

# UTILISATION DE DEUX INDICES DE STRESS POUR L'ÉVALUATION DE LA TOXICITÉ DE TROIS MÉTAUX LOURDS (CUIVRE, CADMIUM ET ZINC) SUR LA LENTILLE D'EAU « *L. GIBBA* »

Smain Megateli<sup>1</sup>,

Saida Semsari<sup>1</sup>,

Brahim Naziha<sup>1</sup>,

Michel Couderchet<sup>2</sup>.

1. Faculté des Sciences

Agro-vétérinaires et

biologiques de

l'université Saad Dahlab-

Blida,

2. Université de Reims,

France.

## Résumé

Au cours de cette étude nous avons confirmé la toxicité de trois métaux lourds (cuivre, cadmium et zinc), même à faibles concentrations, en utilisant pour la première fois un indice dit indice de stress utilisé avec succès pour l'évaluation de la toxicité des bryophytes aquatiques. L'ensemble des tests réalisés, ont montré que ces trois métaux lourds affectent la croissance, l'indice de stress et la quantité de la proline de la lentille d'eau *L. gibba*. Après 04 jours de traitement, une concentration de  $10^{-3}$  à  $10^{-1}$  mg L<sup>-1</sup> de cadmium inhibe la croissance de 25 à 100%, réduit l'indice de stress de 35% et de 89% et induit des augmentations de la quantité de la proline de 44 à 567%. Dans les mêmes conditions, une concentration de  $10^{-4}$  à  $10^{-1}$  mg L<sup>-1</sup> de cuivre inhibe la croissance de 36 à 75%, réduit l'indice de stress de 19% à 81% et provoque des augmentations de la proline de 67 à 288%.

Des concentrations comparables de zinc n'induit aucun effet. Cependant, des concentrations élevées (4, 30 et 50 mg L<sup>-1</sup>) inhibent la croissance de 50 à 79%. Des concentrations de 0,1 et 30 mg L<sup>-1</sup>, induisent de faibles réductions de l'indice de stress (3,8 à 22%) et des augmentations de la proline de 144 et 177%.

## Introduction

La contamination de l'environnement par les métaux traces est depuis longtemps d'actualité. Ces métaux lourds sont caractérisés par leur toxicité vis-à-vis des écosystèmes aquatiques, la santé humaine et leur potentiel d'accumulation dans les organismes. En effet, les plantes aquatiques, particulièrement, les *Lemna* ont manifesté de fortes accumulations de métaux lourds comme le cadmium, le cuivre et le sélénium dans leurs tissus [1-3]. Cette propriété de bio-accumulation a suggéré l'utilisation de ces plantes pour l'évaluation de la toxicité et la surveillance des métaux dans l'eau [4,5,6]. En ce qui concerne l'effet potentiel des métaux sur les organismes aquatiques, de nombreuses études ont montré qu'ils sont toxiques à l'état de traces, et

l'exposition de ces plantes à ces substances provoque des changements physiologiques et biochimiques. L'exploitation de ces modifications pour l'évaluation de la toxicité de ces polluants a été largement discutée [7, 8,9]. L'indice de stress défini par le rapport de la chlorophylle sur son produit de dégradation la phéophytine ( $DO_{665}/DO_{665a}$ ) utilisé avec succès pour l'évaluation de la toxicité des bryophytes aquatiques [10], ainsi que l'accumulation de la proline comme marqueurs de stress ont été testés. La lentille d'eau *L. gibba* a été choisie comme espèce modèle pour cette étude. Cette plante aquatique est caractérisée à la fois par ses facilités d'utilisation et de culture, par son adaptation aux différentes conditions climatiques et est aussi présente dans plusieurs régions [11].

## Matériels et méthodes

### Matériel végétal

La lentille *L. gibba* a été prélevée des cultures mères et sélectionnée sur la base des critères suivants : absence de nécroses, de chlorose et de contamination algale, la colonie doit être composée de deux frondes adultes de tailles identiques. Le milieu de culture utilisé est celui de Haogland légèrement modifié [12].

### Conditions de culture

Des groupes de cinq individus, soit dix frondes, sont cultivés dans des Erlenmeyers en verre de 250 ml de capacité contenant 100 ml de milieu de culture stérile (pH =  $6,5 \pm 0,1$ ). Les Erlenmeyers, fermés par un film plastique légèrement perforé, sont répartis en plusieurs lots et placés dans une chambre thermostatée (à  $22 \pm 2$  °C) avec une photopériode de 16 heures de lumière (4000 Lux) et 8 heures d'obscurité.

### Métaux lourds

Trois solutions mères ont été utilisées pour préparer les milieux de culture contaminés :

· Une solution mère de cuivre à  $10 \text{ mg L}^{-1}$ , obtenue par dissolution du sulfate de cuivre  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (Panreac Quimica, pureté supérieure à 98%), est utilisée pour préparer des milieux de cultures à différentes concentrations en cuivre :  $10^{-4}$ ;  $10^{-3}$ ;  $10^{-2}$ ;  $10^{-1}$  et  $4 \text{ mg L}^{-1}$ .

· Une solution mère de cadmium à  $10 \text{ mg L}^{-1}$ , obtenue à partir du chlorure de cadmium  $\text{CdCl}_2$  (Panreac Quimica, pureté supérieure à 98%), est utilisée pour préparer des milieux de cultures contaminés par différentes concentrations en cadmium:  $10^{-3}$ ;  $10^{-2}$  et  $10^{-1} \text{ mg L}^{-1}$ .

· Une solution mère de zinc à  $1 \text{ g L}^{-1}$ , obtenue par dissolution de sulfate de zinc  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (Merck, pureté supérieure à 98%), est utilisée pour la préparation des milieux de cultures contaminés par différentes concentrations en zinc :  $10^{-2}$ ;  $10^{-1}$ ; 4; 30 et  $50 \text{ mg L}^{-1}$ .

Un milieu non contaminé est utilisé pour servir de témoin.

### Paramètres de mesure de la toxicité

#### Indice de stress physiologique $\text{DO}_{665}/\text{DO}_{665a}$

L'indice de stress physiologique correspond au rapport de la chlorophylle et de son produit de dégradation « la phéophytine totale » [13,14].

#### Dosage de la proline

La proline est dosée selon la méthode décrite par Troll et Lindsley [15].

#### Analyse statistique des résultats

Chaque essai a fait l'objet de trois répétitions. Au cours de chaque traitement, pour chaque concentration trois répétitions ont été réalisées avec un témoin. Les résultats présentés dans les différentes figures représentent les moyennes arithmétiques avec les écarts-types correspondants. Les analyses statistiques ont été réalisées par SigmaStat 3.0 (SPSS Science Software GmbH, Germany). Les réponses de la plante exposée aux métaux lourds sont analysées par comparaison avec le témoin à l'aide du test de Student's t-test et des valeurs de p inférieures à 0,05 ont été retenues pour définir la significativité du traitement.

## Résultats

### Effet sur l'indice de stress $\text{DO}_{665}/\text{DO}_{665a}$

L'évolution de l'indice de stress est illustrée par la Figure 4.3.

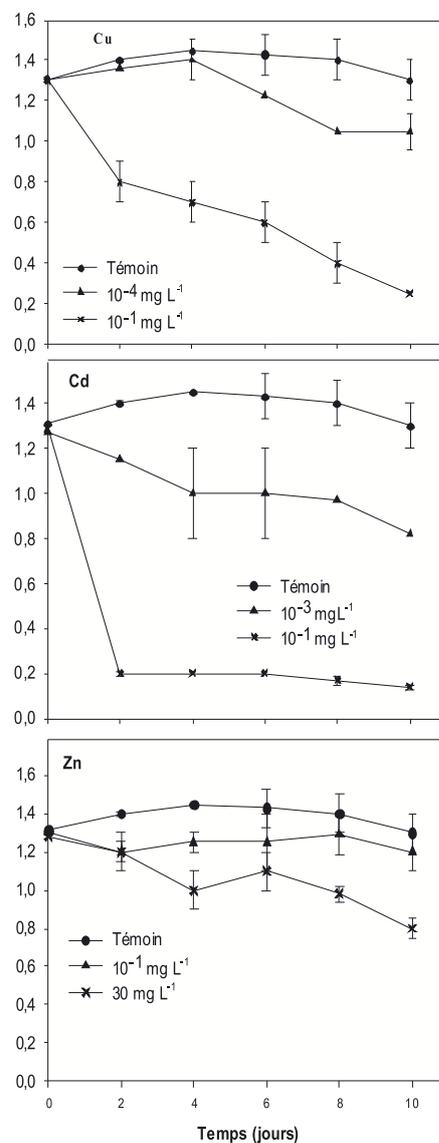


Figure 1.

Evolution de l'indice de stress ( $\text{DO}_{665}/\text{DO}_{665a}$ ) en fonction de temps (valeurs moyennes  $\pm$  écarts-types, n=3)

À partir de la Figure 1, nous avons noté une légère variation de l'indice de stress des colonies cultivées dans le milieu de culture sans contamination (1,3 à 1,4), tout au long de la durée de la culture (Figure 1).

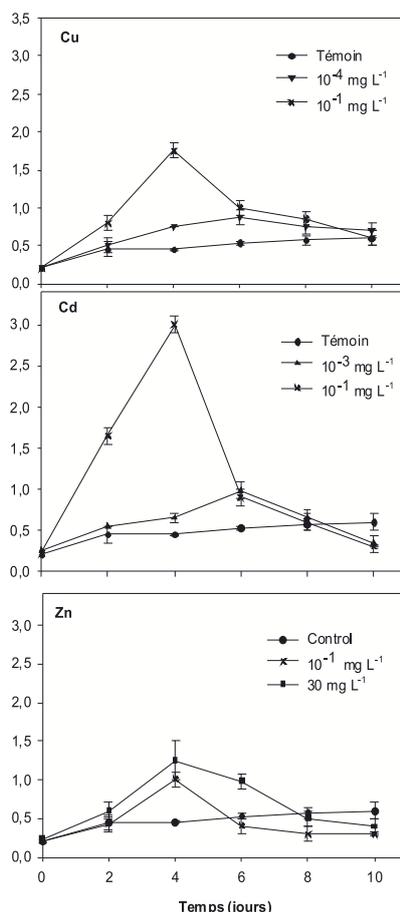
Pendant cette durée, de fortes diminutions de cet indice ont été engendrées par les métaux lourds testés et particulièrement aux concentrations élevées. Des réductions de 81% en présence du cuivre ( $p \leq 0,001$ ), 89% en présence du cadmium ( $p \leq 0,001$ ) et de 37,5% en présence du zinc ( $p = 0,025$ ) sont notées. À faibles teneurs en cuivre, en cadmium et en zinc, les diminutions d'indice de stress enregistrées durant toute la durée de traitement sont nettement faibles et égales à 19, 35 et 8%, respectivement.

### Effet sur la teneur en proline

L'évolution de la quantité de proline dans *L. gibba* cultivée dans les différents milieux de culture contaminés par le cuivre, le cadmium et le zinc, à différentes concentrations est illustrée par la Figure 2. La quantité de proline, dans les plantes cultivées dans les milieux témoins, a évolué lentement pendant la durée de culture (0,2 à 0,6  $\mu\text{mol g}^{-1}$  MF) soit une augmentation de 67%. Par ailleurs, nous constatons une augmentation de la teneur en proline, dans les plantes des milieux de cultures fortement contaminés, durant les quatre premiers jours de traitement, suivie d'une chute assez rapide pour atteindre des valeurs comparables aux témoins. En effet, après 4 jours d'exposition de la plante au cuivre, au cadmium et au zinc les taux de proline enregistrés sont : 1,75  $\mu\text{mol g}^{-1}$  MF en présence du cuivre à  $10^{-1}$  mg L $^{-1}$  ( $p \leq 0,001$ ) ; 3

$\mu\text{mol g}^{-1}$  MF en présence du cadmium à  $10^{-1}$  mg L $^{-1}$  ( $p \leq 0,001$ ) et 1,25  $\mu\text{mol g}^{-1}$  MF en présence du zinc à 30 mg L $^{-1}$  et une teneur de 0,45  $\mu\text{mol g}^{-1}$  MF dans le témoin.

Aux faibles concentrations en cuivre et cadmium, les teneurs maximales en proline sont observées après 6 jours (0,87  $\mu\text{mol g}^{-1}$  MF en présence du cuivre ; 0,98  $\mu\text{mol g}^{-1}$  MF en présence du cadmium à  $10^{-1}$  mg L $^{-1}$ ). Il apparaît donc, que le cadmium est le métal le plus influant sur l'évolution de la quantité de proline dans la plante où une teneur maximale de 3  $\mu\text{mol g}^{-1}$  MF a été observée après 4 jours d'expérience.



**Figure 2.** Teneurs en proline en fonction de temps (valeurs moyennes  $\pm$  écarts-types, n=3)

## Discussion

Le cuivre est un micronutriment essentiel pour un déroulement normal des processus métaboliques des plantes, par son rôle crucial dans plusieurs métallo-enzymes et dans la structure des membranes. Cependant, il a été cité dans plusieurs travaux comme le métal le plus toxique [16]. Sa forte accumulation dans les tissus de la plante affecte parfois significativement plusieurs processus physiologiques et biochimiques comme la réduction de l'activité photosynthétique [17,18], production des amino-acides [19,20]. À travers nos résultats, le cuivre s'avère toxique pour *L. gibba*.

En effet, un taux d'inhibition de la croissance variant entre 29 et 75% en présence de  $10^{-4}$  et  $10^{-1}$  mg L $^{-1}$  a été observé. Par comparaison des inhibitions de la croissance enregistrées aux réductions d'indices de stress, en présence du cuivre, nous pouvons conclure que les sensibilités sont similaires. Comparativement au cuivre, le ralentissement conséquent de la croissance causé par le cadmium a été accompagné par une baisse importante de l'indice de stress particulièrement à  $10^{-1}$  mg L $^{-1}$ . Les inhibitions du rapport  $DO_{665}/DO_{665a}$  sont de 89 et 86% après 10 et 2 jours de culture respectivement alors que les inhibitions de la croissance sont de 37 et 50% seulement. Dans ce cas, l'indice de stress peut être un bon biomarqueur pour l'évaluation de la toxicité du cadmium.

Physiologiquement, cette forte sensibilité indique que la dégradation de la pigmentation est un phénomène très rapide en réponse à la toxicité du cadmium.

Par ailleurs, les symptômes observés en présence du cuivre sont plus intenses en présence du cadmium avec un détachement des racines de quelques colonies.

Des chercheurs [21] ont signalé plusieurs symptômes de toxicité (plantes pâles et transparentes), observés sur des plantes cultivées dans des milieux contenant  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  de cadmium. Ces effets sont immédiatement (24 h d'exposition) observés en présence de forte concentration en cadmium ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ ). Contrairement aux deux autres métaux testés (Cd et Cu) l'effet du zinc sur la croissance (50 à 79% d'inhibition de la croissance) et sur l'indice de stress (une chute d'indice de 37%) n'est visible qu'aux fortes concentrations ( $> 4 \text{ mg L}^{-1}$ ) avec absence des symptômes. L'absence des symptômes a été rapportée [22], en présence de  $7,1 \text{ mg L}^{-1}$  de zinc.

Par ailleurs, Drost et al., [23] ont trouvé qu'après 7 jours d'exposition, le cadmium et le cuivre ont manifesté une forte toxicité pour *Lemna* ( $EC_{50}$  de 1,9 et  $9,7 \mu\text{M}$  respectivement), alors que le zinc a montré une faible toxicité ( $EC_{50}$  de 56,3 et  $46,1 \mu\text{M}$  respectivement). Il apparaît donc que le cadmium est le métal le plus toxique pour *L. gibba*, suivi par le cuivre puis le zinc.

L'implication de la proline dans les réponses des plantes au stress salin, au stress hydrique et aux faibles températures est connue depuis un temps relativement long [24,25,26]. Il est rapporté une augmentation de cet acide aminé comme réponse générale au stress dans les plantes [27]. Au cours de notre expérimentation, les trois métaux testés, ont provoqué une augmentation transitoire de la

proline dans la lentille *L. gibba*. La cinétique d'accumulation passe par un maximum après 04 jours de culture suivi d'une chute pour atteindre des quantités en proline proches à celles trouvées dans le témoin.

Les teneurs de la proline en présence de cadmium sont les plus élevées comparativement aux deux autres métaux. En effet, une augmentation rapide de la quantité de cet acide aminé, ayant atteint  $3 \mu\text{mol g}^{-1}$  MF (soit un taux d'augmentation de 567%),  $1,75 \mu\text{mol g}^{-1}$ .MF (soit une augmentation de 289%) et  $1,25 \mu\text{mol g}^{-1}$ .MF (soit une augmentation de 122%) a été constatée dans les milieux de culture contenant  $10^{-1} \text{ mg L}^{-1}$  de cadmium, de cuivre et de zinc respectivement.

Ceci confirme les résultats obtenus avec la croissance et l'indice de stress. L'accumulation de la proline en réponse à un excès de métaux tels que le cuivre, le cadmium, le zinc et nickel dans les plantes a été examinée par plusieurs chercheurs [26, 28]. Paradoxalement, les hydrophytes n'accumulent pas la proline alors que nos résultats et d'autres travaux ont décrit l'accumulation de cet acide aminé [29,30]. La cinétique d'accumulation se traduit généralement par une augmentation suivie d'une chute par contre l'instant correspondant au maximum est différent.

En effet, une augmentation rapide de la quantité de la proline dans *L. minor* soumise à  $10 \text{ mg L}^{-1}$  en zinc et  $5 \text{ mg L}^{-1}$  en cuivre, durant l'intervalle 12 à 24 h a été constatée par [31]. Bien que la plupart des métaux induit une accumulation de la proline, leur effets dépend du matériel végétal, du métal et de sa

concentration. Le cuivre, en concentration équimolaire, induit une forte accumulation de la proline dans *Silene vulgaris*, suivi par le cadmium et le zinc selon [32].

## Conclusion

À travers cette étude, l'ensemble des paramètres utilisés, pour évaluer la toxicité des trois métaux lourds vis-à-vis de la lentille d'eau *L. gibba*, ont montré que le cadmium est le plus toxique suivi par le cuivre et le zinc. L'indice de stress (*aDODO665665*) s'est avéré le plus sensible et par conséquent, il peut être proposé comme un très bon biomarqueur de la pollution métallique.

D'autre part, les amplitudes de changement de la quantité de la proline plus importantes, font de cet acide aminé un bon indicateur de la toxicité. Cependant, les transitions enregistrées au cours de son accumulation, sous l'effet des métaux, représentent un inconvénient majeur pour son utilisation comme unique biomarqueur

## Références bibliographiques

1. Zayed, A., Gowthaman, S., Terry, N., "Phytoaccumulation of traces elements by Wetland plants: I. Duckweed". J. Environ. Qual. 27, (1998), 715-721.
2. Qian, J.H., Zayed, A., Zhu, V.L., Yu, M., Terry, N., "Phytoaccumulation of traces elements by Wetland plants: III. Uptake and phytoaccumulation of ten trace elements by twelve plant species". J. Environ. Qual. 28, (1999), 1448-1455.

3. Gao, J., Garrison, A.W., Hoehamer, C., Mazur, C.S., Wolfe, N.L., "Uptake and phytotransformation of organophosphorus pesticides by axenically cultivated aquatic plants". *J. Agric. Food Chem.* 48, (2000), 6114–6120.
4. Cardwell, A., Hawker, D., Greenway, M., "Metal accumulation in aquatic macrophytes from Southeast Queensland, Australia". *Chemosphere*, 48, (2002), 653-663.
5. Wahaab, A.R., Lubberding, H.J., Alaerts, G.J. "Copper and chromium (III) uptake by duckweed". *Water Sci. Technol.* 32, (1995), 105-110.
6. Kähkönen, M.A., Manninen, P.G.K., "The uptake of nickel and chromium from water by *Elodea canadensis* at different nickel and chromium exposure levels". *Chemosphere*, 36, (1999), 1381-1390.
7. Dhir, B. P., Sharmila, P., Saradhi, P.P., "Hydrophytes lack potential to exhibit cadmium stress induced enhancement in lipid peroxidation and accumulation of proline". *Aquatic. Toxicol.* 66, (2004), 141-147.
8. Prasad, M.N.V., Malec, A., Waloszek, A., Bojka, M., Strzalka, K., "Physiological responses of *Lemna trisulca* L. (duckweed) to cadmium and copper bioaccumulation". *Plant Sci.* 161, (2001), 881-889.
9. Horvat, T., Vidaković-cifrek, Ž., Oreščanin, V., Tkalec, M., Pevalek-kozlina, B., "Toxicity assessment of heavy metal mixtures by *Lemna minor* L.". *Sci. Total Environ.*, 384, (2007), 229-238.
10. Lopez, J., Retuerto, R., Carballeira, A., "D665/D665a index vs. frequencies as indicators of bryophyte response to physicochemical gradients". *Ecology* 78, (1997), 261–271.
11. Mishra, V. M., Upadhyaya, A.R., Pandey, S.K., Tripathi, B.D., "Heavy metal induced due to coal mining effluent on surrounding aquatic system and its management through naturally occurring aquatic macrophytes". *Bioresource Technol.* 99, (2008b), 930-936.
12. Fujsawa, T., Kurosawa, M., Katagi, T., "Uptake and Transformation of Pesticide Metabolites by Duckweed (*Lemna gibba*)". *Agric. Food Chem.*, 54, (2006), 6286-6293.
13. Hoagland, D.R., Arnon, D.I., "The water culture method for growing plants without soil". *California Agriculture Experimental Station Circular* 347, Berkely, California, USA, 1938.
14. Lopez, J., Vazquez, M.D., Carballeira, A., "Stress responses and metal exchange kinetics following transplant of the aquatic moss *Fontinalis antipyretica* Hedw". *Freshwater Biol.* 32, (1994), 185–198.
15. Troll, W., Lindsley, J., "A photometric method for the determination of proline". *J. Biol. Chem.* 215, (1955), 655-660.
16. Li, T.Y., Xiong, Z.T., "A novel response of wild type duckweed (*Lemna paucicostata* Hegelm.) to heavy metals". *Environ. Toxicol.*, 19, (2004), 95-102.
17. Olette, R., Couderchet, M., Biagiatti, S., Eullaffroy, P., "Toxicity and removal of pesticides by selected aquatic plants". *Chemosphere*, 70, (2008), 1414-1421.
18. Frankart, C., Eullaffroy, P., Vernet, G., "Photosynthetic responses of *Lemna minor* exposed to xenobiotics, copper, and their combinations". *Ecotox. Environ. Safety.* 53, (2002), 439-445.
19. Llorens, N., Arola, L., Blade, C., Mas, A., "Effects of copper exposure up on nitrogen metabolism in tissue cultured *Vitis vinifera*". *Plant Sci.* 160, (2000), 159-163.
20. Mazen, A.M.A., "Accumulation of four metals in tissues of *Corchorus olitorius* and possible mechanisms of their tolerance". *Biol. Plant.* 48, (2004), 267-272.
21. Uysal, Y., Taner, F., "The effect of cadmium ions in the growth rate of the freshwater macrophyte duckweed *Lemna minor*". *Ekoloji*, 16, (2007), 9-15.
22. Ensley, H.E., Barber, J.T., Oliver, A.I., "Toxicity and metabolism of 2,4-dichlorophenol by the aquatic angiosperm *Lemna gibba*". *Environ. Toxicol. Chem.* 13, (1994), 325-331.
21. Uysal, Y., Taner, F., "The effect of cadmium ions in the growth rate of the freshwater macrophyte duckweed *Lemna minor*". *Ekoloji*, 16, (2007), 9-15.
22. Ensley, H.E., Barber, J.T., Oliver, A.I., "Toxicity and metabolism of 2,4-dichlorophenol by the aquatic angiosperm *Lemna gibba*". *Environ. Toxicol. Chem.* 13, (1994), 325-331.
23. Drost, W., Matzke, M., Backhaus, T., "Heavy metal toxicity to *Lemna minor*: Studies on the time dependence of growth inhibition and the recovery after exposure". *Chemosphere*, 67, (2007), 36-43

24. Chu, T. M., Aspinall, D., Paleg, L.G., “Stress metabolism. VI-temperature stress and accumulation of proline in barley”. *Aus. J. Plant Physiol.* 1, (1974), 89-97.
25. Aspinall, D., Paleg, L.G., “Proline accumulation: physiological aspects”. In: Paleg, L. G., Aspinall, D. (Eds), “The physiology and biochemistry of drought resistance in plants”. Academic Press, Sydney, Australia, (1981), 205–240.
26. Sharma, S.S., Diestz, K.J., “The significance of amino acids and amino acid-derived molecules in plant responses and adaptation to heavy metal stress”. *J. Exp. Bot.* 57, (2006), 711–726.
27. Ashraf, M., Foolad, M.R., “Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance”. *Environ. Exp. Bot.* 59, (2007), 206-216.
28. Alia, Pardha Saradhi, P., “Proline accumulation under heavy metal stress”. *J. Plant Physiol.* 138, (1991), 554–558.
29. Ashraf, M., Harris, P.J., “Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants”. *Plant Sci.*, 166, (2004), 3–16.
30. Mohan, B.S., Hosetti, B.B., “Potential phytotoxicity of lead and cadmium to *Lemna minor* grown in sewage stabilization ponds”. *Environ. Pollut.* 98, (1997), 233-238.
31. Bassi, R., Sharma, S. S., “Changes in proline content accompanying the uptake of zinc and copper by *Lemna minor*”. *Ann. Bot.* 72, (1993a), 151–154.
32. Shat, H., Sharma, S.S., Vooijs, R., “Heavy metal-induced accumulation of free proline in a metal-tolerant and non-tolerant ecotype of *Silene vulgaris*”. *Physiol. Plant.* 101, (1997), 477-482.