:(Homogluthathione) synthetase and drought in cowpea

(Homo)gluthathione synthetase expression is related to drought-tolerance in cowpea

Maria Helena Cruz de Carvalho^a, Judicaëlle Brunet^a, Jérémie Bazin^b, Ilse Kranner^c, Agnès d'Arcy-Lameta^a, Yasmine Zuily-Fodil^a and Dominique Contour-Ansel^{a*}

^a *Laboratoire d'Ecophysiologie Moléculaire, UMR-IRD 137, Université Paris Est-Paris 12, 61 avenue du Général de Gaulle, F- 94010 Créteil cedex*

^b *EA 2388 Physiologie des Semences, Université Pierre-et-Marie-Curie-Paris 6, Le Raphaël, site d'Ivry, boîte 152, 4 place Jussieu, F-75005 Paris*

^c *Seed Conservation Department, Royal Botanic gardens, Kew, Wakehurst Place, West Sussex RH17 6TN, UK*

*Corresponding author; e-mail address: ansel@univ-paris12.fr; Tel. 33 (0) 145171468, Fax 33 (0) 145171617

The nucleotide sequence data is registered in GenBank under the accession number EU164853.

Abstract

Glutathione (GSH) is an abundant metabolite and a major antioxidant in plant cells. However, in Leguminous plants homoglutathione (hGSH) replaces partially (or completely) GSH. Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) has been up to now considered to be a non hGSH producing leguminous species. Here we report on the cloning of a cDNA coding for a putative homoglutathione synthetase enzyme (hGSHS; EC 6.3.2.23) in cowpea leaves extracts. Expression analysis showed an up-regulation of this enzyme during an imposed progressive drought stress that could be directly related to the drought tolerance of the cowpea cultivar. However, HPLC quantification of cowpea leaf low molecular weight thiols confirmed the previous findings that cowpea is, unlike other legumes, essentially a GSH producing plant since no hGSH was detected in the leaves. The sequencing of an homoglutathione synthetase cDNA in *Vigna* leaves, the differential expression of the transcripts under drought stress and the detection of GSH instead of hGSH is discussed.

Key words: Reactive oxygen species; drought tolerance; homoglutathione synthetase; gene expression; *Vigna unguiculata*.

Abbreviations- EDTA, ethylenediamine-tetraacetic acid; GR, glutathione reductase; GSH, Glutathione; GSHS, glutathione synthetase; Hepes, hydroxyethyl-piperazinyl-ethane-sulfonic acid sodium salt; hGR, homoglutathione reductase; hGSH, homoglutathione; hGSHS, homoglutathione synthetase; ROS, reactive oxygen species; RT-PCR, reverse transcription-polymerase chain reaction.

1. Introduction

Glutathione (GSH, γ -glutamyl-cysteinyl-glycine) is an abundant low molecular weight thiol present in most eukaryotic organisms, where it performs multiple functions [1, 2]. These include storage and transport of sulfur [3] and control of the redox-status. GSH is a strong reductant that can directly scavenge toxic reactive oxygen species (ROS) [4]. GSH is also involved in detoxification of xenobiotics [5] and sequestration of heavy metals as precursor of phytochelatins [6]. GSH is also a substrate for glutathione reductase and glutathione peroxidase, two ROS scavenging enzymes.

ROS are involved in nearly all effects of environmental stresses to plants [7] particularly drought stress. Rather than being simple deleterious side effects of drought stress, ROS are currently well established as second messengers triggering adaptation responses to the changing environment [8]. H_2O_2 is the candidate ROS most likely to act as second messenger and the cellular antioxidant system plays a key role in the regulation of this signal.

In Leguminous plants, homoglutathione (hGSH, γ Glutamyl-cysteinyl-alanine) replaces either completely or in part GSH, as shown by Matamoros *et al.* [9]. For example, hGSH is the most abundant tripeptide in nodules of *Glycine max* [10], *Pisum sativum* and *Phaseolus vulgaris* [9]. GSH and hGSH appear to be essential for the proper development of the root nodules resulting from the symbiotic interaction [11]. *Lotus japonicus* has also been shown to be mainly an hGSH-producing legume [12], where the thiol was detected in the nodules, roots and very abundantly in the leaves. Many of the roles ascribed to GSH are also performed by hGSH [13], particularly the control of the cellular redox-status and ROS scavenging [14]. The synthesis of GSH and hGSH proceeds through two ATP-dependent steps which are similar in plants, micro-organisms and animals. The first reaction common to both tripeptides is catalysed by γ -glutamylcysteine synthetase, the second step is catalysed by specific enzymes, glutathione synthetase (GSHS; EC 6.3.2.3) for glutathione and homoglutathione synthetase (hGSHS; EC 6.3.2.23) for homoglutathione. It is now obvious that separate genes encode GSHS and hGSHS, the divergence in specificity coming from gene duplication between Fabales, Solanales and Brassicales in the course of evolution. Furthermore, hGSH has been exclusively detected in Fabales [13].

Considering the role of GSH and/or hGSH as pool of reduced sulfur and antioxidative molecules, we focussed on the synthesis pathway of these molecules. To better understand the contribution of these tripeptides in scavenging ROS in *Vigna* leaves, we attempted the

isolation of cDNAs encoding GSHS and hGSHS. Since hGSHS was the only form detected in our plant material, the cDNA corresponding to hGSHS was isolated and characterized and the gene expression level quantified during a progressive drought stress and a desiccation treatment. In order to detect the presence of hGSH and/or GSH in cowpea leaves, an HPLC quantification of the leaf thiols was carried out in control and drought-stressed plants.

Experimentation was carried out on cowpea (*Vigna unguiculata*) plants using our previous developed plant system [15,16,17] consisting of two cultivars differing in their degree of resistance to drought.

2. Materials and methods

2.1. Plant culture and sample treatments

Two *Vigna unguiculata* (L.) Walp (Vu) cultivars, one tolerant to drought (“EPACE-1”) and the other susceptible (“1183”) were grown in greenhouse conditions as described by d’Arcy-Lameta et al. [15]. Progressive drought stress was applied by withholding irrigation on 5-weeks-old plants. Leaf water potential was measured daily after 4 light hours with a pressure bomb (PMS instrument, Corvallis, USA) [18]. The second and the third well-developed leaves from the top were harvested when plants reached leaf water potentials of $\Psi_w = -1.0 \pm 0.1$ MPa (S1 plants) - mild water-stress; $\Psi_w = -1.5 \pm 0.2$ MPa (S2 plants) - moderate water-stress; and $\Psi_w = -2.0 \pm 0.2$ MPa (S3 plants) - severe water-stress (drought treatments). Detached leaves were left to dry (desiccation treatment) at 24°C under dim light for 30 min, 2 hours, 5 hours and harvested. Leaves from control plants ($\Psi_w = -0.5 \pm 0.1$ MPa) were harvested at the beginning of the drought or desiccation treatments. All the leaves sampled were flash frozen in liquid nitrogen and kept at -80°C until used.

2.2. HPLC quantification of leaf thiols

Extraction and determination of GSH and GSSG were carried out on leaves from control, S1, S2 and S3 drought-stressed plants, according to the method of Kranner and Grill [19]. For each replicate, approximately 25 mg lyophilised material were ground using liquid nitrogen and extracted with 4 ml of 0.1 M HCl on ice. Extracts were centrifuged for 20 min at 20 000 g at 4 °C. One part of the supernatant was used to determine total glutathione content (i.e. the sum of GSH + GSSG) and the other for the determination of GSSG after blockage of GSH with N-ethylmaleimide (NEM).

For determination of total glutathione, 120 μ l of the supernatant were mixed with 180 μ l of 200 mM 2-5N-cyclohexyl(amino)ethane-sulphonic acid (CHES) buffer (pH 9.3) and 30 μ l of dithiothreitol (DTT) and incubated for 60 min at room temperature to allow reduction of GSSG. The extract was then labelled with 20 μ l of monobromobimane (mBBBr) for 15 min at room temperature in the dark. The extract was then acidified with 250 μ l of 0.25 % MSA and centrifuged for 45 min at 20 000 /g/ at 4 °C. The supernatant was used for reversed-phase HPLC (Jasco) analysis. Glutathione was separated from other low-molecular-weight thiols on

a RP-18 column and detected with a fluorescence detector (excitation: 380 nm, emission: 480 nm). The amounts of GSH in extracts were calculated using a calibration curve (n = 4, 5 replicates).

For determination of GSSG, 400 μ l of the supernatant were mixed with 30 μ l of 50 mM N-ethylmaleimide (NEM) to block free thiols and 600 μ l of 200 mM CHES (pH 9.3) buffer immediately after extraction. After 15 min incubation at room temperature, excess NEM was removed by extracting five times with equal volumes of toluene. Thereafter, 30 μ l of 3 mM DTT were added to a 300 μ l aliquot of the NEM treated extract and left for 60 min at room temperature to reduce GSSG. These aliquots were labelled with mBBr, acidified with 0.25 % MSA, centrifuged and analyzed as described above.

2.3. Total RNA isolation

Frozen leaf material was ground with a mortar and pestle in liquid nitrogen and about 100 mg fresh material were used for total RNA extraction, using RNEasy Plant Minikit (Qiagen, France) according to the manufacturer's instructions. Total RNA were quantified with a Nanodrop ND-1000 spectrophotometer (Starlab, USA) at 260 nm.

2.4. Reverse-transcription-PCR amplification (RT-PCR) and cloning of (h)GSHS cDNA fragments

Leguminous plant homogluthathione synthetase protein sequences collected from GenBankTM (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) were aligned using the CLUSTALW program (<http://pbil.ibcp.fr/hlm/index.php>) [20]. Oligonucleotides were designed from consensus regions and used as primers in RT-PCR amplification of cowpea hGSHS cDNA fragments.

The primers were: 5'-CAA ATA GAG ATG AAC ACT ATT -3' (forward) and 5'-GAC ACC ATT CAG TAG GAA AAG C-3' (reverse). RT-PCR was performed on control 1183 leaf total RNAs. The RT-PCR reaction contained 100 ng total RNA, 15 pmol each oligonucleotide, dNTP mix (10 mM each), 1 unit of a mix of reverse transcriptase and Taq Pol enzymes (One step Reverse Transcription-PCR system, Qiagen, France) and the manufacturer's buffer in a total volume of 25 μ l. RT-PCR was performed in a thermal cycler (Mastercycler Gradient, Eppendorf AG, Germany), with a first step (50°C for 30 min, 95°C for 15 min) followed by 35 cycles (denaturation step at 95°C for 30 s, annealing at 50.7°C 50

s, extension 72°C, 80s). After the last cycle, a final extension was carried out for 7 min at 72°C. Amplified hGSHS cDNA fragments were visualized after separation on 1% (w/v) agarose gels, using a UV light transilluminator (Snapshot, Syngene, France) and purified (Wizard PCR Prep, Promega, France).

Cloning was performed using the pGEM-T Easy Vector Plasmid System I (Promega, France) following the manufacturer's instructions and used to transform *E. coli* strain GT869 competent cells by heat shock. After selection of the recombinant bacteria, plasmid DNA was isolated using Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System kit (Promega, France). Sequencing was performed by Genoscreen (Lille, France).

In parallel, several primer pairs were designed from glutathione synthetase and homogluthathione synthetase consensus protein sequences from some Leguminous plants and used in RT-PCR amplification in order to detect potential cowpea GSHS sequences (Table 1).

2.5. Rapid amplification of 5' and 3' cDNA ends (RACE)

PCR amplification of the 5' and 3' regions of hGSHS cDNA was achieved by the use of the 5'/3' Race Kit (Roche Diagnostics, Meylan, France), "1183" total RNA as template and following the manufacturer's instructions. The complete nucleotide sequence of the *Vigna unguiculata* hGSHS (*VuhGSHS*) data is registered in GenBank under the accession number EU164853.

2.6. Phylogenetic and molecular evolutionary analysis

Nucleotide sequence of the cloned *VuhGSHS* was translated into protein sequence using the ExPASy translate tool (<http://us.expasy.org/tools/dna.html>). Multiple sequence alignment with other plant hGSHS and GSHS protein sequences collected from public databases was performed with the CUSTALW program with default parameters (<http://pbil.ibcp.fr/htm/index.php>). Phylogenetic and molecular evolutionary analyses were conducted using MEGA version 4 [21]. An unrooted Neighbor-joining tree was performed with the aligned sequences and in order to assess the statistical significance of each internal branch, 1000 bootstrap pseudoreplicates of the protein alignments were generated using the seqboot implementation of the MEGA package.

2.7. *hGSHS* expression analysis

Homoglutathione synthetase expression analysis was carried out by RT-PCR reactions, using the One-step RT-PCR kit (Qiagen, France). Total RNA extracts from control, water-deficit and desiccation conditions were used as templates. The forward primer was taken in the 3' end of the coding sequence and possessed the Leucine and Proline signs of the homoglutathione synthetase, the reverse primer was chosen in the 3' non coding sequence. These primers: 5'-GAA AGT GGC TAT ATG GTG CG-3' (forward) and 5'-GAC ACC ATT CAG TAG GAA AAG C-3' (reverse) were used to amplify cDNA fragments for hGSHS (240 bp) with the same program as above (except annealing at 57°C 30s, extension 72°C, 45 s, 30 cycles instead of 35). In order to evaluate the amount of template RNA in each RT-PCR reaction, fragments of cowpea S19 gene coding for a ribosomal protein were PCR amplified. Amplification products were visualized on 1.2% agarose (w/v) gels, using a UV light transilluminator (Snapshot, Syngene, France). Densitometric evaluation of DNA bands was performed with the Imager 1D/2D software (Appligene, Strasbourg, France). As amplifications were not in the plateau phase, semi-quantitative estimations of transcript levels were acceptable.

3. Results

3.1. Thiol analysis

Following HPLC analysis of cowpea thiols from control and drought-stressed leaves, only GSH and GSSG could be detected in samples (Fig. 1). The amount of GSH in control leaves (nmol g⁻¹ DW) was found to decrease slightly under S1-mild water stress with a significant decrease under S2-moderate water stress but highly increased in S3-severe drought stressed leaves to reach a value above that of control (Fig. 1a). The amount of GSSG versus GSH (as %) (Fig. 1b) was found minimal in control plant leaves (40%) then increased to 45% in S1-mild stress and further 55% in S2-moderate stress then returned to the level of S1-mild stress in S3-severe water stressed leaves which could translate the consumption of GSH in the first stages of water stress. The glutathione half-cell reduction potential ($E_{GSSG/2GSH}$) was calculated from the Nernst equation according to Schafer and Buettner [22]. This allows a quantification of the glutathione redox state which is a marker of plant stress. Similar values (Fig. 1c) were found for control leaves and S3 water-stressed leaves (about -198 mV), then the value decreased in S1 but overall in S2 water-stressed leaves which is a sign of viability loss [23].

For comparison, the distribution of GSH and hGSH (nmol g⁻¹ FW) in several *Phaseolaea* is given in Table 2: the mean value for GSH content in control leaf was 769±73 nmol g⁻¹ DW corresponding to 138±13 nmol g⁻¹ FW (for a 82% RWC).

3.2. Isolation and characterization of (h)GSHS cDNA from cowpea

Consensus regions were identified by aligning the five recorded hGSHS sequences from GenBank: *Glycine max*, *Phaseolus vulgaris*, *Pisum sativum*, *Medicago truncatula* and *Lotus japonicus* (accession numbers AJ272035, AF258320, AF258319, AAD29849 and AY219337 respectively). A final 1751-bp cDNA was obtained from cowpea, its open frame (ORF) starting with an ATG codon at 7 and interrupted by a stop codon at position 1489 (GenBank accession number EU164853). A 6-bp 5'-UTR and a 246-bp 3'-UTR flanked the ORF. The deduced protein had 496 amino acids residues with a calculated molecular weight of 55 kDa (http://bioinfo.hku.hk/services/analyseq/cgi-bin/mwcalc_in.pl). At the amino acid level, the putative protein shared 88.6 %, 94.0%, 73.6%, 64.7% and 69.4%, identity with *G. max* [24],

P. vulgaris and *P. sativum* [4] , *M. truncatula* [13] and *L. japonicus* [12] hGSHS, respectively (Fig. 2). Amino acids involved in the catalytic site were referenced as in Frendo *et al.* [13]. No cowpea GSHS sequences could be detected in multiple RT-PCR amplification tests with specific primers (Table 1). The homogluthathione synthetase nature of our cloned cDNA is also supported by the fact that the amino acids Leucine-484 and Proline-485 (Fig. 2, in bold) present in *P. Sativum*, *G. max*, *P. vulgaris* putative hGSHS as noted by [13], are also present in *V. unguiculata* hGSHS. These replace the two Alanine residues which occur in 484 and 485 positions in plant GSHS sequences [13]. From the protein sequence analysis (<http://pfam.sanger.ac.uk>), we could detected the eukaryotic glutathione synthase, ATP binding domain. The analysis revealed an extension domain from position 28 to position 498 (Fig. 3).

3.3. Phylogenetic analysis

The putative amino acid sequence of hGSHS from cowpea (VuhGSHS) together with other plant hGSHS and GSHS collected from GenBank were used to generate an unrooted Neighbor-joining phylogenetic tree. Phylogenetic analyses showed that the sequences were grouped in two clusters: legumes and other plants (Fig. 4). Both clusters subdivided in two others: the legume cluster subdivided into hGSHS and GSHS and the other plants cluster subdivided into monocotyledoneous GSHS and dicotyledoneous GSHS. The bootstrap values for all the subgroups were very high suggesting a similar origin of the genes.

3.4. Expression of the hGSHS gene in response to progressive drought stress and rapid desiccation

The choice of a forward primer possessing the Leucine and Proline signs of the homogluthathione synthetase for the analysis of gene expression, comforts our assessments. As shown in Fig. 5 (A), progressive drought induced an up-regulation of hGSHS transcripts, in the drought-resistant “EPACE-1” only, as soon as S1 (mild drought-stress) was reached. The transcript level remained high in S2 (moderate drought-stress) then a down-regulation occurred for S3 (severe drought-stress), where the steady-state level returned to that of the control. In “1183” leaves, the expression levels remained low, throughout the progressive drought stress, equal or lower than the control level. Regarding the desiccation experiments,

leaves from “EPACE-1” showed an up-regulation of hGSHS expression for respectively 30 minutes (D1) and 2 hours air-desiccation (D2), then a down-regulation occurred (D3), similar to the results observed in case of progressive drought. In 1183 leaves, an up-regulation occurred only after 2 hours air-drying (D2), followed by a down-regulation after 5h-desiccation (D3). Relative mRNA levels (Fig. 5 B) showed similar expression profiles for “EPACE-1” as well as for “1183” leaves. Moreover, progressive drought and desiccation appeared to induce the same pattern of hGSHS expression in “EPACE-1” leaves.

4. Discussion

Cowpea belongs to the Fabales tribe in which hGSH replaces completely or partially GSH [10, 9]. hGSH was shown to be the major storage form of reduced sulfur in *Vigna radiata* [3]. Soybean, common bean and mungbean were shown to contain exclusively hGSH in leaves, roots and seeds [10, 9]. Homoglutathione was also the dominant thiol in *Vigna angularis* roots [25] and in *Lotus japonicus* leaves and roots [12]. In fact, previous works have shown that leguminous plants contain exclusively GSH or hGSH in their leaves [9]. Nevertheless, all reports gathered, hGSH is clearly the dominant thiol in the Fabales family.

The thiol synthetase enzyme has evolved to preferentially incorporate β -alanine, becoming a homoglutathione synthetase. Skipsey *et al.* [24] showed that the recombinant enzyme in soybean displayed a 6-fold higher specific activity with β -alanine as substrate, compared with glycine. This could be due to the acyl acceptor availability in cytosol: β -alanine in soybean and common bean, glycine in maize and wheat for example [24]. Oven *et al.* [25] and Ramos *et al.* [26] pointed to the presence of hGSHS instead of GSHS in leaves of *Vigna angularis* considering the formation of homo-phytochelatins (hPCs) instead of phytochelatins (PCs) in response to cadmium stress. This was in contradiction with the reports of Inouhe *et al.* [27] who assumed that *V. angularis* contained GSH and not hGSH. However, it should be noted that some plants of the same tribe produce both PCs and hPCs when exposed to cadmium stress [28].

For the reasons mentioned above, it was not surprising to detect hGSHS instead of GSHS in the cowpea leaves. However, the thiol analysis contradicts this result since only GSH and GSSG were detected in cowpea leaves, in accordance with the findings of Matamoros *et al.* [9]. Surprisingly, in multiple RT-PCR assays using specific primer pairs (Table 1), no GSHS was detected in the cowpea leaves. However, Matamoros *et al.* [9] reported a GSHS enzyme activity in cowpea leaves but not an hGSHS activity. Nevertheless and to our knowledge, the literature has never mentioned the isolation of a glutathione synthetase gene nor of a homoglutathione synthetase gene in cowpea leaves, roots or nodules. This opposes cowpea to other *Phaseoleae* in which both genes have been cloned: for example, *Medicago sativa* [13] and *Lotus japonicus* [12]. Our experiments describe for the first time the cloning and sequencing of a cDNA coding for a putative homoglutathione synthetase enzyme in cowpea leaves, with the Leucine and Proline signs in the 3' end of the coding sequence (Figs. 2 and 3). The analysis of the open reading frame of the *VuhGSHS* cDNA revealed one domain

(GSH_synth_ATP binding domain) (Fig. 3a). Looking at the gene expression (Fig. 5), the relative transcript level in the drought-susceptible cultivar (“1183”) remained 3 to 6 times lower than that of the resistant cultivar whatever the treatment applied. The observed enhanced hGSHS expression in “EPACE-1” leaves under progressive drought or desiccation could translate an efficient antioxidant mechanism acting in the tolerant cowpea cultivar. The “1183” cultivar did not respond to the water deficit, except after 2h desiccation, which could denote a lack of capacity of this cultivar to face a drought situation. In fact it can be suggested that the drought resistant cultivar has a tighter regulation of the cellular redox status under drought and desiccation than the susceptible one. Contrary to the results of Naya *et al.* [29], showing a down-regulation of the *hGSHS* gene in alfalfa nodules in response to a moderate drought stress, an up-regulation of this gene was observed in cowpea “EPACE-1” leaves after a mild and a moderate drought stress. This could be due to the organ concerned (nodules in alfalfa, leaves in cowpea). As mentioned by Frendo *et al.* [13], Leucine and Proline residues play a major role in the recognition of β -alanine as substrate leading to the production of hGSH whereas the two Alanine residues allow the recognition of Glycine as substrate thus producing GSH. The occurrence of GSH instead of hGSH in cowpea opposes the plant to all other listed *Phaseoleae* and questions on the presence of the homoglutathione synthetase protein in the samples. Nevertheless, by the use of a forward primer including the Leucine and Proline signs of the homoglutathione synthetase in the RT-PCR experiments, we clearly detected an hGSHS specific gene expression in response to drought in cowpea leaves. Two species were shown to possess the *hGSHS* and *GSHS* gene sequences in tandem in the same orientation, the first preceding the second in the reading frame, *Medicago truncatula* [13] and *Lotus japonicus* [12]. The authors argued for a gene duplication occurring after the divergence between Fabales, Solanales and Brassicales which could explain the occurrence of highly conserved sequences between the two genes. The presence of hGSHS in cowpea leaves but not GSHS and of GSH instead of hGSH questions on the functionality of the gene. Interestingly, Matamoros *et al.* [12] reported on the occurrence of GSHS transcripts but not the corresponding enzymatic activity in *Lotus japonicus* leaves and suggested posttranscriptional regulation. This could agree with our findings of a hGSHS sequence and transcripts and absence of hGSH product but not with the occurrence of GSH. As shown by Skipsey *et al.* [24], plant GSs are able to produce a diverse range of glutathione homologues depending on the availability of the acyl acceptor: for example, in Soybean where hGSHS was detected but not GSHS [24], β -alanine is preferentially used as substrate but glycine can also

be used, the *hGSHS* gene thus producing GSH instead of hGSH. We attempted to estimate the glutathione redox state ($E_{GSSG/2GSH}$) as universal marker of viability [22]. The results showed more positive values in S2 and S3-water-stressed leaves versus control and S3 leaves, which indicated a loss of viability. But the values never exceeded -160 mV, which is a general value of lethal plant stress [22]. Two points must be cleared at the light of our results. First, the identification of *hGSHS* as unique form of *GS* gene in *Vigna unguiculata* (as for *Glycine max* and *Phaseolus vulgaris* plants) instead of a tandem structure as shown for *Medicago truncatula* and *Lotus japonicus* has to be confirmed. Second, the presence of GSH instead of hGSH leads to several hypotheses: does the cowpea *hGSHS* gene produce GSH instead of hGSH due to the presence of glycine but not β -alanine in cowpea leaves? Does leaf GSH come from other parts of the plant as it is a predominant form of reduced sulphur which is transported long distances in the phloem but also in the xylem [31]? The recognition of glycine and β -alanine as substrates is the fact of Leucine/Proline residues for hGSHS and Alanine/Alanine residues for GSHS. Nevertheless, other amino acids can be involved in the Gly/ β -Ala specificity as was shown by site-directed mutagenesis experiments on *hGSHS* *Medicago truncatula* gene [13].

We assess that our results are in accordance with the reports on other Fabales. Concerning the occurrence of an *hGSHS* gene, which expression level was clearly related to the degree of drought stress applied to the *Vigna* plants. We could state that the enhanced expression observed for *hGSHS* is directly correlated to the drought tolerance of the cowpea cultivar. The modulation of the cellular redox status under drought stress in cowpea leaves remain hypothetical, based on the availability of GSH but not hGSH in these organs. We have provided direct evidence on the expression of the hGSHS signature under drought stress. Nevertheless, the precise activity of the transcripts remains to be solved.

Acknowledgements

The authors would like to thank Virginie Roy for the help on the phylogenetical analysis and the constructive remarks and Alexandre Livet for technical assistance.

References

- [1] G. Noctor, L. Gomez , H. Vanacker , C.H. Foyer, Interactions between biosynthesis, compartmentation and transport in the control of glutathione homeostasis and signalling *J. Exp. Bot.* 53 (2002) 1283-1304.
- [2] S. Maughan , C.H. Foyer, Engineering and genetic approaches to modulating the glutathione network in plants, *Physiol. Plant.* 126 (2006) 382-397.
- [3] P.K. Macnicol, L. Bergmann, A role for homogluthione in organic sulfur transport to the developing mung bean seed, *Plant. Sci.* 36 (1984) 219-223.
- [4] J.F. Moran, I. Iturbe-Ormaetxe , M.A. Matamoros, M.C. Rubio, M.R. Clemente, N.J. Brewin, M. Becana, Glutathione and homogluthione synthetases of legume nodules. Cloning, expression and subcellular localization, *Plant. Physiol.* 124 (2000) 1381-1392.
- [5] M.J. May, T. Vernoux , C. Leaver , M. Van Montagu , D. Inzé, Glutathione homeostasis in plants: implications for environmental sensing and plant development, *J. Exp. Bot.* 49 (1998) 649-667.
- [6] G. Noctor , M.C.M. Arisi, L. Jouanin , K.J. Kunert, H. Rennenberg , C.H. Foyer, Glutathione: biosynthesis, metabolism and relationship to stress tolerance explored in transformed plants, *J. Exp. Bot.* 49 (1998) 623-647.
- [7] L.J. De Kok, I. Stulen, Role of glutathione in plants under oxidative stress, In: L.J. De Kok, I. Stulen , H. Rennenberg , C. Brunold , W.E. Rauser (eds), *Sulfur Nutrition and Sulfur Assimilation on Higher Plants*, SPB Acad. Publishing Netherlands (1993) 125-134.
- [8] M.H. Cruz de Carvalho, Drought stress and reactive oxygen species: production, scavenging and signalling, *Plant. Signal. Behav.* 3 (2008) 156 – 165.
- [9] M.A. Matamoros, J.F. Moran, I. Iturbe-Ormaetxe , M.C. Rubio, M. Becana, Glutathione and homogluthione synthesis in legume root nodules, *Plant Physiol.* 121 (1999) 879-888.
- [10] S. Klapheck, Homogluthione: isolation, quantification and occurrence in legumes, *Physiol. Plant.* 74 (1988) 727-732.
- [11] P. Frendo , J. Harrison , C. Norman , M.J. Hernandez Jimenez, G. Van de Sype , A. Gilabert , A. Puppo, Glutathione and homogluthione play a critical role in the

- nodulation process of *Medicago truncatula*, Mol. Plant-Microbe Inter. 18 (2005) 254-259.
- [12] M.A. Matamoros, M.R. Clemente, S. Sato , E. Asamizu , S. Tabata , J. Ramos , J.F. Moran, J. Stiller , P.M. Gresshoff, M. Becana, Molecular analysis of the pathway for the synthesis of thiol tripeptides in the model legume *Lotus japonicus*, Amer. Phytopathol. Soc. 16 (2003) 1039-1046.
- [13] P. Frendo, M.J.H. Jiménez, C. Mathieu , L. Duret , D. Gallesi , G. Van de Sype, D. Hérouart , A. Puppo, A *Medicago truncatula* homoglutathione synthetase is derived from glutathione synthetase by gene duplication, Plant Physiol. 126 (2001) 1706-1715.
- [14] D.A. Dalton, S.A. Russell, F.J. Hanus, G.A. Pascoe, H.J. Evans, Enzymatic reactions of ascorbate and glutathione that prevent peroxide damage in soybean root nodules, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 83 (1986) 3811-3815.
- [15] A. d'Arcy-Lameta, R. Ferrari-Iliou, D. Contour-Ansel, A.T. Pham-Thi, Y. Zuily-Fodil, Isolation and characterization of four ascorbate peroxidase cDNA responsive to water deficit in Cowpea leaves, Ann. Bot. 97 (2006) 133-140.
- [16] D. Contour-Ansel , M.L. Torres-Franklin, M.H. Cruz de Carvalho, A. d'Arcy-Lameta, Y. Zuily-Fodil, Glutathione reductase in leaves of cowpea: cloning of two cDNAs, expression and enzymatic activity under progressive drought stress, desiccation and ABA treatment, Ann. Bot. 98 (2006) 1279-87.
- [17] M.L. Torres-Franklin, D. Contour-Ansel , Y. Zuily-Fodil , A.T. Pham-Thi, Molecular cloning of glutathione reductase cDNAs and analysis of GR gene expression in cowpea and common bean leaves during recovery from a moderate drought stress, J. Plant Physiol. 165 (2008) 514-521.
- [18] F. Scholander ,H. Hammel , E. Hemmingsten , E. Bradstreet, Hydrostatic pressure and osmotic potential in leaves of mangrove and some other plants, Proc. Nat. Acad. Sci .USA 52 (1964) 119-125.
- [19] I. Kranner, D. Grill, Determination of glutathione and glutathione disulphide in lichens: a comparison of frequently used methods, Phytochem. Anal., 7 (1996) 24-28.
- [20] J.D. Thompson, D.G. Higgins, T.J. Gibson, CLUSTALW : improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighing, positions-specific gap penalties and weight matrix choice, Nucleic Acids Res. 22 (1994) 4673-4680.

-
- [21] K. Tamura , J. Dudley , M. Nei , S. Kumar, MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0, *M.B.E.* 24 (2007) 1596-1599.
- [22] F.Q. Schafer, G.R. Buettner, Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple, *Free Radic. Biol. Med.* 30 (2001) 1191-1212.
- [23] I. Kranner, S. Birtić, K.M. Anderson, H. W. Pritchard, Glutathione half-cell reduction potential: a universal stress marker and modulator of programmed cell death? *Free Radic. Biol. Med.* 40 (2006) 2155-2165.
- [24] M. Skipsey , B.G. Davis, R. Edwards, Diversification in substrate usage by glutathione synthetases from soya bean (*Glycine max*), wheat (*Triticum aestivum*) and maize (*Zea mays*), *Biochem. J.* 391 (2005) 567-574.
- [25] M. Oven , K. Raith , R.H.H. Neubert, T.M. Kutchan, M.H. Zenk, Homo-phytochelatin are synthesized in response to cadmium in azuki beans, *Plant Physiol.* 126 (2001) 1275-1280.
- [26] J. Ramos , M.R. Clemente, L. Naya , J. Loscos , C. Pérez-Rontomé , S. Sato , S. Tabata , M. Becana, Phytochelatin synthases of the model legume *Lotus japonicus*. A small multigene family with differential response to cadmium and alternatively spliced variants, *Plant Physiol.* 143 (2007) 1110-1118.
- [27] M. Inouhe , S. Ito , N. Sasada , H. Tohyama , M. Joho, Azuki bean cells are hypersensitive to cadmium and do not synthesize phytochelatin, *Plant Physiol.* 123 (2000) 1029-1036.
- [28] W. Gekeler , E. Grill , E.L. Winnacker, M.H. Zenk, Survey of the plant kingdom for the ability to bind heavy metals through phytochelatin, *Z. Natur.* 44 (1989) 361-369.
- [29] L. Naya , R. Ladrera , J. Ramos , E.M. González, C. Arrese-Igor , F.R. Minchin, M. Becana, The response of carbon metabolism and antioxidant defences of alfalfa nodules to drought stress and to the subsequent recovery of plants, *Plant Physiol.* 144 (2007) 1104-1114.
- [30] M.H. Cruz de Carvalho, D. Contour-Ansel, (h)GR, beans and drought stress, *Plant Signal. Behav.* 3 (2008) 834-835.
- [31] H.K. Rennenberg, K. Schmitz, L. Bergmann, Long distance transport of sulphur in *Nicotiana tabacum*, *Planta* 147 (1979) 57-82.

Table 1. Heterologous primers designed from consensus regions of Leguminous GSHS and hGSHS protein sequences and used to amplify cDNA fragments in cowpea leaves.

Table 2. Thiol content in some *Phaseoleae* leaves (nmol g⁻¹ FW).

Legends to figures

Fig. 1. GSH and GSSG quantification in control, S1, S2 and S3 leaves from cowpea cv EPACE-1. Values represent the means \pm SD of three independent experiments per treatment. Control plants (C), $\Psi_w = -0.5 \pm 0.1$ MPa; droughted plants: S1, $\Psi_w = -1.0 \pm 0.1$ MPa; S2, $\Psi_w = -1.5 \pm 0.2$ MPa; S3, $\Psi_w = -2.0 \pm 0.2$ MPa. Leaves from control plants (C) were taken prior to treatments.

Fig. 2. Alignment of hGSHS amino acid sequences from *Vigna unguiculata* (Vu, GenBank accession n° EU164853), *Phaseolus vulgaris* (Pv, AF258320), *Glycine max* (Gm, AJ272035), *Pisum sativum* (Ps, AF258319), *Medicago truncatula* (Mt, AAD29849) and *Lotus japonicus* (Lj, AY219337). The alignment was obtained using the program Clustalw on the web site: <http://pbil.ibcp.fr/htm/index.php>. (*): identity; (:): strongly similar; (.): weakly similar; a, amino acids involved in the catalytic site of human GSHS and conserved in hGSHSs (from Frendo *et al.* 2001). Leu-484 and Pro-485 (in bold) for Vu sequence are conserved in all hGSHSs published sequences and replace two Alanine residues present in GSHSs.

Fig. 3. Sequence analysis of the *VuhGSHS* full-length cDNA. (a) Schematic representation of the *VuhGSHS* cDNA. Boxes represent an open reading frame including one domain (GSH_synth_ATP binding domain, hatched box) and the hGSHS signature (Leu-484 and Pro-485, black box). (b) Nucleotide and deduced amino acid sequence of *VuhGSHS* cDNA with the Leucine and Proline signature (black box).

Fig. 4. Phylogenetical analysis of glutathione synthetase (GSHS) and homoglutathione synthetase (hGSHS) from plants. Unrooted tree was calculated using the neighbor-joining method of the MEGA version 4 (Tamura *et al.* 2007) after the alignment of the amino acid

sequences by CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1994). Numbers correspond to percentage of 1,000 bootstraps and bar represents 0.05 substitutions per site. The following sequences were used to build the tree: At-GSHS, *Arabidopsis thaliana* (NP-568495); Bj-GSHS, *Brassica juncea* (CAA71878); Gm-hGSHS, *Glycine max* (CAB91078); Lj-GSHS, *Lotus japonicus* (AAP69599); Lj-hGSHS, *Lotus japonicus* (AA017713); Mt-GSH1, *Medicago truncatula* (AAK93946); Mt-hGSH2, *Medicago truncatula* (AAD29849); Os-GSHS, *Oryza sativa* (AAS19531); Ps-GSHS, *Pisum sativum* (AAF98121); Ps-hGSHS, *Pisum sativum* (AAF98156); Pv-hGSHS, *Phaseolus vulgaris* (AAF98157); Ta-GSHS, *Triticum aestivum* (CAE18178); Vu-hGSHS, *Vigna unguiculata* (EU164853); Zm-GSHS, *Zea mays* (CAE18179).

Fig. 5. Relative mRNA levels of *VuhGSHS* in cowpea leaves during drought (S) and desiccation (D). Plants (cv. EPACE-1 and cv. 1183) were submitted to water deficit by withholding watering. Control plants (C), $\Psi_w = -0.5 \pm 0.1$ MPa; droughted plants: S1, $\Psi_w = -1.0 \pm 0.1$ MPa; S2, $\Psi_w = -1.5 \pm 0.2$ MPa; S3, $\Psi_w = -2.0 \pm 0.2$ MPa. Desiccated leaves were air-dried at 24°C under dim light for 0.5h (D1), 2h (D2), 5h (D3). Leaves from control plants (C) were taken prior to treatments. A) Gel analysis of hGSHS enzyme transcripts; B) Relative mRNA level. The mRNA levels were normalized to the respective *S19* gene. Relative transcript levels were calculated with reference to the controls taken as 1 (100%). Results are means \pm s.d. of three independent experiments.

Table 1 Heterologous primers designed from consensus regions of Leguminous GSHS and hGSHS protein sequences and used to amplify cDNA fragments in cowpea leaves.

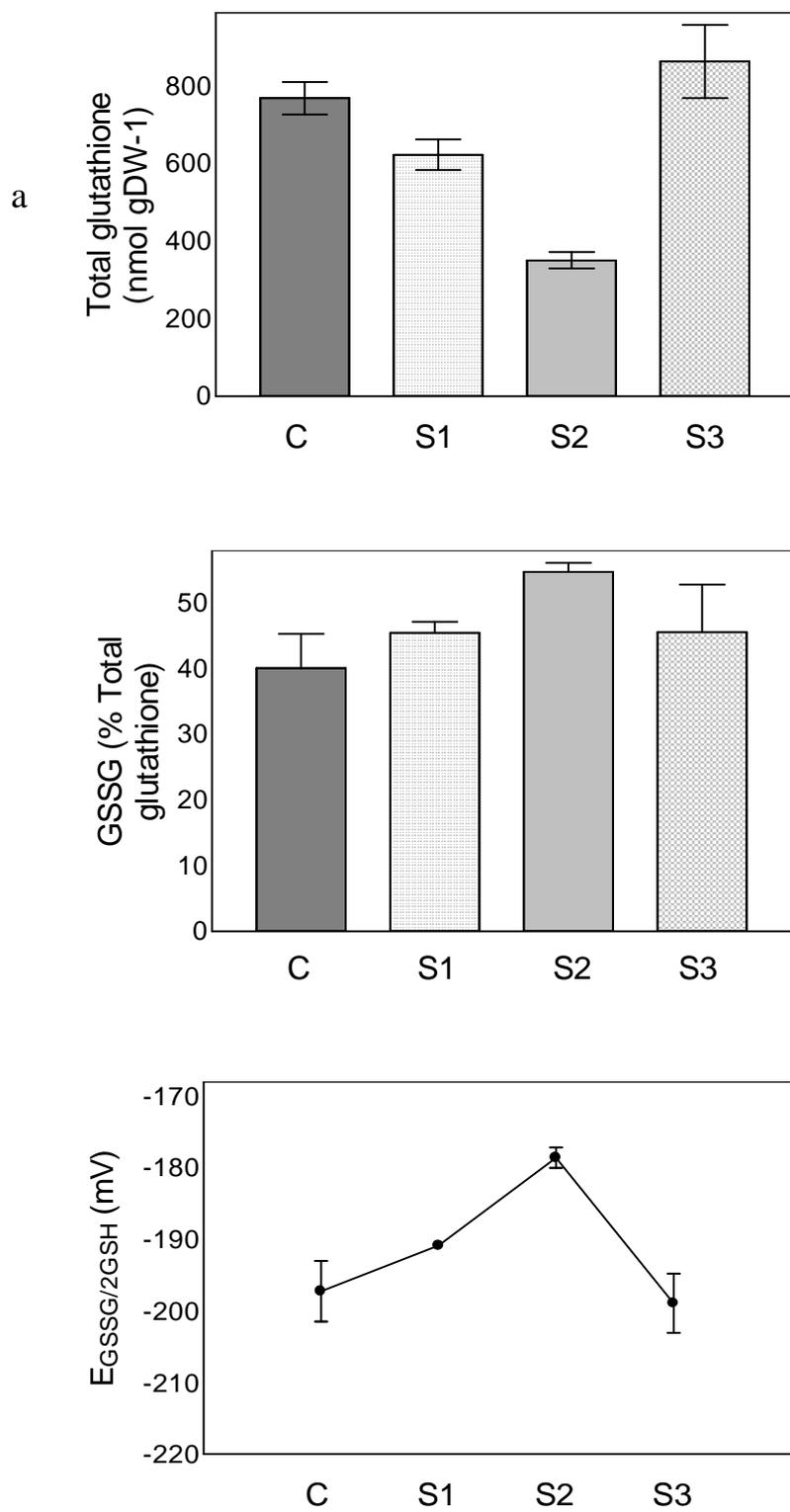
Sense	Primer sequence	T _m (°C)
F	5' GGAAGAGTTCCTGGTGTGGG 3'	61.4
F	5' CAAATAGAGATGAACACTATT 3'	50.1
F	5' GAAAGTGGCTATATGGTGCG 3'	57.3
R	5' AGGATAGTCCTTTGGCGTG 3'	56.7
R	5' CTCCTCCTTCTCTTTGAGG 3'	59.4
R	5' CATCAAAGCAAAGGAAGTGG 3'	55.3

F= forward primer); R= reverse primer. All combinations were tested between forward and reverse primers.

Table 2 Thiol content in some *Phaseoleae* leaves (nmol g⁻¹ FW)

Plant taxon	GSH	hGSH	References
<i>Vigna unguiculata</i>	270±25	0	Matamoros <i>et al.</i> , 1999
<i>Vigna unguiculata</i>	138±13	0	(see Results)
<i>Phaseolus vulgaris</i>	0	198±24	Matamoros <i>et al.</i> , 1999
<i>Phaseolus vulgaris</i>	2	490	Klapheck, 1988
<i>Phaseolus coccineus</i>	0	440	Klapheck, 1988
<i>Glycine max</i>	7±4	305±23	Matamoros <i>et al.</i> , 1999
<i>Glycine max</i>	2	400	Klapheck, 1988
<i>Vigna radiata</i>	1±1	170±38	Matamoros <i>et al.</i> , 1999
<i>Vigna radiata</i>	0	830	Klapheck, 1988
<i>Medicago sativa</i>	16±3	887±22	Matamoros <i>et al.</i> , 1999
<i>Lotus japonicus</i>	22±3	540±26	Matamoros <i>et al.</i> , 2003a

Figure 1



```

Vu -----MSQPLTL 7
Pv -----MSQPLTL 7
Gm -----MSQPLTT 7
Ps -----MSKSSQQLNV 10
Mt ---MVAGSGCLVWFP--HSCTNIFPSSFSVSSSQHHRVLSLFFPKN--RNMSQQQLNL 52
Lj MGVGCGSGCCFITSGTSHSFSHSTFPSPFSSIQLHHQSLSLSLSFPHHLKLIMSQHLSV 60
      . * * .

Vu NSAP--LAEPDTPD---SSAAPPLFDYHSIDQKLLLENIVYDALVWSTLNCLLVGDKSVQRS 62
Pv NSAP--LAEPDTPD---SSAAPPLFDYHSIDQKLLLENIVYDALVWSTLNCLLVGDKSVQRS 62
Gm NSVL--VEEAAAADGDSSAAAPPLFDYHRIDQKLLQNIYDALVWSTLNCLLVGDKSVQRS 65
Ps EVE-----EVVDDSSPSFL---NNYHEIDEKVVQQIVYDALVF'TTLNGLLVGDKSVQRS 61
Mt SSTTINIEVEVDNSPPMTLPSFNIDYHQIDDKVLENIVYDALVFATLNGLLVGDKSVRS 112
Lj SSS-----PIVEEVNDSSS---FDYHQIDPELLENVYDALVYATLNGLLVGDKSVQRS 111
      .          :          : ** * * : : : : : ***** : : * * * * * : : * *

Vu GTVPGVGLVHLPLCLLPGPFPEHSHWKQACELAPIFNELVDRVSLDGKFLQESLSRSTKNAD 122
Pv GTVPGVGLVHLPLCLLPGPFPEHSHWKQACELAPIFNELVDRVSLDGKFLQESLSRSTKNAD 122
Gm GRVPGVGLVHLPLSLLPGPFPEHSHWKQACELAPIFNELVDRVSLDGKFLQESLSRSTKNAD 125
Ps GRVPGVGLVHLPLSLLPPFPQTHWNQACELAPLFNELVDRVSLDANFLQQSLSRSTKTKVD 121
Mt GRVPGVGLVHLPLSLLPPPLPETHHWKQACDLSPFNELVDRVSLDGKFLQQSLSKTKKAD 172
Lj GKVPGVGLVHLPLSLLPPPLPESYHWKQACELAPLFNELVDRVSLDGKFLQESLSRSTKNAD 171
      * * * * * : . * * * * : * : : : : * : * : * : * * * * * : : * * : * * : *

          a a          a a a a a

Vu EFTSRLLDIHSKMLQINKKEDIRLAIVRSDYMVDEKTKSLLQIEMNTISTSFALMGTLVT 182
Pv EFTSRLLDIHSKMLQINKKEDIRLAIVRSDYMVDEK'TNSLLQIEMNTISTSFALIGCLMT 182
Gm EFTSRLLDIHSKMLQINKKEDIRMGIVRSYMDIDEKTKSLLQIEMNTISTSFALIGCLMT 185
Ps EFTSRLLDIHSKMLEINKKEEIRLGLFRSDYMFDEK'TQSLLQIEMNTISTSFSGVGCIIIT 181
Mt EFTSRLLDIHSKMLEINKKEEIRMGFLFRSDYMLDEKTKSLLQIEMNTISTSFSGVGVVMT 232
Lj EFTSRLLDIHSKMLEINKKEEIRMGFLFRSDYMLDEKTKRLLQIEMNTISTSFSGVGCVTT 231
      * * * * * : * * * * : * * * * : * * * * : * * * * : * * * * : * * * * : * * * * : * * * *

          a a

Vu GLHKSLISQYGNILGLDPNRVPANNAVDQAAEALAKGWSEYNNPRAAILVVVVQVEERNMY 242
Pv GLHKSLISQYGNILGLDSNRVPANNAVDQSAEALAKGWSEYNDPRAAILVVVVQVEERNMY 242
Gm GLHKSLISQYGNILGLNSNRVPANNAVDQSAEALAKAWSEYNNPRAAILVVVVQVEERNMY 245
Ps QLHRNLSRYGKSLGLDSERVPTNTADSKYAEALAKAWSEYNNPSAVIIVVVQAEERNMY 241
Mt ELHRNLSHYGKLLGLDSERVVPNTADSRYAEALAKAWKEYNNPRAVIIVVVQGEERNMY 292
Lj ELHRNLSHYGKLLGLDSIRVPANSATNKFAETLAKAWLEYNNPRAVIMIMVQPEEHNMY 291
      * * : : : * * * : * * * : * * * : * * * : * * * : * * * : * * * : * * * : * * *

          a          a a

Vu EQHYISALLRDKHHIKSIRKTLAEVDQGEIILPDGTLSDVGQPVSVVYFRAGYTPKDYP 302
Pv EQHYISALLRDKYHIKSIRKTLAEVDQEGEILPDGTLSDVGQPI SVVYFRAGYTPKDYP 302
Gm EQHYISALLREKHHIRSIRKTLTEIDQEGKILPDGTLSDVGQAI SVVYFRAGYTPKDYP 305
Ps DQHFVSAAILRERHHITIRKTLAEINQEGEILSDGTLSDVGQVVAIVYFRAGYTPADYP 301
Mt DQHFVSAAILREKHHITIRKTLAEINQEGEILPDGTLSDVGQAVVAIVYFRAGYTPVDYP 352
Lj DQHMISAVLREKYHIPTIRKTLAEVDQEGAVLPDGTLSDVGQAI AIVYFRAGYTPKDYP 351
      : * * : * * : * * * : * * * : * * * : * * * : * * * : * * * : * * * : * * *

          a

Vu ESEWRARLLMEQSSAIKCPNISIYHLVGTGKIKQELAKPGVLERFVENKDHVAKLRSCFAG 362
Pv ESEWRAGLLMEQSSAIKCPNISIYHLVGTGKIKQELAKPGVLERFVENKDHVAKLRACFAG 362
Gm ESEWRARLLMEQSSAIKCPNISIYHLVGTGKIKQELAKPGVLERFVENKDHIAKLRACFAG 365
Ps ESEWKARLLIEQSSAIKCPNISIYHLVGTGKIKQELAQPNVLERFFENKEDIAKLRKCFAG 361
Mt ESEWRARLLIEQSSAIKCPNISIYHLVGTGKIKQELARPNVLERFFENKEDIAKLRKCFAG 412
Lj ESEWRARLLMEQSSAIKCPNISIYHLVGTGKIKQELAKPNVLERFFENKDDVAKLRACFAG 411
      * * * : * * * : * * * : * * * : * * * : * * * : * * * : * * * : * * *

          a a a a a          a

Vu LWSLESDIVKKAIAENPEL FVMKPPQREGGGNNIYGNDLKESLLKLQESGSEEDAAYILMQ 422
Pv LWSLESDIAQKAIENPEL FVMKSQREGGGNNIYGDDMRENLLKLQKAGSEEDAAYILMQ 422
Gm LWSLESDIVKKAIAENPEL FVMKPPQREGGGNNIYGDELRETLKLLQKAGSEEDAAYILMQ 425
Ps LWSLESDIVKRAIETPEL FVMKPPQREGGGNNIYGDDLRETLKLLQKSDSQEDAAYILMQ 421
Mt LWSLESDIVNEAIAKPEL FVMKPPQREGGGNNIYGDDLRETLKLLQKPSQEDAAYILMQ 472
Lj LWSLESDIVKQAIKPEL FVMKPPQREGGGNNIYGDDLRETLKLLQKSGSEEDAAYILMQ 471
      * * * : * * * : * * * : * * * : * * * : * * * : * * * : * * * : * * *

          a          a          a a

Vu RIFPATFPAILVRDGNWSTDHVI SEAGIFSTYLRNKDKII INKESGYTVRTRKVVSSSYEGG 482
Pv RIFPATFPAILVRDGNWSTDGHVIAEAGIFGTYLRNKDKII INNESGYMVRTKVVSSSYEGG 482
Gm RIFPATSPAILVRDGNWDTGHVISEAGIFGTYLRNKDKII INNESGYMVRTKISSSYEGG 485
Ps RIFPVNTEAILVRNGFLHKDRVISEFGIFSTYLRNKDKVI VNNESGYMVRTKPSLSDEGG 481
Mt RIFPANTASILMRNGFLHKDHVISEFGIFSTYLRNKDKVI VNNESGYMVRTKPSLSDEGG 532
Lj RIFPTSTAAILMRNGCWHKDHVLT EFGIFGTYLRNKDKVI INNESGYMVRTKMSSSDEGG 531
      * * * . . : * * * : * * * : * * * : * * * : * * * : * * * : * * * : * * *

          a

Vu VLPFGFVIDTAYLT 496
Pv VLPFGFVVDIVYLT 496
Gm VLPFGFVVDIVYLT 499
Ps VLPFGFVIDSVYLT 495
Mt VLPFGFVIDSVYLT 546
Lj VLPFGFVIDSVYLT 545
      * * * * * : * : * * *

```

exes

Figure 2

28

GSH_synth_ATP

498

a

N



C

C	L	M	S	Q	P	L	T	L	N	S	A	P	L	A	E	P	D	18
TGT	CTC	ATG	TCT	CAG	CCT	TTG	ACT	CTC	AAC	TCT	GCC	CCA	CTT	GCA	GAG	CCT	GAC	54
T	D	S	S	A	A	P	P	L	F	D	Y	H	S	I	D	Q	K	36
ACT	GAT	TCT	TCC	GCC	GCG	CCT	CCC	CTC	TTC	GAT	TAT	CAT	AGT	ATC	GAC	CAA	AAA	108
L	L	E	N	I	V	Y	D	A	L	V	W	S	T	L	N	C	L	54
CTG	CTG	GAA	AAC	ATA	GTT	TAC	GAT	GCT	CTT	GTC	TGG	AGC	ACT	CTC	AAC	TGC	CTC	162
L	V	G	D	K	S	V	Q	R	S	G	T	V	P	G	V	G	L	72
CTC	GTT	GGA	GAT	AAA	TCG	GTT	CAG	AGA	TCT	GGA	ACA	GTT	CCA	GGT	GTG	GGT	TTG	216
V	H	L	P	L	C	L	L	P	G	P	F	P	E	S	H	W	K	90
GTG	CAT	CTT	CCG	CTT	TGC	TTA	TTA	CCC	GGG	CCA	TTT	CCG	GAA	AGT	CAC	TGG	AAG	270
Q	A	C	E	L	A	P	I	F	N	E	L	V	D	R	V	S	L	108
CAA	GCT	TGT	GAA	TTA	GAT	CCT	ATT	TTT	AAT	GAG	CTT	GTT	GAT	CGT	GTG	AGT	TTG	324
D	G	K	F	L	Q	E	S	L	S	R	T	K	N	A	D	E	F	126
GAT	GGG	AAA	TTT	CTC	CAG	GAA	TCT	CTA	TCC	AGA	ACT	AAG	AAT	GCA	GAC	GAA	TTT	378
T	S	R	L	L	D	I	H	S	K	M	L	Q	I	N	K	K	E	144
ACC	TCC	AGA	CTT	TTA	GAT	ATT	CAT	TCC	AAG	ATG	CTA	CAG	ATT	AAC	AAA	AAA	GAG	432
D	I	R	L	A	I	V	R	S	D	Y	M	V	D	E	K	T	K	162
GAT	ATA	CGC	TTG	GCA	ATA	GTT	CGT	TCA	GAT	TAT	ATG	GTT	GAT	GAG	AAG	ACT	AAA	486
S	L	L	Q	I	E	M	N	T	I	S	T	S	F	A	L	M	G	180
TCA	CTT	CTG	CAA	ATA	GAG	ATG	AAC	ACC	ATT	TCC	ACT	TCC	TTT	GCT	TTG	ATG	GGA	540
T	L	V	T	G	L	H	K	S	L	I	S	Q	Y	G	N	I	L	198
ACT	CTT	GTG	ACT	GGA	CTT	CAT	AAG	AGC	TTA	ATT	TCT	CAA	TAT	GGA	AAC	ATC	CTT	594
G	L	D	P	N	R	V	P	A	N	N	A	V	D	Q	A	A	E	216
GGA	CTA	GAT	CCC	AAT	AGG	GTT	CCT	GCA	AAC	AAT	GCT	GTC	GAT	CAA	GCT	GCA	GAG	648
A	L	A	K	G	W	S	E	Y	N	N	P	R	A	A	I	L	V	234
GCC	TTG	GCT	AAA	GGT	TGG	AGT	GAG	TAT	AAC	AAT	CCC	AGG	GCT	GCA	ATC	TTG	GTC	702
V	V	Q	V	E	E	R	N	M	Y	E	Q	H	Y	I	S	A	L	252
GTG	GTT	CAG	GTT	GAA	GAA	CGA	AAC	TAT	GAG	CAG	CAT	TAT	ATC	TCT	GCC	CTT	756	
L	R	D	K	H	H	I	K	S	I	R	K	T	L	A	E	V	D	270
CTA	AGA	GAC	AAG	CAT	CAT	ATT	AAA	AGC	ATA	AGG	AAA	ACA	TTG	GCA	GAA	GTG	GAT	810
Q	Q	G	E	I	L	P	D	G	T	L	S	V	D	G	Q	P	V	288
CAG	CAA	GGG	GAA	ATT	CTG	CCA	GAT	GAA	ACA	CTT	TCT	GTG	GAC	GGA	CAA	CCA	GTT	864
S	V	V	Y	F	R	A	G	Y	T	P	K	D	Y	P	S	E	S	306
TCA	GTT	GTT	TAC	TTC	CGG	GCT	GGC	TAC	ACA	CCA	AAA	GAC	TAT	CCT	TCA	GAA	TCA	918
E	W	R	A	R	L	L	M	E	Q	S	S	A	I	K	C	P	S	324
GAA	TGG	AGA	GCT	AGG	CTA	CTG	ATG	GAA	CAA	TCT	TCT	GCT	ATC	AAA	TGC	CCT	TCA	972
I	S	Y	H	L	V	G	T	K	K	I	Q	Q	E	L	A	K	P	342
ATA	TCT	TAT	CAT	TTG	GTT	GGC	ACC	AAA	AAG	ATT	CAA	CAG	GAA	CTT	GCA	AAA	CCT	1026
G	V	L	E	R	F	V	E	N	K	D	H	V	A	K	L	R	S	360
GGT	GTG	CTT	GAG	AGG	TTT	GTC	GAA	AAC	AAG	GAC	CAC	GTA	GCC	AAA	TTG	CGT	TCA	1080
C	F	A	G	L	W	S	L	E	D	S	D	I	V	K	K	A	I	378
TGT	TTT	GCA	GGG	TTG	TGG	AGT	TTG	GAA	GAC	TCA	GAT	ATT	GTT	AAA	AAA	GCA	ATT	1134
E	N	P	E	L	F	V	M	K	P	Q	R	E	G	G	G	N	N	396
GAA	AAT	CCA	GAG	TTA	TTT	GTG	ATG	AAG	CCG	CAA	AGA	GAA	GGA	GGA	GGA	AAC	AAT	1188
I	Y	G	N	D	L	K	E	S	L	L	K	L	Q	E	S	G	S	414
ATT	TAT	GGC	AAT	GAT	TTG	AAG	GAA	AGC	CTC	CTT	AAA	TTA	CAG	GAA	TCT	GGT	TCT	1242
E	E	D	A	A	Y	I	L	M	Q	R	I	F	P	A	T	F	P	432
GAA	GAA	GAT	GCA	GCT	TAC	ATC	CTC	ATG	CAG	AGG	ATA	TTT	CCA	GCC	ACT	TTT	CCA	1296
A	I	L	V	R	D	G	N	W	S	T	D	H	V	I	S	E	A	450
GCA	ATT	TTG	GTG	CGT	GAT	GGT	AAT	TGG	AGT	ACG	GAT	CAT	GTG	ATT	TCA	GAA	GCT	1350
G	I	F	S	T	Y	L	R	N	K	D	K	I	I	I	N	K	E	468
GGA	ATA	TTT	AGT	ACT	TAT	TTA	AGG	AAC	AAG	GAT	AAG	ATT	ATC	ATT	AAT	AAG	GAA	1404
S	G	Y	T	V	R	T	K	V	S	S	S	Y	E	G	G	V	L	486
AGT	GGC	TAC	ACG	GTG	CGT	ACA	AAA	GTA	TCA	TCA	TCT	TAT	GAA	GGT	GGA	GTT	TTA	1458
P	G	F	G	V	I	D	T	A	Y	L	T	*						499
CCT	GGT	TTT	GGA	GTG	ATA	GAC	ACT	GCA	TAC	CTA	ACT	TGA						1497
TGGAGCCAAGATCCTTAGTTATCACATTCACCTTCAATTCAAAAATATTATGA																		1548
ATGTTTTACATGTATCACCATTAGTTTCCTCCTCCTGATTGTGTTTGTGTTT																		1599
CTCTCCTCAAACAGTGAAGAAGAGAAGATGCATTTGTTGTCTCCTTTA																		1650
GCTTTTCTACTGAATGGTGTCCGATTATCAAATGTATTTATATAAATTTG																		1701
GTTTGAACACAATGAAATGTTGGTGTATTTGGTGCAGTAAAAA																		1751

Fig. 4

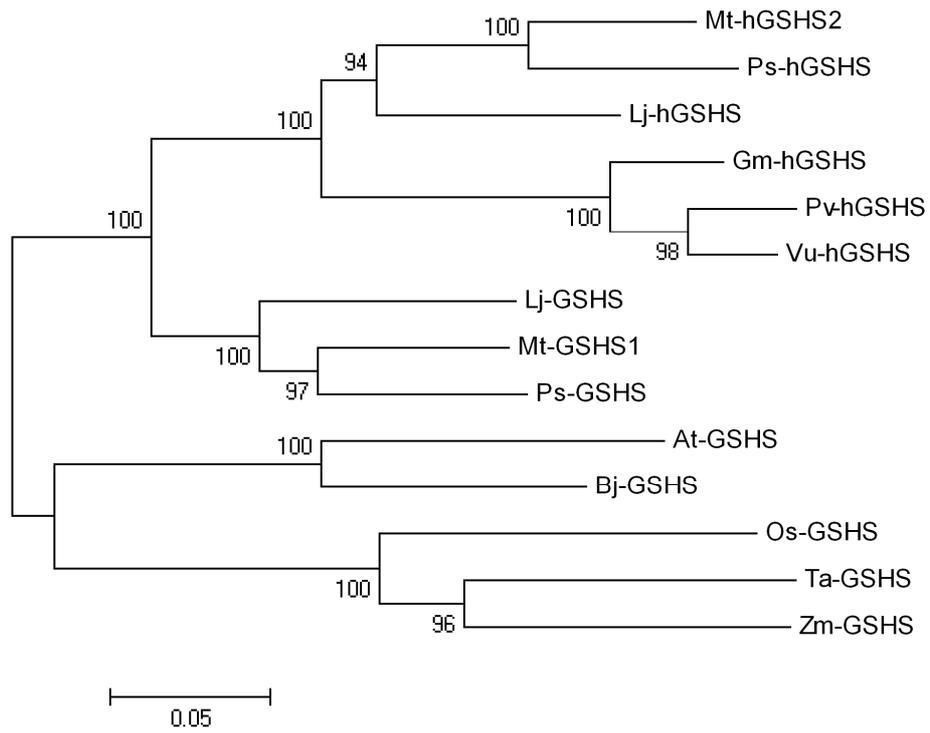
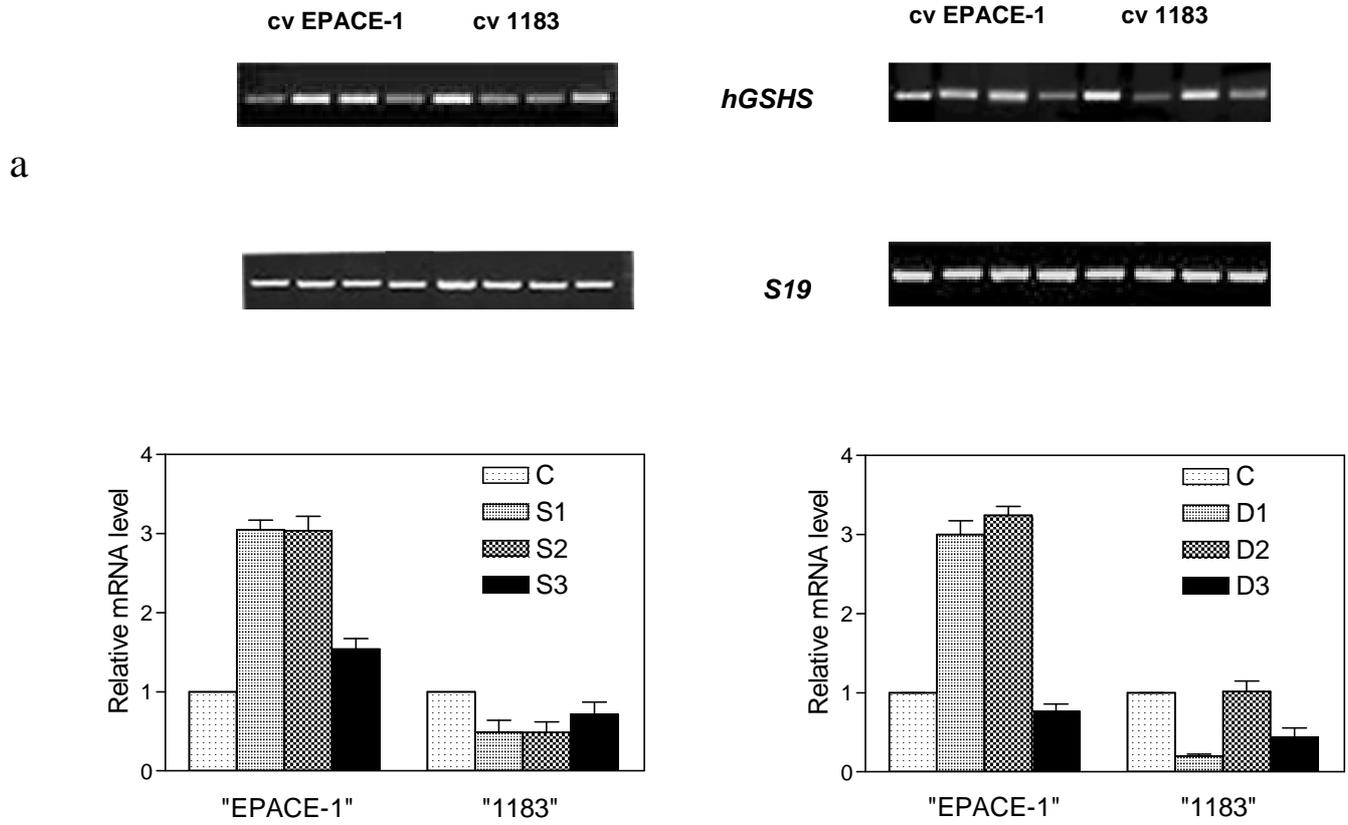


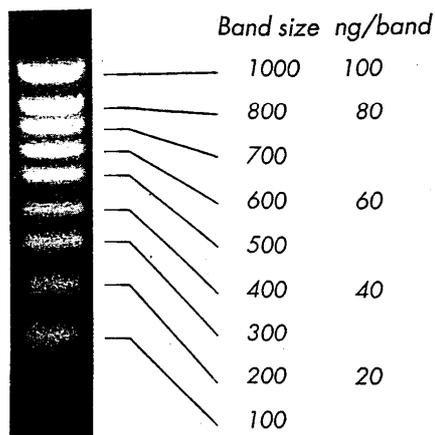
Figure 5



Annexe 2

Marqueurs de taille

Tips: The loading buffer is a special buffer to insure the stability of the ladder at 4 °C. The blue dye is Bromophenol Blue. If you want to dilute the Smart Ladder for easier gel loading simply add TE buffer (10mM Tris, 1mM EDTA). We propose you to use an equivalent volume of Smart Ladder and 1x TE buffer. With this dilution, you can maintain the quantification by loading 10 instead of 5 µl on your gel. The DNA is not dephosphorylated and has first to be dephosphorylated if you want to label it with ³²P.



SmartLadder DATA SHEET

SmartLadder is ready to use and designed for simultaneous quantification and sizing

	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Band size</th> <th>ng/band</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>10000</td><td>100</td></tr> <tr><td>8000</td><td>80</td></tr> <tr><td>6000</td><td>60</td></tr> <tr><td>5000</td><td>50</td></tr> <tr><td>4000</td><td>40</td></tr> <tr><td>3000</td><td>30</td></tr> <tr><td>2500</td><td>25</td></tr> <tr><td>2000</td><td>20</td></tr> <tr><td>1500</td><td>15</td></tr> <tr><td>1000</td><td>100</td></tr> <tr><td>800</td><td>80</td></tr> <tr><td>600</td><td>60</td></tr> <tr><td>400</td><td>40</td></tr> <tr><td>200</td><td>20</td></tr> </tbody> </table>	Band size	ng/band	10000	100	8000	80	6000	60	5000	50	4000	40	3000	30	2500	25	2000	20	1500	15	1000	100	800	80	600	60	400	40	200	20	<p>Sizing: 14 regularly spaced bands, ranging from 200 to 10,000 bp with 2 high intensity bands for easy determination. For the smartest sizing, each band is an exact multiple de 100 bp.</p> <p>Quantification: With a 5 µl loading, each band corresponds to the quantity indicated in the picture.</p> <p>References: MW-1700-02 for 200 lanes MW-1700-10 for 1000 lanes</p>
Band size	ng/band																															
10000	100																															
8000	80																															
6000	60																															
5000	50																															
4000	40																															
3000	30																															
2500	25																															
2000	20																															
1500	15																															
1000	100																															
800	80																															
600	60																															
400	40																															
200	20																															

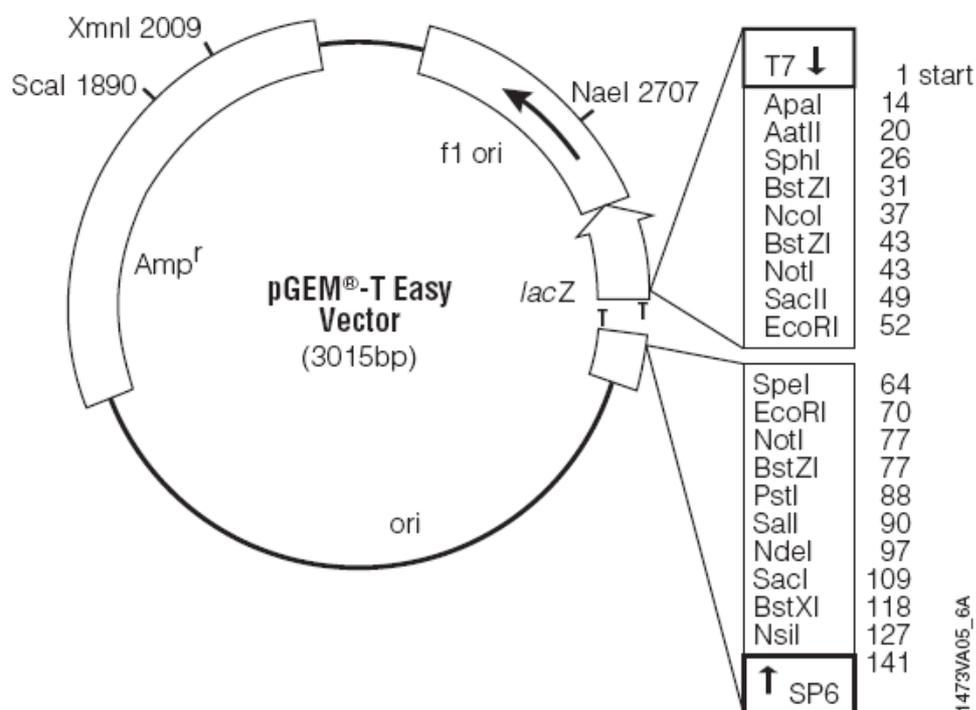
E U R O G E N T E C
EGT GROUP

Tel. +32 4 366 01 50 - Fax +32 4 365 16 04
e-mail: info@eurogentec.com - http://www.eurogentec.com

Annexe 3 :

Détails sur le vecteur de clonage plasmidique pGEM-TEasy et son mode de fonctionnement

Le vecteur de clonage plasmidique pGEM-TEasy (Promega, France), de 3015 pb, incluant un gène de résistance à l'ampicilline, contient une région de clonage avec plusieurs sites de restrictions, des séquences de l'opéron lactose et les séquences des oligos T7 et SP6. L'insertion de l'amplicon se fait dans le site de polyclonage contenant le gène *Lac-Z* codant la β -galactosidase. Ainsi, la présence de l'amplicon aboutit à l'obtention de β -galactosidase inactive. De plus, ce plasmide vendu sous forme linéaire présente une base Thymidine (T) saillante à chacune de ses extrémités 3'. Les ADN polymérase utilisées pour les réactions d'amplification PCR ajoutent une base Adénosine (A) saillante à chaque extrémité 3' de l'amplicon. Grâce à la complémentarité des bases A et T, les amplicons d'intérêt sont insérés de façon covalente dans le plasmide par l'action d'une ligase.



pGEM®-T Easy Vector sequence reference points:

T7 RNA polymerase transcription initiation site	1
multiple cloning region	10-128
SP6 RNA polymerase promoter (-17 to +3)	139-158
SP6 RNA polymerase transcription initiation site	141
pUC/M13 Reverse Sequencing Primer binding site	176-197
<i>lacZ</i> start codon	180
<i>lac</i> operator	200-216
β -lactamase coding region	1337-2197
phage f1 region	2380-2835
<i>lac</i> operon sequences	2836-2996, 166-395
pUC/M13 Forward Sequencing Primer binding site	2949-2972
T7 RNA polymerase promoter (-17 to +3)	2999-3

Principe de la sélection des colonies bactériennes par le test blanc/bleu

Elle consiste à introduire des plasmides dans des bactéries *Escherichia coli* rendues préalablement compétentes par traitement au CaCl_2 qui fragilise les membranes. Les bactéries transformées par le plasmide recombinant expriment le gène de résistance à l'antibiotique porté par le plasmide. Après multiplication, elles sont ensuite étalées sur un milieu solide contenant du Xgal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β D-galactoside) et de l'IPTG (isoprpyl-beta-D-thiogalactoside). L'IPTG induit l'expression du gène *Lac-z* porté par le plasmide et codant la B-galactosidase. Cette dernière hydrolyse le composé Xgal, libérant ainsi un produit bleu. Cependant, l'insertion de l'amplicon dans le site de polyclonage du plasmide interrompt le gène *Lac-z*, ce qui aboutit à la synthèse d'une β -galactosidase inactive. De ce fait, le substrat Xgal n'est pas hydrolysé et la colonie reste blanche. Toutes les colonies blanches contiennent donc potentiellement un plasmide recombinant.

Annexe 4 :

Milieux de culture bactérien

LB liquide (1L)

10 g Bacto Tryptone

5 g Bacto Yeast extract

5 g NaCl

ajuster à pH 7,5 avec NaOH

qsp 1 L avec de l'eau

LB solide (1L)

LB liquide + 15 g/L d'agar

Stériliser par autoclavage

SOC (1L)

20 g Bacto Tryptone

5 g Bacto Yeast extract

2 mL de NaCl 5M

2,5 mL de KCl 1M

qsp 1 L avec de l'eau

Abstract

Grass pea (*Lathyrus sativus* L.) is a legume plant cultivated mostly in India, Bangladesh and Ethiopia. It possesses high tolerance levels to abiotic stresses like drought and flooding. In the present work, the tolerance of *Lathyrus sativus* L. (local lines « Raipur » and « Bangladesh ») to another abiotic stress: lead, has been determined, using a physiological and a molecular approach. A hydroponic culture system has been set up. Lead was introduced as lead nitrate ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$). Lead contents in various plant organs (roots, stems, leaves) were determined using ICP-OES. Cell responses in these organs were studied using real-time RT-PCR. Grass pea-specific primers were designed from the 11 complementary DNA sequences that were isolated and sequenced here for the first time. One of the cDNA is full-length and codes a cystein protease (*LsCP*). The others are partial cDNA and code an aspartic protease (*LsAP*, 270 aa), two ascorbate peroxidases, a cytosolic (*LsAPXc*, 195 aa) and a peroxisomal (*LsAPXp*, 226 aa), a heat shock protein 70 (*LsHSP70*, 287), a homoglutathione synthetase (*LshGSHS*, 329 aa), a glutathione-S-transferase (*LsGST*, 66 aa), a glutathione reductase (*LsGR*, 336 aa), a phytochelatin synthetase (*LsPCS*, 64 aa), a phospholipase D α (*LsPLD α* , 288 aa), a membrane transporter specific of lead (*LsCNGC*, 136) and a soluble protein (*LsABCt*, 331 aa).

The plants exposed to lead accumulate large amounts of the metal in their roots only and the metal is tightly bound to the tissues. mRNA accumulation for *LsPLD α* suggest that root tissues are under stress and coping. The increases in *LsGST*, *LsGR* and *LsAPX* transcripts suggest that Pb-glutathione complexes are formed and that the ascorbate-glutathione cycle is stimulated to scavenge deleterious activated oxygen species, in the root tissues.

In lead-free leaves, *LsCP*, *LsAP*, *LsAPXc*, *LsAPXp*, *LsHSP70*, *LsGR* et *LsPCS* genes are over-expressed. This indicates that a root signal is emitted by these leaded tissues and transported systemically to the rest of the plant where it stimulates the expression of the genes mentioned above. This could be a prevention mechanism to prepare leaf tissues for the possibility of lead spreading. Chelation of lead with EDTA in the growth medium facilitates the transport of the pollutant to the leaves where it accumulates. In these tissues, the *LsCNGC* is over-expressed suggesting that this transporter is involved in the translocation of the Pb-EDTA complexes into the leaf symplasm. As was observed previously in other plant species, lead affects glutathione metabolism in grass pea. However, the observation of a systemic signal originating from the leaves in response to lead and the over-expression of autolytic genes are reported here for the first time and could be contributing elements to lead tolerance in this under-utilized plant species.

Key-words: *Lathyrus sativus*, hydroponic culture, lead, EDTA, gene expression, tolerance.

Résumé

La gesse commune (*Lathyrus sativus* L.) est une légumineuse cultivée principalement en Inde, au Bangladesh et en Ethiopie qui présente des niveaux de résistance élevés pour de nombreuses contraintes abiotiques, telles que la sécheresse et l'inondation. Dans ce travail, les capacités de tolérance du *Lathyrus* (lignées locales « Raipur » et « Bangladesh ») à une autre contrainte abiotique, la présence de plomb, ont été déterminées des points de vue physiologique et moléculaire. Un système expérimental de culture hydroponique a été mis au point pour ces plantes. Le plomb y est introduit sous forme de nitrate de plomb ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$). Les teneurs en plomb des différents organes des plantes (racines, tiges, feuilles) ont été déterminées par ICP-OES. Les réponses cellulaires dans ces organes ont été étudiées par RT-PCR quantitative (PCR en temps réel). Des amorces spécifiques du *Lathyrus* ont été dessinées à partir des 11 séquences d'ADN complémentaires (ADNc) isolées pour la première fois et séquencées. L'un des ADNc isolé est complet et code une cystéine protéase (*LsCP*, 427 aa). Les autres sont des ADNc partiels et correspondent à une aspartique protéase (*LsAP*, 270 aa), deux ascorbate peroxidases cytosolique (*LsAPXc*, 195 aa) et peroxisomale (*LsAPXp*, 226 aa), une protéine de choc thermique (« Heat Shock Protein 70 »; *LsHSP70*, 287), une homoglutathion synthétase (*LshGSHS*, 329 aa), une glutathion S-transférase (*LsGST*, 66 aa), une glutathion réductase (*LsGR*, 336 aa), une phytochélatine synthétase (*LsPCS*, 64 aa), une phospholipase D α (*LsPLD\alpha*, 288 aa), un transporteur membranaire spécifique du Pb (*LsCNGC*, 136) et une protéine soluble (*LsABCt*, 331 aa).

Les plantes exposées au nitrate de plomb accumulent de grandes quantités de métal dans leurs racines sous forme de plomb fortement lié aux tissus. L'accumulation d'ARN messagers de la *LsPLD\alpha* suggère que les racines subissent une contrainte cellulaire et s'y adaptent. La stimulation de l'expression des gènes *LsGST*, *LsGR* et *LsAPX* correspondrait à la formation de complexes Pb-glutathion et à une activation du cycle ascorbate-glutathion pour la neutralisation des espèces activées de l'oxygène (ROS) délétères.

Dans les feuilles exemptes de plomb, l'augmentation de l'expression des gènes *LsCP*, *LsAP*, *LsAPXc*, *LsAPXp*, *LsHSP70*, *LsGR* et *LsPCS* semble indiquer l'émission d'un signal racinaire transmis de manière systémique vers le reste de la plante où il déclenche la sur-expression de ces gènes. Ceci pourrait permettre aux tissus épargnés par le polluant de se préparer à son éventuelle arrivée. La chélation du Pb avec de l'EDTA dans le milieu de culture conduit à son transport vers les parties aériennes et à son accumulation dans les feuilles. L'expression du gène *LsCNGC* chez ces plantes est activée dans les feuilles, suggérant une participation de ce transporteur à l'entrée des complexes Pb-EDTA dans le symplasme. Comme observé chez d'autres espèces végétales, le plomb affecte le métabolisme du glutathion chez la gesse commune. Cependant, la mise en évidence d'une réaction systémique en réponse au plomb à partir des racines ainsi que la surexpression de gènes d'autolyse sont réalisées pour la première fois et pourraient être des éléments contribuant fortement à la tolérance au plomb chez cette espèce végétale sous-utilisée.

Mots clés : *Lathyrus sativus*, culture hydroponique, plomb, EDTA, expression de gènes, tolérance.