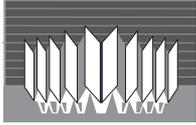


UNIVERSITÉ TUNIS EL MANAR



Faculté des Sciences de Tunis  
Département des sciences biologiques



Centre de Biotechnologie de Borj Cedria  
Laboratoire des Plantes Extrêmophiles



Montpellier SupAgro  
Ecole Doctorale: Systèmes Intégrés en Biologie,  
Agronomie, Géosciences, Hydrosociences et  
Environnement



Biochimie et Physiologie Moléculaire des Plantes,  
UMR CNRS/INRA/Université Montpellier II /SupAgro

## Thèse de doctorat

Discipline: Sciences Biologiques (Tunisie)

Discipline: Physiologie végétale et biologie moléculaire (France)

Formation doctorale: Biologie Intégrative des Plantes (France)

Ecole Doctorale: Systèmes Intégrés en Biologie, Agronomie,  
Géosciences, Hydrosociences et Environnement (France)

Présentée par  
**Walid ZORRIG**

**Recherche et caractérisation de déterminants  
contrôlant l'accumulation de cadmium chez la laitue  
"*Lactuca sativa*"**

Soutenue devant le jury composé de :

Professeur Mokthar LACHAAL	(Président du Jury)
Professeur Zeineb OUERGI ABIDI	(Rapporteur)
Professeur Sébastien THOMINE	(Rapporteur)
Professeur Anis LIMAMI	(Examineur)
Professeur Pierre BERTHOMIEU	(Directeur de thèse)
Professeur Chedly ABDELLY	(Directeur de thèse)







# DÉDICACES

*Afin d'être reconnaissant envers ceux qui m'ont appuyé et encouragé à effectuer ce travail de recherche, je dédie ce mémoire :*

*À mon très cher **Baba Hadj** pour son soutien moral, et pour tous les sentiments d'affection et d'amour qui représentent pour moi le pilier de tous mes efforts.*

*À ma très chère mère **Safwa** et à mon très cher père **Mohamed** qui n'ont cessé de me combler par leur amour et leur tendresse.*

*À tous les membres de ma famille sans aucune exception.*

*Et à tous ceux que ma réussite leur tient à cœur.*



## **Remerciements**

*Cette thèse de Doctorat a été réalisée dans le cadre d'une convention de cotutelle entre la Faculté des Sciences de Tunis et le Centre International d'Études Supérieures en Sciences Agronomiques Montpellier (SupAgro Montpellier) avec le soutien financier du Ministère tunisien de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique et de l'Agence Universitaire de la Francophonie (AUF). Les recherches qui font l'objet de ce mémoire ont été réalisées sur deux sites: en France, au sein de l'Unité mixte de recherche Biochimie et Physiologie Moléculaire des Plantes et en Tunisie, dans le Laboratoire des Plantes Extrêmophiles du Centre de Biotechnologie de Borj Cedria.*

Par ces quelques lignes, je tiens à remercier toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin au bon déroulement de cette thèse, en espérant n'avoir oublié personne...

Je tiens à remercier spécialement mon directeur de thèse français Pr Pierre BERTHOMIEU (directeur de l'équipe Adaptation des Plantes aux Métaux). Je vous remercie d'avoir cru en mes capacités, pour le temps et la patience que vous m'avez accordés tout au long de ces années en me fournissant d'excellentes conditions logistiques. Je garderai dans mon cœur votre générosité, votre compréhension et votre efficacité. Pour tout ce que vous m'avez donné, je vous remercie très sincèrement.

Je tiens à remercier mon directeur de thèse tunisien Pr Chedly ABDELLY (directeur du Laboratoire des Plantes Extrêmophiles) d'avoir bien assuré la direction et l'encadrement de mes travaux de thèse. Merci pour votre gentillesse, votre patience et vos précieux conseils. J'ai beaucoup apprécié travailler à vos côtés tant sur le plan scientifique que sur le plan humain. Je garde toujours beaucoup de plaisir à discuter avec vous et à bénéficier de vos conseils.

Je tiens à remercier mon ex-directeur de thèse Pr Jean-Claude DAVIDIAN, à qui j'adresse mes remerciements les plus sincères pour sa disponibilité, ses conseils, ses encouragements et ses qualités humaines.

Je remercie Pr Zeineb OUERGHI ABIDI et Pr Sébastien THOMINE d'avoir accepté de rapporter cette thèse. Vos remarques pertinentes et vos conseils précieux m'ont beaucoup aidé à améliorer la qualité de ce travail. Soyez assurés, chers professeurs, de mon estime et de ma profonde gratitude.

Mes sincères remerciements et ma gratitude vont aussi à Pr Mokthar LACHAAL pour avoir accepté de juger ce travail et d'en présider le jury de soutenance. Que vous soyez assuré de mon entière reconnaissance.

Merci également Monsieur le Professeur Anis LIMAMI (Université d'Angers - France) qui a accepté de juger ce travail en tant qu'examinateur. Je lui adresse mes sentiments les plus respectueux.



Je tiens à remercier Dr Brigitte MAISONNEUVE (INRA-Avignon - France), Dr Catherine SARROBERT (CEA de Cadarache - France) et Pr Richard MICHELMORE (UC Davis - USA) pour leur collaboration. Qu'ils trouvent ici ma profonde reconnaissance et mes profonds respects.

Je remercie très chaleureusement les membres et les ex-membres de l'équipe Adaptation des Plantes aux Métaux qui m'ont beaucoup aidé et encouragé : Françoise GOSTI, Laurence MARQUES, Odile RICHARD, Eric LACOMBE, Stéphanie LOUBET, Claude CHALIES, Perrine PAYET, Carole MAISONNEUVE, Katia PIANELLI, Christophe PINEAU, Ronald OOMEN, Julien ALASSIMONE, Aïda ROUACHED et mes chers Co-thésards Victor HERMAND et Zaigham SHAHZAD. Je leur souhaite tous une très belle aventure. Je remercie également tous les membres de l'unité mixte de recherche Biochimie et Physiologie Moléculaire des Plantes.

Je remercie aussi tous les membres du Laboratoire des Plantes Extrêmophiles pour la sympathie et l'aide qu'ils m'ont témoignées durant ces années de dur labeur.

Un très grand merci tout particulier à Dr Tahar GHNAYA, pour nos innombrables et inoubliables conversations sur le cadmium, toujours plus intéressantes, avec mes meilleurs souhaits pour la suite de sa carrière.

Je voudrai adresser ma reconnaissance à Dr Najoua KARRAY BOURAOUI et à Dr Houneida ATTIA HEDHILI, de l'Unité de Physiologie et Biochimie de la tolérance au sel des plantes, pour leurs qualités humaines et leurs encouragements illimités.

Un très grand merci à mon ami Mehdi JABNOUNE, pour nos innombrables moments avec mes meilleurs souhaits de réussite pour sa vie professionnelle et personnelle. Un grand merci aussi pour mes amis de Montpellier : Faten, Randa, Fida, Ali et Khader pour leur aide et leur soutien avec mes sincères vœux de réussite.



## Liste des abréviations

ABA: Acide abscissique	M: Mol/litre
ABC: ATP-Binding Cassette	MF: Masse fraîche
ADN = DNA: Acide désoxyribonucléique	Mg: Magnésium
ADNc = cDNA: Acide désoxyribonucléique complémentaire	Mn: Manganèse
ADNg: ADN génomique	Mo: Molybdène
APX = APOX: Ascorbate peroxydase	MS: Masse sèche
ARN: Acide ribonucléique	MT = MTs: Métallothionéine(s)
ARNm: Acide ribonucléique messenger	MTP: Metal Tolerance Protein
As: Arsenic	N: Azote
ATP: Adénosine 5'-triphosphate	n: Nombre d'échantillons
Ba: Baryum	Na: Sodium
BET: Bromure d'éthidium	Ni: Nickel
Ca: Calcium	NRAMP: Natural Resistance Associated Macrophage Protein
CAT: Catalase	p/v: Poids/volume
CAX: Calcium exchanger	P: Phosphore
Cd: Cadmium	pb: Paires de bases
CDF: Cation Diffusion Facilitator	Pb: Plomb
Cl: Chlore	PCR: Polymerase Chain Reaction = Réaction de polymérisation en chaîne
Co: Cobalt	PCRQ: PCR quantitative
CPM: Coups Par Minute	PCS = PS: Phytochélatine Synthetase
Cr: Chrome	PCs: Phytochélatines
Ct: Threshold Cycle	pH : Potentiel d'hydrogène
Cu: Cuivre	POD: Peroxydases
DCT1: Divalent Cation Transporter 1	ppm: Partie Par Million
DMT1: Divalent Metal Transporter 1	PSI: Photosystème I
DNase: Désoxyribonucléase	PSII: Photosystème II
dNTP: Didéoxynucléotides tri-phosphate	QTL: Quantitative Trait Locus
DO: Densité Optique	Rb: Rubidium
EDTA: Acide éthylène-diamine-tétraacétique	RNase: Ribonucléase
EST: Expressed Sequence Tag	ROS: Reactive Oxygen Species = Formes réactives de l'oxygène
Fe: Fer	RT-PCR: Reverse Transcriptase PCR
g: Gramme	Sb: Antimoine
Gb: Giga base	SDS: Sodium Dodécyl Sulfate
GDH: Glutamate déshydrogénase	Se: Sélénium
GFP: Green Fluorescent Protein	SFP: Single Feature Polymorphisms
GR: Glutathion Réductase	Si: Silicium
GS: Glutamine Synthase	SOD: Superoxyde dismutase
Hg: Mercure	Sr: Strontium
HMA: Heavy Metal ATPase	TAE: Tris Acétate EDTA
HMW: High Molecular Weight	Tm : Température de fusion
HPIC: High-Performance Ionic Chromatography	TRE = RWC: Teneur Relative en Eau = Relative Water Content
IARC: International Agency for Research on Cancer	v/v: Volume/volume
INRA: Institut National de la Recherche Agronomique	X-GAL: 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside
IPTG: Isopropyl $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside	YCF1: Yeast Cadmium Factor
IRT: Iron-Responsive Transporter	ZHF: Zinc Homeostasis Factor
j: Jour	ZIP: ZRT-IRT-like Proteins
K: Potassium	Zn: Zinc
Kb: Kilobase	ZNT: Zinc transporter
Kg: Kilogramme	ZRT: Zinc Regulated Transporter
l: Litre	$\gamma$ -ECS = $\gamma$ -GCS: $\gamma$ -glutamylcystéine synthase
LB: Luria Broth	
LCT1: Low Affinity Cation Transporter 1	
Li: Lithium	
LMW: Low Molecular Weight	



## Sommaire

Sommaire .....	1
Introduction .....	11
Chapitre I: Synthèse bibliographique .....	15
1. Les métaux lourds.....	15
2. Le cadmium .....	16
2.1. L'élément cadmium .....	16
2.2. La toxicité du cadmium et ses risques sur la santé humaine .....	16
2.2.1. La néphrotoxicité du cadmium.....	17
2.2.2. Effet du cadmium sur le système respiratoire .....	17
2.2.3. Effet du cadmium sur le système reproducteur .....	17
2.2.4. Effet du cadmium sur le système squelettique .....	17
2.2.5. La cancérogénicité du cadmium.....	18
2.3. Les végétaux: principale voie d'entrée du cadmium dans la chaîne alimentaire .....	18
3. Origines du cadmium dans le sol.....	20
3.1. Origine naturelle .....	20
3.2. Origine anthropique .....	20
3.2.1. Rejets d'origine industrielle .....	20
3.2.2. Les pratiques agricoles.....	21
3.2.2.1. Les pesticides et les fongicides .....	21
3.2.2.2. L'irrigation.....	21
3.2.2.3. Les matières fertilisantes .....	21
4. Facteurs influençant la biodisponibilité du cadmium dans le sol .....	21
4.1. Formes du cadmium dans le sol.....	22
4.2. Effet du pH .....	22
4.3. Effet de la matière organique.....	22
4.4. Effet des compétitions ou des synergies entre éléments chimiques .....	23
4.5. La température du sol .....	24
5. Cadmium et plantes .....	24
5.1. Phytotoxicité du cadmium .....	24
5.1.1. Effet du cadmium sur la croissance .....	24
5.1.2. Effet du cadmium sur le statut hydrique .....	25
5.1.3. Effets du cadmium sur la nutrition minérale .....	27
5.1.4. Effet du cadmium sur la photosynthèse .....	29
5.1.5. Induction d'un stress oxydatif par le cadmium.....	30
5.2. Réponses des plantes au cadmium .....	30
5.2.1. La chélation et la séquestration du cadmium .....	31
5.2.1.1. Les chélateurs spécifiques .....	31

5.2.1.1.1. Les phytochélatines .....	31
5.2.1.1.2. Les métallothionéines .....	33
5.2.1.1.3. Les autres chélateurs.....	33
5.2.1.2. La séquestration avec les antiports $Cd^{2+}/H^{+}$ .....	34
5.2.2. Autres stratégies de défense .....	34
5.3. Prélèvement, accumulation et transport du cadmium .....	35
5.3.1. Prélèvement via la voie atmosphérique.....	35
5.3.2. Prélèvement racinaire du cadmium .....	36
5.3.2.1. Les espèces de cadmium prélevées par les racines.....	36
5.3.2.2. Les mécanismes de prélèvement racinaire .....	36
5.3.3. Accumulation du cadmium .....	37
5.3.3.1. Variabilité interspécifique d'accumulation de cadmium.....	37
5.3.3.2. Variabilité intraspécifique d'accumulation de cadmium.....	37
5.3.3.3. Variabilité d'accumulation de cadmium entre les organes .....	38
5.3.3.4. Accumulation du cadmium à l'échelle cellulaire .....	38
5.3.4. Transport du cadmium à longue distance.....	39
5.3.5. Systèmes de transport.....	40
5.3.5.1. Les transporteurs pouvant transporter le cadmium.....	40
5.3.5.1.1. LCT1 .....	40
5.3.5.1.2. Les transporteurs de la famille ZIP .....	42
5.3.5.1.3. Les transporteurs de la famille NRAMP.....	42
5.3.5.1.4. Les transporteurs de la famille ABC .....	43
5.3.5.1.5. Les transporteurs de la famille CAX .....	44
5.3.5.1.6. Les transporteurs de la famille CDF .....	44
5.3.5.1.7. Les transporteurs P-type ATPase de la famille HMA .....	44
5.3.5.2. Les canaux calciques .....	46
6. La laitue .....	46
6.1. Présentation .....	46
6.2. Les différents cultigroupes de laitue .....	47
6.3. Biologie florale de la laitue.....	49
6.4. La production des hybrides.....	52
6.5. Ressources génomiques .....	52
6.6. Ressources génétiques .....	53
6.7. La laitue: espèce "à risque" .....	53
Chapitre II Matériels et méthodes .....	57
1. Matériel végétal .....	57
2. Conditions de culture.....	57
3. Récolte des plantes .....	58
4. Extraction et dosage des ions minéraux.....	58
4.1. Extraction et dosage des cations .....	58

4.2. Extraction et dosage des anions majeurs.....	58
5. Détermination des paramètres physiologiques .....	60
5.1. Paramètres de croissance .....	60
5.1.1. Production de la biomasse.....	60
5.1.2. Croissance relative .....	60
5.2. Paramètres hydriques.....	60
5.3. Détermination des teneurs ioniques.....	60
5.3.1. La teneur des éléments.....	60
5.3.2. Translocation des éléments des racines vers les parties aériennes .....	61
6. Technique de production des hybrides .....	61
7. Mesure de l'influx, de l'efflux et de la translocation des racines vers les parties aériennes du cadmium marqué <sup>109</sup> Cd.....	61
7.1. Mesure de l'efflux racinaire et de la translocation.....	61
7.2. Mesure de l'influx racinaire.....	63
8. Techniques de biologie moléculaire .....	63
8.1. Extraction d'ADN génomique.....	63
8.2. Dosage de l'ADN et de l'ARN.....	64
8.3. Amplification des séquences par PCR.....	64
8.4. Séparation de l'ADN par électrophorèse .....	65
8.5. Purification de l'ADN à partir d'un produit PCR.....	65
8.6. Purification de l'ADN à partir d'un gel d'agarose .....	65
8.7. Souche bactérienne et culture .....	65
8.8. Clonage des produits PCR.....	66
8.9. Extraction d'ADN plasmidique .....	68
8.10. La PCR quantitative.....	68
8.10.1. Principe de la PCR quantitative .....	68
8.10.2. Extraction des ARNs totaux.....	73
8.10.3. Traitement à la DNase .....	75
8.10.4. Séparation des ARNs par électrophorèse .....	75
8.10.5. Transcription inverse.....	75
8.10.6. Définition des amorces pour la PCR quantitative .....	76
8.10.7. Protocole de la PCR quantitative .....	76
8.10.8. Normalisation des données .....	77
9. Outils d'analyse bioinformatique .....	77
9.1. Alignements de séquences .....	77
9.2. Construction des arbres de relation.....	78
10. Outils de calcul et de présentation graphique .....	78
11. Outils d'analyse statistique .....	78
Chapitre III: Analyse de la diversité phénotypique de tolérance au cadmium et d'accumulation de cadmium au sein de l'espèce laitue .....	81

1. Introduction .....	81
2. Protocole expérimental .....	81
3. Résultats .....	82
3.1. Effet du cadmium sur la production de la biomasse .....	82
3.2. Analyse de l'accumulation de cadmium .....	85
3.2.1. Analyse des teneurs en cadmium .....	85
3.2.2. Translocation de cadmium des racines vers les parties aériennes .....	89
4. Discussion .....	90
Chapitre IV: Recherche des déterminants physiologiques contrôlant l'accumulation du cadmium chez les lignées les plus extrêmes .....	97
1. Introduction .....	97
2. L'effet du cadmium sur la production de la biomasse et le statut hydrique .....	98
2.1. Introduction .....	98
2.2. Protocole expérimental .....	98
2.3. Résultats.....	98
2.3.1. Effet du cadmium sur la production de la biomasse .....	98
2.3.2. Effet du cadmium sur l'hydratation des plantes .....	104
2.4. Discussion.....	104
3. Effet du cadmium sur la nutrition minérale .....	107
3.1. Introduction .....	107
3.2. Protocole expérimental .....	107
3.3. Résultats.....	108
3.3.1. Analyse de l'accumulation de cadmium .....	108
3.3.2. Analyse de la translocation de cadmium des racines vers les parties aériennes .....	108
3.3.3. Analyse de l'accumulation du calcium .....	110
3.3.4. Analyse de l'accumulation et de la translocation de potassium .....	112
3.3.5. Analyse de l'accumulation de zinc .....	114
3.3.6. Analyse de la translocation de zinc des racines vers les parties aériennes .....	116
3.4. Discussion.....	116
4. Effets du cadmium sur l'accumulation des anions majeurs .....	126
4.1. Introduction .....	126
4.2. Protocole expérimental .....	126
4.3. Résultats.....	127
4.4. Discussion.....	131
5. Effet du calcium sur l'accumulation de cadmium .....	131
5.1. Introduction .....	131
5.2. Protocole expérimental .....	132
5.3. Résultats.....	132
5.4. Discussion.....	134
6. Effet du fer sur l'accumulation du cadmium .....	136

6.1. Introduction .....	136
6.2. Protocole expérimental .....	137
6.3. Résultats.....	137
6.4. Discussion.....	139
7. Mesure de l'influx, de l'efflux et de la translocation des racines vers les parties aériennes du cadmium marqué <sup>109</sup> Cd.....	140
7.1. Introduction .....	140
7.2. Protocole expérimental .....	141
7.3. Résultats.....	141
7.4. Discussion.....	144
Chapitre V: Étude des déterminismes génétiques de la tolérance au cadmium, de l'accumulation de cadmium et de la translocation du cadmium des racines vers les parties aériennes .....	149
1. Introduction .....	149
2. Analyse des plantes F1 .....	150
2.1. Protocole expérimental .....	150
2.2. Résultats.....	152
2.2.1. Aspect morphologique des plantes hybrides F1 .....	152
2.2.2. La tolérance au cadmium .....	159
2.2.3. L'accumulation de cadmium.....	159
2.2.4. La translocation du cadmium des racines vers les parties aériennes .....	161
3. Analyse des plantes F2 .....	161
3.2. Accumulation de cadmium .....	163
3.2.1. Phénotypage de la population F2 .....	163
3.2.1.1. Protocole expérimental.....	163
3.2.1.2. Résultats .....	163
3.2.2. Cartographie des gènes impliqués dans l'accumulation de cadmium .....	165
3.3. Translocation du cadmium et du zinc des racines vers les parties aériennes .....	165
3.3.1. Introduction.....	165
3.3.2. Protocole expérimental .....	166
3.3.3. Résultats.....	166
3.3.3.1. Translocation du cadmium des racines vers les parties aériennes .....	166
3.3.3.2. Translocation du zinc des racines vers les parties aériennes .....	168
4. Discussion .....	171
Chapitre VI: Recherche des gènes candidats impliqués dans le contrôle de l'accumulation de cadmium .....	177
1. Introduction .....	177
2. Recherche bibliographique des gènes contrôlant l'accumulation de cadmium .....	177
3. Recherche des séquences des orthologues aux gènes candidats chez la laitue .....	178
3.1. Recherche de séquences de laitue dans les bases de données .....	179
3.1.1. Recherche des séquences des gènes contrôle .....	179

3.1.2. Recherche de séquences de laitue orthologues aux gènes candidats dans les bases de données .....	179
3.2. Identification et clonage par PCR des gènes de laitue orthologues aux gènes contrôle et aux gènes d'intérêt.....	180
3.2.1. Clonage des gènes candidats.....	181
3.2.1.1. Les premiers essais de clonage des gènes candidats .....	181
3.2.1.2. Les deuxièmes essais de clonage des gènes candidats .....	181
3.2.1.2.1. Recherche bioinformatique des gènes candidats chez les espèces dont le génome est entièrement séquencé autres que les Brassicacées .....	182
3.2.1.2.1.1. Les transporteurs de la famille HMA.....	182
3.2.1.2.1.2. Les transporteurs de la famille ZIP .....	183
3.2.1.2.1.3. Les transporteurs de la famille ABC.....	188
3.2.1.2.2. Clonage des gènes <i>LsHMA</i> , <i>LsPDRs</i> et <i>LsIRTs</i> identifiés dans les banques de données.....	189
3.2.2. Clonage des gènes contrôle.....	189
3.2.3. Séquences des gènes chez d'autres variétés de laitue .....	189
3.2.4. Conclusion .....	194
4. Étude de l'expression des gènes candidats chez la laitue .....	195
4.1. Introduction .....	195
4.2. Protocole expérimental .....	195
4.3. Résultats.....	198
4.3.1. Expériences préliminaires.....	198
4.3.1.1. Vérification de l'intégrité et de la pureté des ARNs.....	198
4.3.1.2. Vérification de la réussite de la transcription inverse.....	198
4.3.1.3. Vérification de la qualité d'amplification et la spécificité des amorces .....	200
4.3.1.4. Vérification de la qualité de l'amplification et du niveau d'expression par PCR quantitative.....	200
4.3.2. L'étude d'expression des gènes chez les plantes des 14 variétés de laitue .....	204
4.3.2.2. Choix du gène contrôle .....	204
4.3.2.2. Comparaison entre les niveaux d'expression des gènes candidats.....	205
4.3.2.3. Corrélations entre les niveaux d'expression des gènes candidats et l'accumulation des métaux.....	205
5. Discussion .....	207
Conclusions générales et perspectives.....	219
1. Conclusions générales .....	219
1.1. Analyse de la diversité phénotypique de tolérance au cadmium et d'accumulation de cadmium au sein de l'espèce laitue .....	219
1.2. Recherche des déterminants physiologiques contrôlant l'accumulation du cadmium chez la laitue .....	220

1.3. Étude des déterminismes génétiques de la tolérance au cadmium, de l'accumulation de cadmium et de la translocation du cadmium des racines vers les parties aériennes.....	222
1.4. Recherche des gènes candidats impliqués dans le contrôle de l'accumulation de cadmium ....	224
2. Perspectives .....	226
Références bibliographiques.....	231
Annexes .....	247
Publications .....	251



## Introduction



## Introduction

Les activités humaines agricoles, urbaines et industrielles, sans cesse croissantes, sont à l'origine d'une contamination de notre environnement par les métaux lourds. Alors que de nombreuses molécules organiques peuvent être dégradées, les métaux lourds ne le peuvent pas et leur concentration augmente régulièrement dans les sols et les eaux. Ceci expose les plantes à des concentrations croissantes de métaux lourds.

L'accumulation de métaux lourds dans les plantes présente un risque toxique pour l'Homme, car les plantes cultivées sont le point d'entrée dans la chaîne alimentaire. Par comparaison aux autres espèces, la laitue a tendance à présenter des teneurs élevées en cadmium, un métal lourd très toxique dont la concentration croît régulièrement dans les sols cultivés pour des raisons environnementales. En termes de sécurité alimentaire, il est donc important de produire des variétés accumulant des teneurs en cadmium réduites, et la laitue est un bon modèle pour débiter ce type d'approche.

L'objectif de la thèse était de caractériser aux niveaux physiologique, génétique, et moléculaire, les déterminants majeurs contrôlant l'accumulation du cadmium chez la laitue. Notre objectif a été décliné en différentes opérations. Tout d'abord une analyse de diversité nous a permis de décrire la capacité d'accumulation de cadmium de 18 génotypes de laitue et de sélectionner des génotypes présentant des performances extrêmes vis-à-vis du cadmium. Ces génotypes ont été utilisés pour développer une approche physiologique et une approche génétique. L'approche physiologique avait pour objectif de caractériser l'origine de la différence d'accumulation de cadmium observée entre les génotypes. L'approche génétique a visé à préciser le déterminisme, simple ou complexe, des caractères contrôlant l'accumulation de cadmium chez la laitue. Notre analyse a été complétée par une analyse moléculaire dont l'objectif était de déterminer si des corrélations peuvent être établies entre les teneurs tissulaires de cadmium mesurées chez les génotypes de laitue et les niveaux d'expression de gènes décrits chez des espèces modèles comme des déterminants du contrôle de l'accumulation de cadmium.



## Chapitre I:

# Synthèse bibliographique



## Chapitre I: Synthèse bibliographique

### 1. Les métaux lourds

Les métaux lourds sont définis comme étant les éléments métalliques ayant une densité supérieure à  $5 \text{ g/cm}^3$  : cadmium, mercure, plomb, cuivre, nickel, zinc, cobalt, manganèse, chrome... Ceux-ci sont présents le plus souvent dans l'environnement sous forme de traces. Les plus toxiques d'entre eux sont le cadmium, l'arsenic, le plomb et le mercure. Ces éléments sont présents naturellement dans la croûte terrestre et dans tout organisme vivant, à des concentrations variables suivant les milieux et les organismes.

Dans la croûte terrestre, les métaux lourds sont présents sous forme de minerai, d'où ils peuvent être mobilisés par des phénomènes naturels comme l'érosion ou les éruptions volcaniques, mais également par des activités anthropiques. Ces dernières sont dues aux rejets physiques liés aux activités métallurgiques et minières et aux rejets de produits en fin de vie tels que les piles et batteries. Les émissions atmosphériques constituent également une source importante de pollution par les métaux lourds. Alors que de nombreuses molécules organiques peuvent être dégradées, les métaux lourds ne le peuvent pas et leur concentration augmente régulièrement dans les sols et les eaux.

Chez les végétaux, certains métaux lourds sont indispensables aux processus physiologiques majeurs, en particulier la respiration, la photosynthèse ou l'assimilation des macronutriments (Cu, Zn, Ni, Fe, Co) (Kabata-Pendias et Pendias, 2001). Certains de ces métaux sont aussi impliqués dans les processus moléculaires tels que le contrôle de l'expression des gènes, la biosynthèse des protéines, des acides nucléiques, des substances de croissance, de la chlorophylle et des métabolites secondaires, le métabolisme lipidique ou la tolérance au stress (Rengel, 1999). En outre, certains métaux lourds peuvent se présenter sous différents états d'oxydation ( $\text{Cu}^{2+} + e^- \rightarrow \text{Cu}^+$ ). Ils jouent ainsi un rôle d'accepteurs ou de donneur d'électrons, très important dans les multiples systèmes enzymatiques mettant en jeu des réactions d'oxydoréduction (Chaignon, 2001). Pour autant, les métaux lourds n'ont pas tous une

fonction connue à ce jour dans le métabolisme de la plante et certains sont considérés comme des éléments toxiques (Hg, Cr, Ni, Pb et Cd) (Kabata-Pendias et Pendias, 2001). Tous les métaux lourds peuvent, à partir d'une concentration seuil, induire une toxicité chez les plantes.

L'exposition excessive aux métaux lourds peut conduire à des effets très néfastes sur la santé humaine. Or les produits végétaux sont à la base de la chaîne alimentaire donc ils contribuent à l'imprégnation de l'homme par ces métaux lourds, d'où l'intérêt d'étudier et de contrôler l'accumulation des métaux lourds dans les végétaux.

## **2. Le cadmium**

### **2.1. L'élément cadmium**

Le cadmium est un métal blanc argenté avec des teintes de bleu appartenant à la famille des métaux de transition. Le cadmium élémentaire a un numéro atomique de 48 et une masse atomique de 112,4 g/mol.

Le cadmium se trouve souvent associé dans les roches aux éléments du même groupe, comme le zinc et le mercure. La valence  $Cd^{2+}$  est la valence la plus souvent rencontrée dans l'environnement et est vraisemblablement la seule valence du cadmium dans les systèmes aqueux (McLaughlin et Singh, 1999).

Le cadmium n'est pas essentiel au développement des organismes animaux ou végétaux. En revanche, ses propriétés physiques et chimiques, proches de celles du zinc et du calcium, lui permettent de traverser les barrières biologiques et de s'accumuler dans les tissus.

### **2.2. La toxicité du cadmium et ses risques sur la santé humaine**

On identifie le cadmium comme un polluant extrêmement toxique (Godt et *al.*, 2006). Quelle que soit son origine, le cadmium présent dans le sol ne se décompose ni par voie chimique, ni par voie biologique. Il est accumulé dans les strates superficielles des sols et peut être entraîné par les eaux de ruissellement pour atteindre les nappes phréatiques profondes. Dans le cas d'une accumulation du cadmium dans les strates superficielles des sols, il peut être absorbé par les plantes, ce qui représente un problème majeur pour la santé humaine. Une exposition au cadmium entraîne un grand nombre d'effets nocifs, les lésions rénales et le cancer figurant parmi les plus graves (Godt et *al.*, 2006).

### 2.2.1. La néphrotoxicité du cadmium

Le rein semble être l'organe le plus touché par les méfaits du cadmium (Barbier et *al.*, 2005). Le cadmium atteint le rein sous la forme de complexe cadmium-métallothionéines. Ce complexe est filtré dans le glomérule et est réabsorbé plus tard par le tubule proximal. La quantité de cadmium dans les cellules tubulaires augmente, en provoquant des perturbations des métabolismes phosphorés et calciques, des dommages tubulaires et glomérulaires, une protéinurie et une haute excrétion de calcium induisant un grand risque d'avoir des calculs rénaux (Svartengren et *al.*, 1986).

### 2.2.2. Effet du cadmium sur le système respiratoire

Le cadmium affecte sévèrement le système respiratoire. Il provoque des troubles respiratoires et des œdèmes pulmonaires ainsi qu'une destruction des muqueuses (Seidal et *al.*, 1993). L'inhalation d'une fumée contenant  $1 \text{ mg m}^{-3}$  de cadmium peut mener à de ces graves problèmes respiratoires (WBG, 1998). Cependant, les mêmes problèmes peuvent survenir si l'individu s'expose à des faibles concentrations de cadmium pendant une longue période ( $20 \text{ } \mu\text{g m}^{-3}$  pendant 20 ans) (WHO, 2000).

### 2.2.3. Effet du cadmium sur le système reproducteur

Le cadmium semble interférer avec la voie stéroïdogénique ovarienne. De faibles concentrations de cadmium stimuleraient la biosynthèse ovarienne de progestérone alors que des concentrations élevées la bloqueraient (Henson et Chedrese, 2004). L'exposition des femmes enceintes au cadmium est associée à un poids de naissance faible et à une augmentation de l'avortement spontané (Frery et *al.*, 1993). Le cadmium pourrait également exercer un puissant effet "œstrogénique" *in vivo* et avoir des effets décelables en provoquant un développement mammaire et utérin à des concentrations comparables à celles mesurées dans l'environnement (Johnson et *al.*, 2003).

### 2.2.4. Effet du cadmium sur le système squelettique

Plusieurs études ont montré une forte relation entre l'intoxication par le cadmium et des dommages osseux. Le cadmium est impliqué dans les occurrences de la maladie d'Itai-Itai qui présente comme symptômes la diminution de la minéralisation des os, des taux élevés d'ostéoporose et une douleur osseuse (Kazantzis, 1979).

### **2.2.5. La cancérogénicité du cadmium**

Il existe plusieurs preuves de la cancérogénicité du cadmium, notamment en ce qui concerne le cancer rénal chez l'Homme (Kolonel, 1976; Il'yasova, 2005). L'IARC (International Agency for Research on Cancer) a en conséquence classifié le cadmium comme un élément carcinogène du groupe I. Les mécanismes moléculaires de la carcinogénèse induite par le cadmium ne sont pas encore compris. On peut cependant citer que la régulation de la signalisation mitogène est altérée par le cadmium, ainsi que les mécanismes de réparation et d'acquisition d'une résistance apoptotique (Goyer et *al.*, 2004).

### **2.3. Les végétaux: principale voie d'entrée du cadmium dans la chaîne alimentaire**

Les végétaux sont la principale voie d'entrée de la chaîne alimentaire. La pollution, à la fois de l'air et des sols, expose les végétaux à des concentrations croissantes de cadmium (Mensch et Baize, 2004). En effet, entre 1 et 5% des produits cultivés de certaines espèces végétales dépassent la concentration maximale réglementaire en cadmium (Mensch et Baize, 2004). Une analyse des concentrations des métaux lourds dans les produits alimentaires en France (Leblanc et *al.*, 2004) montre que la contribution des végétaux dans la contamination alimentaire est importante, dépassant même 60 % de la totalité ingérée dans le cas du cadmium pour des individus non-fumeurs (Tableau 1.1). Ces valeurs sont évidemment dépendantes des habitudes alimentaires et peuvent varier suivant les groupes de population. Ces données qui confirment des résultats précédents (Decloître, 1998), démontrent l'intérêt d'étudier et de contrôler l'accumulation des métaux lourds dans les végétaux.

Le niveau d'accumulation de cadmium varie considérablement entre espèces comestibles (Tableau 1.2). Cette variabilité peut être naturellement expliquée par les conditions de cultures, mais aussi par une variabilité interspécifique, laquelle concerne notamment le niveau d'accumulation dans les différents organes.

**Tableau 1.1. Part des produits végétaux dans l'exposition totale aux métaux lourds pour deux catégories de la population** (Leblanc et *al.*, 2004)

	Arsenic (As)		Cadmium (Cd)		Mercure (Hg)		Plomb (Pb)		Antimoine (Sb)	
	enfants <sup>(a)</sup>	adultes <sup>(b)</sup>	enfants	adultes	enfants	adultes	enfants	adultes	enfants	adultes
%	21	22	66	62	39	39	41	48	46	46

(a) les individus âgés de 3 à 14 ans

(b) les individus âgés de 15 ans et plus

**Tableau 1.2. Gammes de concentrations de cadmium observées dans les organes consommés de différents végétaux**

D'après Denaix (2007)

Végétal	Origine de l'étude <sup>(0)</sup>	Cadmium (Cd) mg/kg MS
Blé	Grande Bretagne <sup>(5)</sup>	0,004 - 0,31
	France <sup>(3)</sup>	0,01 - 0,17
Blette	Suisse <sup>(1)</sup>	0,06 - 6,3
Carotte	Suisse <sup>(1)</sup>	0,08 - 1,35
	Canada <sup>(2)</sup>	0,21 - 0,50
	Suède <sup>(4)</sup>	0,06 - 0,87
	Nouvelle Zélande <sup>(6)</sup>	0,12 - 1,91
Chou-fleur	Canada <sup>(2)</sup>	0,09 - 0,10
Chou	Canada <sup>(2)</sup>	0,06 - 0,12
Haricots verts	Suisse <sup>(1)</sup>	0,007 - 0,07
	Suisse <sup>(1)</sup>	0,28 - 2,43
	Canada <sup>(2)</sup>	0,28 - 0,39
Laitue	Nouvelle Zélande <sup>(6)</sup>	0,27 - 4,49
	Canada <sup>(2)</sup>	0,03 - 0,05
Maïs	Canada <sup>(2)</sup>	0,03 - 0,05
Navet	Canada <sup>(2)</sup>	0,17 - 0,18
Pomme de terre	Canada <sup>(2)</sup>	0,05 - 1,74
Poireau	Suisse <sup>(1)</sup>	0,51 - 0,73

(0) Tous les échantillons ont été collectés en plein champ sur des sites agricoles non contaminés

(1) (Coullery, 1997), (2) (De Pieri et *al.*, 1996; De Pieri et *al.*, 1997), (3) Sappin-Didier et *al.*, 2002, (4) (Oborn et *al.*, 1995), (5) (Chaudri et *al.*, 1995), (6) (Gray et *al.*, 1999).

D'après le tableau 1.2, ainsi que d'après plusieurs autres travaux (Mensch et Baize, 2004; Alexander et *al.*, 2006), la laitue fait partie des espèces comestibles les plus accumulatrices de cadmium. Elle est donc un bon modèle d'étude, non seulement pour étudier le déterminisme de l'accumulation de cadmium dans les tissus végétaux, mais aussi pour élaborer des stratégies d'amélioration variétale limitant l'accumulation de cadmium dans une espèce cultivée.

### **3. Origines du cadmium dans le sol**

#### **3.1. Origine naturelle**

Naturellement, le cadmium n'est pas très abondant dans la croûte terrestre. Dans les sols non pollués, le contenu en cadmium est généralement entre 0,1 et 2 ppm et la plupart du temps il est inférieur à 1 ppm (Kabata-Pendias et *al.*, 2001). Les processus naturels d'érosion et d'altération de la roche mère, ainsi que le transport par les fleuves et dans l'air des particules contribuent au cycle naturel du cadmium. Le volcanisme de surface et sous-marin participe aussi à la libération du cadmium dans l'environnement.

#### **3.2. Origine anthropique**

Les pratiques humaines (agricoles ou industrielles) conduisent aussi à l'enrichissement des sols en cadmium:

##### **3.2.1. Rejets d'origine industrielle**

Les retombées atmosphériques provenant de l'activité industrielle et du trafic urbain contribuent à la pollution des sols et des eaux de surface et souterraines. Ces retombées représentent une source principale de contamination par le cadmium dans les zones urbaines (He et *al.*, 2005a).

Le rejet des déchets industriels contribue aussi à la pollution des sols et des eaux par le cadmium. Il s'agit essentiellement du cadmium renfermé dans des déchets industriels variés stockés sur des anciennes friches industrielles ainsi que cadmium contenu dans les produits en fin de vie comme les batteries et les piles à Cd/Ni ou de celui existant dans des effluents liquides issus des usines.

### **3.2.2. Les pratiques agricoles**

#### **3.2.2.1. Les pesticides et les fongicides**

Les produits chimiques utilisés en agriculture, tel que les fongicides, les insecticides, les herbicides peuvent contenir plusieurs métaux toxiques comme Cu, Cd, Zn et Pb et peuvent donc contribuer à la contamination des terres agricoles (He et *al.*, 2005a). Néanmoins, durant ces dernières années, conscients du risque avéré de ces produits chimiques, plusieurs gouvernements ont émis des réglementations limitant la présence de métaux lourds dans ces produits.

#### **3.2.2.2. L'irrigation**

Les eaux usées, domestiques et industrielles, contiennent souvent du cadmium à des concentrations plus élevées que les eaux normales. L'utilisation répétée d'eaux usées en agriculture peut donc contribuer à l'accumulation de ce métal dans les sols (He et *al.*, 2005a).

#### **3.2.2.3. Les matières fertilisantes**

L'enrichissement des sols en engrais minéraux contaminés par du cadmium, essentiellement les phosphates, constitue une autre source de pollution des sols agricoles. En effet, les teneurs en Cd<sup>2+</sup> des engrais phosphatés sont dans la plupart des cas supérieures aux normes. Certains engrais phosphatés contiennent plus de 50 mg de Cd / Kg (Mortvedt et Beaton, 1995). En Tunisie, le cadmium est très répandu dans les phosphates naturels qui contiennent plus de 30 mg Cd / Kg (Beji Sassi et Sassi, 1999; Van Kauwenbergh, 1997).

Outre leur richesse en matière organique pouvant constituer un apport intéressant en éléments essentiels (N, P et K) pour les sols, les boues d'épuration et les composts des déchets urbains et industriels renferment du cadmium à des niveaux parfois élevés. L'utilisation de ces engrais insuffisamment purs en agriculture est une des causes de la pollution des sols par le cadmium (McBride, 2004).

### **4. Facteurs influençant la biodisponibilité du cadmium dans le sol**

La biodisponibilité d'un métal signifie son accessibilité pour les organismes vivants. Plusieurs paramètres physico-chimiques comme la forme du cadmium dans le sol, le pH du sol, le potentiel redox ainsi que la richesse du sol en colloïdes organiques ou minéraux peuvent jouer un rôle important dans la biodisponibilité du Cd dans la

solution du sol et donc dans sa biodisponibilité pour les organismes vivants.

#### 4.1. Formes du cadmium dans le sol

En l'absence de ligands organiques les principales formes du cadmium présentes dans la solution du sol sont  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{CdSO}_4^0$ ,  $\text{CdCO}_3$ ,  $\text{CdCl}^+$  et  $\text{CdHCO}_3^+$  (Sposito, 1989). Cependant,  $\text{Cd}^{2+}$  peut former des complexes avec les principaux acides organiques carboxyliques (acide citrique, oxalique, malique) susceptibles de se trouver dans les zones superficielles des sols cultivés. Ces associations modifient son comportement aux interfaces et peuvent faciliter, dans certaines conditions son entraînement avec la phase liquide. Dans les sols calcaires, la faible solubilité du carbonate de cadmium ( $\text{CdCO}_3$ ) limite fortement la concentration de l'ion libre ( $\text{Cd}^{2+}$ ) en solution du sol. Dans ce cas, les carbonates ( $\text{CaCO}_3$ ,  $(\text{Ca}_x, \text{Mg}_y)\text{CO}_3\dots$ ) constituent également une phase de sorption dominante qui contrôle la distribution de l'élément cadmium et sa biodisponibilité dans le milieu (McBride, 1980).

#### 4.2. Effet du pH

Le pH du sol est l'un des paramètres majeurs influençant la biodisponibilité du cadmium et donc son transfert vers les plantes (Kirkham, 2006). Plusieurs chercheurs ont en effet montré que les faibles valeurs de pH favorisent l'accumulation de Cd dans les tissus végétaux (Waisberg et al., 2004 ; Tsadilas et al., 2005 ; Yanai et al., 2006). Tudoreanu et Phillips (2004) ont même montré l'existence d'une relation linéaire entre le pH du sol et l'absorption du cadmium. Ceci pourrait être expliqué par le fait qu'à faible pH, les protons  $\text{H}^+$  qui sont en concentration élevée dans la solution du sol vont se fixer sur les colloïdes à la place des ions métalliques ce qui augmente la concentration des ions  $\text{Cd}^{2+}$  libres accessibles pour l'absorption racinaire.

#### 4.3. Effet de la matière organique

La biodisponibilité du cadmium dépend non seulement de la forme du cadmium et du pH mais aussi de la richesse du sol en matière organique. Sauvé et al. (2003) ont montré que la rétention du Cd par le sol était 30 fois plus élevée dans un sol riche en matière organique que dans un sol minéral. Il est ainsi admis qu'un sol riche en collo ides organiques diminue la biodisponibilité du cadmium. L'enrichissement des solutions de culture avec des acides humiques entraîne une diminution de l'absorption de  $\text{Cd}^{2+}$  chez plusieurs espèces végétales telles que le maïs (Tyler et Bride, 1982), la

tomate (Wolterbeek *et al.*, 1988) et la betterave à sucre (Greger et Lindberg, 1986).

#### 4.4. Effet des compétitions ou des synergies entre éléments chimiques

La biodisponibilité du cadmium est conditionnée par son environnement chimique. Des compétitions ou synergies entre éléments ont été mises en évidence dans des milieux synthétiques et en solution hydroponique. Une relation antagoniste entre P et Cd ou Zn a souvent été démontrée (Wallace et Berry, 1989; Thys *et al.*, 1991). Elle s'explique par la formation en solution de phosphates de métaux, espèces non absorbables. Par ailleurs, une augmentation de calcium dans le milieu conduit à une diminution de l'absorption de cadmium, suggérant une compétition entre  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Cd}^{2+}$  au niveau de la surface racinaire (Jarvis *et al.*, 1976 ; Kim *et al.* 2002 ; Sarwar *et al.*, 2010). Un effet compétiteur du  $\text{Mn}^{2+}$  vis-à-vis du  $\text{Cd}^{2+}$  a également été démontré en solution nutritive (Jarvis *et al.*, 1976 ; Zornoza *et al.*, 2010). Une compétition entre le cadmium et le zinc est souvent observée (Sadana et Bijay, 1989) ; cette compétition se traduit par une diminution de l'influx de  $\text{Cd}^{2+}$  en présence de  $\text{Zn}^{2+}$  (Costa et Morel, 1994a ; Sarwar *et al.*, 2010). Ces observations s'expliquent par des compétitions entre les différents cations pour les sites de complexation de surface au niveau de la racine et vis-à-vis de transporteurs peu spécifiques de cations majeurs ou d'oligoéléments.

D'autres études démontrent cependant un effet de synergie entre le cadmium et des éléments tels que le zinc ou le calcium (Turner, 1973 ; Girling et Peterson, 1981; Larbi *et al.*, 2002 ; Ghnaya *et al.*, 2005). En fait, il semble que les interactions dépendent du niveau de concentration du cadmium dans le milieu (Sharma et Agrawal, 2006).

Il est également connu que le chlorure de sodium (NaCl) augmente la biodisponibilité des métaux lourds dans le sol. En effet, les ions chlorures ( $\text{Cl}^-$ ) forment des complexes stables avec les ions  $\text{Cd}^{2+}$ . Ce processus de complexation semble augmenter la mobilité des ions  $\text{Cd}^{2+}$  dans le sol ainsi que leur biodisponibilité (Lopez-Chuken et Young, 2005 ; Ghnaya *et al.*, 2007). De ce fait, l'enrichissement du sol en NaCl stimule le prélèvement de Cd par les plantes (Xu *et al.*, 2010). En présence de NaCl, le cadmium est absorbé sous forme ionique ( $\text{Cd}^{2+}$ ) ou sous forme d'un complexe ( $\text{CdCl}_n^{2-n}$ ) (Lopez-Chuken et Young, 2005).

Ces résultats conduisent à remettre en cause les seuils de toxicité définis à partir d'études monoélémentaires puisque le statut en éléments majeurs peut influencer sur l'accumulation du métal et l'expression de la phytotoxicité. Ils prouvent la nécessité

de prendre en compte les cations compétiteurs pour estimer la biodisponibilité et donc le flux de transfert d'un élément.

#### **4.5. La température du sol**

La température du sol dépend en premier lieu de la météorologie, et donc du climat, mais elle est également liée à l'activité biologique et influence rétroactivement la formation de complexes avec des ligands inorganiques en modifiant l'activité de l'élément en solution (Deneux-Mustin et *al.*, 2003). Haghiri (1974) montre que l'augmentation de la température favorise le prélèvement du cadmium par les plantes. La température a un impact direct sur la mobilité des métaux en déplaçant les équilibres des réactions de dissolution-précipitation et co-précipitation, et un impact indirect, en modifiant la teneur en eau du sol et son pH.

### **5. Cadmium et plantes**

#### **5.1. Phytotoxicité du cadmium**

Chez les plantes, le cadmium n'a aucune fonction biologique connue (Pokorny et *al.*, 2004), et il est toxique à de faibles concentrations (De la Rosa et *al.*, 2004). Les symptômes que présente une plante cultivée en présence de cadmium sont l'inhibition de la croissance, la diminution de sa biomasse, la chlorose, la nécrose, la perturbation des flux d'eau, la déficience en phosphore et en azote, l'accélération de la sénescence l'apparition du retard dans le développement des jeunes pousses et des perturbations de la photosynthèse (Cosio, 2005; Clemens, 2006).

##### **5.1.1. Effet du cadmium sur la croissance**

L'effet toxique du cadmium sur la croissance de la plante se manifeste par une réduction de la croissance des parties aériennes et des racines (Ghnaya et *al.*, 2005 ; Zorrig et *al.*, 2010) affectant ainsi dramatiquement la production de la biomasse. Ces effets peuvent être liés, entre autres, à la perturbation de l'équilibre de certaines hormones de croissance, notamment l'auxine (Hasenstein et *al.*, 1988), à la perturbation de l'homéostasie des éléments minéraux essentiels pour la croissance des plantes (Das et *al.*, 1997), à une action délétère du cadmium sur la composition des parois cellulaires (Chaoui et El Ferjani, 2005), ainsi qu'à des perturbations de la machinerie photosynthétique, notamment la structure des chloroplastes et la biosynthèse de la chlorophylle (Mobin et Khan, 2007 ; Ebbs et Uchil, 2008).

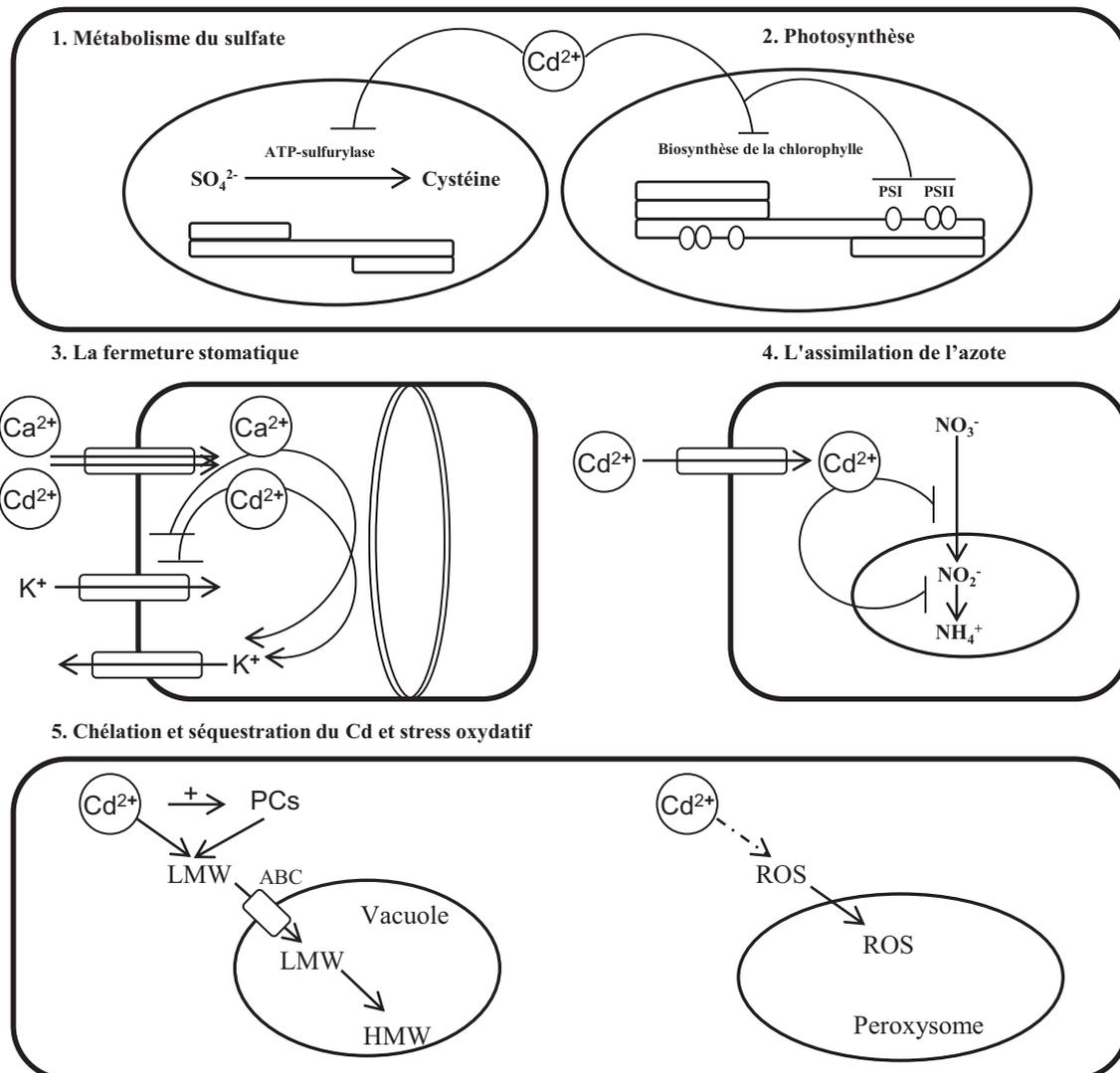
Il est toutefois important de noter que le cadmium n'affecte pas la croissance de toutes les plantes avec la même sévérité. En effet, sur des sites très contaminés en métaux lourds, et en particulier en cadmium, certaines espèces végétales telles que *Arabidopsis halleri* et *Thlaspi caerulescens* sont capables de croître, se développer, et se reproduire (Dahmani-Müller et al., 2001 ; Wojcik et al., 2005). Ces espèces végétales hypertolérantes sont aussi hyperaccumulatrices de cadmium. Bien que l'hyperaccumulation nécessite la tolérance, une relation simple entre la tolérance et l'hyperaccumulation n'apparaît pas évidente. À ce jour, nos connaissances sont encore limitées sur les mécanismes physiologiques et moléculaires permettant à ces plantes de maintenir leurs capacités de croissance sur des milieux fortement pollués par le cadmium, et d'éviter les effets toxiques du cadmium malgré les grandes quantités accumulées.

À très faible concentration de Cd dans le milieu la croissance de plusieurs plantes peut être stimulée (Arduini et al., 2004 ; Tang et al., 2009). Ces effets sont peu discutés dans la littérature. Une explication de ce mécanisme a toutefois été suggérée: selon Kennedy et Gonsalves (1987), une faible concentration de Cd hyperpolarise la membrane cytoplasmique à la surface racinaire augmentant ainsi le potentiel transmembranaire qui présente une source d'énergie pour l'absorption des cations essentiels.

### 5.1.2. Effet du cadmium sur le statut hydrique

Le statut hydrique des plantes est très affecté en présence de cadmium: le cadmium affecte l'absorption de l'eau, son transport ainsi que la transpiration (Barcelo et al., 1986 ; Costa et al., 1994 ; Vassilev et al., 1997). Ces perturbations hydriques se manifestent par une diminution de la teneur relative en eau (TRE ou RWC : Relative Water Content), du potentiel hydrique ( $\psi$ ) et du potentiel de turgescence foliaire (Vassilev et Yordanov, 1997).

Barcelo et al. (1988) et Marchiol et al. (1996) suggèrent que le transport d'eau diminue de deux à quatre fois selon l'espèce et la concentration du cadmium. Barcelo et al. (1988) ont considéré que cette diminution est due à l'inhibition de la division et de l'élongation des cellules xylémiques. Ces auteurs ont présumé que ceci est une conséquence des perturbations de l'équilibre hormonal causées par le cadmium.



**Figure 1.1.** Principaux effets du cadmium sur la physiologie des plantes et réponses des plantes au cadmium. D'après DalCorso *et al.* (2008).

Après accumulation dans la cellule, le Cd inhibe le métabolisme du sulfate (1) la photosynthèse et la biosynthèse de chlorophylle (2). Étant chimiquement semblables au  $\text{Ca}^{2+}$ , les ions  $\text{Cd}^{2+}$  gagnent les cellules de garde et activent l'ouverture des canaux potassiques. L'entrée des ions potassique provoque la perte de la turgescence des cellules de garde ce qui déclenche la fermeture stomatique (3). Le Cd inhibe l'activité des enzymes racinaires impliquées dans l'assimilation de l'azote: par exemple la nitrate réductase et la nitrite réductase (4).

(5) Une fois dans le cytosol, le Cd stimule la synthèse des phytochélatines (PCs). Le cadmium forme avec les phytochélatines des complexes de faible masse moléculaire (Low Molecular Weight (LMW)). Ces complexes entrent dans la vacuole par l'intermédiaire d'un transporteur tonoplastique du type ABC et s'agrègent les uns aux autres pour former des complexes de masse moléculaire élevée (High Molecular Weight (HMW)). A droite, le Cd induit la production de radicaux libres qui sont des formes très réactives de l'oxygène (ROS : Reactive Oxygen Species) qui seront désintoxiquées dans les peroxysomes.

PSI: photosystème I, PSII: photosystème II, ROS: formes réactives de l'oxygène.

De même, le cadmium induit une accumulation de composés phénoliques insolubles, comme la lignine, dans les vaisseaux de xylème réduisant ainsi le transport ascendant de l'eau et des éléments nutritifs (Chaoui et El Ferjani, 2004).

Le cadmium provoque également une réduction de la transpiration ainsi qu'une augmentation de la résistance stomatique accompagnée d'un accroissement de la teneur en acide abscissique (ABA) (Sharma et *al.*, 2002 ; Fediuc et *al.*, 2005).

En effet, plusieurs hypothèses ont été élaborées pour expliquer le mode d'action du cadmium sur les mouvements stomatiques. Polle et Schützendübel (2003) suggèrent que la réduction de l'absorption de l'eau chez les plantes, en présence des métaux lourds, induit une surproduction de l'ABA qui va transmettre un signal vers les feuilles répondant par une fermeture de leurs stomates. D'autres chercheurs suggèrent que la fermeture stomatique, en présence de  $Cd^{2+}$ , est due à la ressemblance chimique entre les ions  $Cd^{2+}$  et  $Ca^{2+}$  (Fediuc et *al.*, 2005 ; DalCorso et *al.*, 2008). En effet, la fermeture stomatique est due essentiellement aux variations du potentiel de turgescence dans les cellules de garde. Elle se déclenche suite à une accumulation des ions  $Ca^{2+}$  dans le cytosol des cellules de garde (MacRobbie et Kurup, 2007). Étant chimiquement semblables au ions  $Ca^{2+}$ , les ions  $Cd^{2+}$  gagnent les cellules de garde par les canaux de  $Ca^{2+}$  tension-dépendants et, une fois dans le cytosol, ils imitent l'activité de  $Ca^{2+}$  (Perfus-Barbeoch et *al.*, 2002) (Figure 1.1).

### 5.1.3. Effets du cadmium sur la nutrition minérale

Les effets néfastes du cadmium pourraient aussi être liés à une altération de l'absorption et de la distribution des éléments minéraux indispensables pour le fonctionnement de la plante. En effet, la présence du cadmium dans le milieu provoque des perturbations de l'alimentation minérale de la plante (Benavides et *al.*, 2005).

Des perturbations de la nutrition potassique en présence de cadmium ont été rapportées dans plusieurs études. Par exemple, une diminution dramatique des concentrations de potassium ont été observées, en présence de cadmium, chez le lupin blanc (Zornoza et *al.*, 2002), le pois (Sandalio et *al.*, 2001), l'orge (Guo et *al.*, 2007) et le pin sylvestre (Kim et *al.*, 2003). Cette diminution peut être expliquée par la fixation du cadmium sur l'ATP ce qui réduit la disponibilité de l'énergie nécessaire au fonctionnement des systèmes de transport membranaire de potassium (Asp et *al.*, 1994). Cette diminution peut également être attribuée à une diminution du nombre et

du diamètre des vaisseaux de xylème en présence de cadmium (Barcelo et *al.*, 1988). Le cadmium affecte aussi la nutrition calcique des plantes. Quelques études ont en effet montré que le cadmium induit une augmentation des teneurs en calcium chez les plantes (Greger et *al.*, 1991 ; Larbi et *al.*, 2002). Ceci pourrait être expliqué par le rôle structural, métabolique ou encore protecteur des ions  $\text{Ca}^{2+}$  (Boulila Zoghlami et *al.*, 2006). Cependant, d'autres études ont montré que le cadmium réduit l'approvisionnement en calcium des feuilles de *Fagus sylvatica* (Breckle et Kahle, 1992) et de *Betula pendula* (Gussarsson, 1994). Selon Kim et *al.* (2002), ceci pourrait être expliqué par la forte compétition entre  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Cd}^{2+}$  au niveau de la surface racinaire, ou bien selon Barcelo et *al.* (1988), par la séquestration des ions  $\text{Ca}^{2+}$  sous forme de cristaux d'oxalate dans les vaisseaux de xylème chez les plantes traitées avec du cadmium.

Le cadmium affecte également l'accumulation du zinc chez les plantes. En effet, une augmentation des teneurs en zinc chez les plantes en présence du cadmium a été décrite chez différentes espèces végétales, telles que la tomate (Turner, 1973), le maïs (Girling et Peterson, 1981) ou la laitue (Zorrig et *al.*, 2010). Cette augmentation pourrait correspondre à une stratégie de protection développée par la plante. Elle pourrait être expliquée aussi par une induction directe ou indirecte de l'expression des systèmes de transport de zinc par le cadmium (Zorrig et *al.*, 2010). Par contre, d'autres travaux décrivent une forte compétition entre le cadmium et le zinc (Sadana et Bijay, 1989). Cette compétition se traduit par une diminution de l'influx en  $\text{Cd}^{2+}$  en présence de  $\text{Zn}^{2+}$  (Costa et Morel, 1994a).

La toxicité du cadmium peut également altérer l'absorption et le transport de nitrate des racines vers les feuilles menant à une réduction de l'assimilation nitrique (DalCorso et *al.*, 2008 ; Sanità di Toppi et Gabbrielli 1999).

Le cadmium affecte aussi l'activité de plusieurs enzymes impliquée dans la nutrition minérale. En effet, Chez plusieurs espèces (par exemple la tomate, le maïs, le pois et l'orge) le cadmium modifie l'activité de différentes enzymes impliquées dans le métabolisme azoté (Nussbaum et *al.*, 1988 ; Boussama et *al.*, 1999). Ainsi les activités de la nitrate réductase et de la nitrite réductase dans les racines et les feuilles sont affectées en présence de cadmium (Chaffei et *al.*, 2004). Les activités des enzymes responsables de l'incorporation des molécules d'ammonium dans le squelette carboné (glutamine synthétase et glutamate synthétase) sont également affectées (Chaffei et *al.*, 2004). Par contre, l'activité de la glutamate déshydrogénase (GDH) est stimulée

en présence de cadmium (Boussama et *al.*, 1999). Les changements du métabolisme azoté en présence de Cd sont semblables aux changements induits pendant la sénescence. On suppose donc que le cadmium induit des symptômes de sénescence chez les plantes (Chaffei et *al.*, 2004).

#### 5.1.4. Effet du cadmium sur la photosynthèse

Le cadmium affecte sérieusement l'appareil photosynthétique (Clemens, 2006). La diminution de la capacité photosynthétique par le cadmium peut être due essentiellement à une désorganisation structurale des chloroplastes (Ouzounidou et *al.*, 1997; Djebali et *al.*, 2005). Baryla et *al.* (2001) rapportent que la chlorose observée dans les feuilles de *Brassica napus* est due à une diminution significative de la densité des chloroplastes et à une augmentation de la taille des cellules mésophylliennes et suggèrent que  $Cd^{2+}$  affecte aussi la genèse des organites cellulaires, essentiellement les chloroplastes. Le cadmium pourrait aussi avoir une action directe ou indirecte sur la teneur en chlorophylles (Ghnaya et *al.*, 2005 ; Mobin et Khan, 2007 ; Singh et *al.*, 2010) par l'intermédiaire de perturbations métaboliques (Vassilev et *al.*, 1997) ou d'une inhibition des enzymes de biosynthèse de la chlorophylle (Stobart et *al.*, 1985 ; Padmaja et *al.*, 1990). La diminution de l'activité photosynthétique en présence de cadmium pourrait être aussi due à une diminution de la teneur des parties aériennes en autres pigments comme le  $\beta$ -carotène ou les xanthophylles (Larbi et *al.*, 2002).

On pense que le cadmium agit également sur le processus de transport des électrons lors de la photosynthèse. Le cadmium affecte les composants des photosystèmes II (PSII) en altérant leurs structures et/ou leurs activités (Van Assche et Clijsters, 1985 ; Sigfridsson et *al.*, 2004) et ce à cause des changements irréversibles de leurs conformations suite à la formation des liaisons thiols avec le cadmium (Dafré et *al.*, 1996). Alcántara et *al.*, (1994) suggèrent quant à eux que l'inhibition de la Fe(III) réductase par le Cd provoque une déficience en Fe(II), ce qui affecte sérieusement la photosynthèse.

La fermeture des stomates dont on a vu qu'elle pouvait être causée par le cadmium pourrait être une autre cause de la limitation de la photosynthèse comme conséquence de la restriction de la diffusion du  $CO_2$  dans les feuilles (Polle et Schützendübel 2003, Fediuc et *al.*, 2005).

### 5.1.5. Induction d'un stress oxydatif par le cadmium

Plusieurs indications montrent que le cadmium peut induire un stress oxydatif. En effet, en présence de cadmium, les plantes produisent des radicaux libres qui sont des formes très réactives de l'oxygène (ROS : Reactive Oxygen Species), capables d'endommager les structures cellulaires (Razinger et *al.*, 2008; Szöllösi et *al.*, 2009 ; Ahmad et *al.*, 2010 ; Martínez Domínguez et *al.*, 2010). Les plus connues de ces formes réactives sont l'ion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ), le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), le radical hydroxyl ( $\cdot OH$ ) et l'oxygène singulet ( $^1O_2$ ) (Dat et *al.*, 2000 ; Asada, 1999). Toutes ces formes sont extrêmement. Le peroxyde d'hydrogène est un inhibiteur de certaines enzymes du cycle d'assimilation photosynthétique du carbone (cycle de Calvin-Benson). Les radicaux libres  $\cdot OH$  sont des oxydants redoutables, capables d'arracher des électrons aux macromolécules organiques cellulaires, provoquant ainsi la peroxydation des lipides membranaires, la destruction des protéines et la dénaturation de l'ADN des chromosomes. Une inhibition de la photosynthèse peut également se produire du fait de la destruction de la machinerie photosynthétique (protéines du photosystème II) par les formes actives de l'oxygène singulet ( $^1O_2$ ) (Halliwell et Gutteridge, 1999 ; Dat et *al.*, 2000).

Les plantes soumises à un stress oxydatif font appel à des systèmes de défense enzymatiques très efficaces, tels que la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT), l'ascorbate peroxydase (APOX), la glutathion réductase (GR), les peroxydases (POD) etc. Ces systèmes de défense enzymatiques permettent de maintenir les formes actives de l'oxygène à des faibles concentrations. Ils sont affectés en présence de cadmium. Le cadmium inhibe ou stimule les activités des enzymes de défense. Ces modifications sont différentes selon l'espèce étudiée, l'organe, l'âge de la plante et la concentration du cadmium utilisée (Metwally et *al.*, 2003, Milone et *al.*, 2003; Hsu et Kao, 2004; Cho et Seo, 2005 ; Singh et *al.*, 2010 ; Martínez Domínguez et *al.*, 2010).

### 5.2. Réponses des plantes au cadmium

Les plantes ont mis en œuvre des mécanismes « spécifiques » pour diminuer la toxicité des métaux. Ces mécanismes incluent l'inactivation des métaux par chélation et par leur exclusion des compartiments cellulaires dans lesquels ils sont toxiques. Ceci suppose cependant que les métaux sont séquestrés dans des organites spécifiques comme les vacuoles ou dans certaines structures telles que les trichomes (Clemens, 2006).

## 5.2.1. La chélation et la séquestration du cadmium

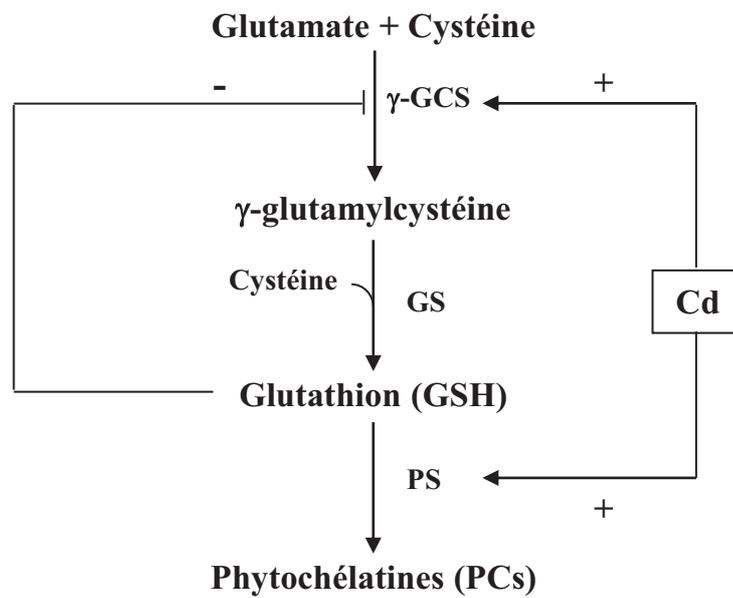
### 5.2.1.1. Les chélateurs spécifiques

#### 5.2.1.1.1. Les phytochélatines

Les phytochélatines (PCs) sont des peptides de faible poids moléculaire qui présentent une forte affinité pour les métaux bivalents, essentiellement le  $\text{Cd}^{2+}$  (Clemens, 2006). Leur structure générale est  $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$  ( $n = 2 - 11$ ). Les phytochélatines ont été découvertes pour la première fois chez la levure *Schizosaccharomyces pombe* (Kondo et al., 1984) puis chez les plantes (Grill et al., 1985) et les algues (Hanikenne et al., 2003). Ces peptides sont synthétisés en réponse à la présence d'ions métalliques libres dans le cytoplasme. Ils sont synthétisés à partir du glutathion par la phytochélatine synthase (PS) (Zhu et al., 1999a) (Figure 1.2). Le cadmium forme avec les phytochélatines des complexes de faible masse moléculaire (Low Molecular Weight (LMW)). Le complexe PC-Cd (LMW) n'affecte pas le métabolisme au niveau du cytoplasme. Il est acheminé vers la vacuole. Une fois dans la vacuole, les complexes PC-Cd (LMWs) s'agrègent les uns aux autres par des ponts sulfures pour former des complexes de masse moléculaire élevée (High Molecular Weight (HMW)) (Clemens, 2006 ; DalCorso et al., 2008). Ce cycle se termine par la dissociation de ses complexes, à cause du pH vacuolaire, provoquant la libération des ions  $\text{Cd}^{2+}$  qui seront pris en charge par les acides organiques présents, tels que le malate, le citrate ou encore l'oxalate. Les PCs sont recyclées et réexportées dans le cytoplasme pour capter d'autres ions et les réacheminer dans la vacuole (Sanità di Toppi et Gabbrielli, 1999).

Des études faites sur trois espèces différentes (*Arabidopsis thaliana*, *Caenorhabditis elegans* et *S. pombe*) ont démontré une grave hypersensibilité au  $\text{Cd}^{2+}$  suite à une inactivation des gènes de synthèse des phytochélatines (Ha et al., 1999 ; Clemens et al., 1999 ; Vatamaniuk et al., 2001).

D'une manière plus générale, l'exposition au Cd induit une remarquable augmentation de la quantité de composés contenant des groupements thiols, avec une diminution simultanée de l'activité de l'Adénosine Triphosphate (ATP)-sulfurylase impliquée dans l'assimilation du sulfate (Astolfi et al., 2004) (Figure 1.1).



**Figure 1.2.** Régulation de la biosynthèse des phytochélatines (PCs) et du glutathion (GSH) chez les plantes. Le cadmium augmente la transcription de la  $\gamma$ -glutamylcystéine synthase ( $\gamma$ -GCS) et active la phytochélatine synthase (PS), ce qui induit la production des PCs et l'épuisement du GSH. La  $\gamma$ -glutamylcystéine synthase peut être également inhibée par rétrocontrôle négatif exercé par le GSH (Zhu et *al.*, 1999a).

#### 5.2.1.1.2. Les métallothionéines

Les métallothionéines (MTs), petites protéines riches en cystéines, jouent également un rôle important de désintoxication du cadmium dans les cellules de mammifères (Hamer, 1986). Les métallothionéines sont codées par des gènes qui sont classés en deux groupes (MT1 et MT2). Chez certaines plantes supérieures, incluant *A. thaliana*, on a remarqué l'existence de deux autres types de métallothionéines, MT3 et MT4 en plus des classes 1 et 2 de métallothionéines (Goldsbrough, 2000).

Les métallothionéines des plantes peuvent conférer une tolérance aux métaux une fois exprimée chez la levure, et quelques-unes d'entre elles sont régulées positivement dans des conditions d'excès métallique (Cobbett et *al.*, 2002 ; Rauser, 1999). Néanmoins, une participation des métallothionéines à la désintoxication du cadmium chez les plantes n'est pas certaine (Cobbett et *al.*, 2002). Alternativement, les métallothionéines peuvent fonctionner comme antioxydants (Dietz et *al.*, 1999) et probablement intervenir dans la réparation de la membrane plasmique (Salt et *al.*, 1998).

#### 5.2.1.1.3. Les autres chélateurs

Outre les métallothionéines et les phytochélatines d'autres composés semblent être impliqués dans la complexation des ions métalliques au niveau cellulaire: les acides carboxyliques, les acides organiques comme le citrate, l'oxalate ou le malate et les acides aminés comme l'histidine et la proline. Ils peuvent avoir un rôle important dans la tolérance des plantes aux métaux et dans la détoxification de ces éléments (Rauser, 1999; Clemens, 2001; Siripornadulsil et *al.*, 2002; Bäckor et *al.*, 2004 ; Sharma et Detz, 2006). À titre d'exemple, des complexes Cd-citrate ont été identifiés dans la sève xylémique collectée chez la tomate traitée par le cadmium (Senden et *al.*, 1995).

Le système racinaire des plantes peut aussi excréter ou exsuder dans le sol des molécules organiques diverses tels que les phytosidérophores en quantité assez importante pour mobiliser certains ions nutritifs. Les phytosidérophores peuvent jouer un rôle important pour la nutrition minérale des végétaux, en participant à la mobilisation de micronutriments tels que Fe, Zn et Cu. Une fois introduit dans la plante, le chélat formé avec le phytosidérophore est dissocié et le métal libéré. Ce même processus peut s'appliquer probablement au cadmium, vu sa grande similitude avec le zinc (Schenker et *al.*, 2001).

D'autres petites molécules comme la nicotianamine (dérivé de la méthionine et

résultant de l'oligomérisation de trois S-adénosyl méthionines) peuvent fixer les métaux de transition tel que le cuivre ou bien le fer (Curie et *al.*, 2009), mais il n'existe pas à ce jour de travaux qui montrent clairement l'implication de ce type de molécule dans la chélation du cadmium.

### 5.2.1.2. La séquestration avec les antiports $\text{Cd}^{2+}/\text{H}^+$

Outre la séquestration du cadmium par l'intermédiaire de chélateurs spécifiques, un deuxième mécanisme de séquestration vacuolaire de cadmium reposant sur l'activité de transporteurs de  $\text{Cd}^{2+}$  a été à plusieurs reprises discuté. Ainsi, un antiport  $\text{Cd}^{2+}/\text{H}^+$  présent sur la membrane tonoplastique a été décrit dans les racines d'avoine (Salt et *al.*, 1993). Cet antiport présente une faible affinité pour le cadmium mais qui est similaire à celle de l'antiport  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ . Cette similitude soulève la question de la nature de l'antiport  $\text{Cd}^{2+}/\text{H}^+$ : s'agit il d'un nouvel antiport ou plutôt d'une substitution du Ca par Cd au niveau de l'antiport  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$  (Krämer et *al.*, 2007). Une deuxième question peut être posée concernant le degré d'implication de ces antiports dans la séquestration du cadmium, sachant que la majeure partie du cadmium forme des complexes avec les PCs (Vatamaniuk et *al.*, 2000). Récemment, une étude a montré d'une manière plus claire l'implication d'une pompe ATPase dans la séquestration vacuolaire du cadmium. En effet, Morel et *al.* (2009) ont montré que *AtHMA3* joue vraisemblablement un rôle important dans la séquestration vacuolaire du cadmium, une fonction originale pour une ATPase  $\text{P}_{1\text{B}-2}$  chez un organisme eucaryote multicellulaire.

### 5.2.2. Autres stratégies de défense

D'autres stratégies pourraient être impliquées dans la tolérance des plantes aux métaux lourds en général comme l'évitement ou la réduction de l'absorption (Meharg et Macnair 1992), l'efflux actif à partir du cytoplasme (Kim et *al.*, 2007) et la fixation des métaux dans le compartiment apoplasmique (Salt et *al.*, 2000; Hall, 2002).

Pour le cadmium, l'accumulation de ce métal dans les feuilles âgées pourrait également être considérée comme une stratégie de tolérance au cadmium. En général, la teneur en cadmium dans les feuilles augmente avec l'âge des feuilles. Par exemple, chez *Armeria maritima*, la teneur en cadmium des feuilles âgées est 3 à 8 fois supérieure à celle des jeunes feuilles (Dahmani-Müller et *al.*, 2000).

L'accumulation du cadmium dans les trichomes pourrait également être considérée

comme une stratégie de tolérance au cadmium (Salt *et al.*, 1995).

Enfin, le cadmium pourrait induire une biosynthèse d'éthylène dans les racines et les feuilles. L'éthylène serait alors un messager stimulant la lignification limitant de ce fait les flux de cadmium dans les systèmes vasculaires et accélérant la réponse antioxydante par induction de l'activité ascorbate peroxydase (APX), ainsi que par la synthèse des chélateurs (Sanità di Toppi et Gabbrielli, 1999).

### **5.3. Prélèvement, accumulation et transport du cadmium**

Selon leurs aptitudes à tolérer, à absorber ou à accumuler le cadmium dans les tissus, les plantes peuvent être caractérisées d'indicatrices, d'exclusives ou d'accumulatrices voire d'hyperaccumulatrices. Chez les plantes indicatrices, le prélèvement et le transport du cadmium dépendent linéairement de la concentration dans le sol et la concentration du cadmium dans la plante reflète celle du sol. Chez les plantes exclusives, la concentration du cadmium dans la plante est nettement inférieure à celle que l'on peut observer dans le sol. À l'inverse, chez les plantes accumulatrices ou hyperaccumulatrices la concentration du cadmium dans la plante est nettement supérieure à celle que l'on peut observer dans le sol (Bourrelier et Berthelin, 1998).

#### **5.3.1. Prélèvement via la voie atmosphérique**

Peu d'auteurs ont étudié les parts respectives du prélèvement racinaire et du prélèvement foliaire du cadmium dans le contenu en cadmium accumulé par les plantes. La plupart d'entre eux se sont contentés de constater des différences en fonction de la proximité d'une source de contamination (route, cheminée d'industries, ville, etc.). Une étude a tenté d'estimer cette proportion en utilisant un traçage isotopique par du  $^{109}\text{Cd}$  (Hovmand *et al.*, 1983): dans un contexte de sols agricoles non contaminés soumis à des retombées atmosphériques diffuses, 20% (pour le grain de blé) à 60 % (pour le chou) du cadmium total du végétal non lavé provenait des retombées aériennes. Cependant, la contribution des retombées aériennes ne deviendrait prépondérante que lorsque les dépôts aériens seraient de l'ordre de 10 g/ha/an. Pour le cadmium, les transferts via la voie atmosphérique peuvent donc être négligés dans les contextes agricoles éloignés de sources de contamination.

### 5.3.2. Prélèvement racinaire du cadmium

#### 5.3.2.1. Les espèces de cadmium prélevées par les racines

On estime que, pour la majorité des métaux, le prélèvement se fait quand ces éléments sont sous forme de cations libres ( $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ) (Hart et *al.*, 1998a ; Hart et *al.*, 1998b).

Dans des cas particuliers, d'autres formes interviennent. Comme cela a été brièvement mentionné précédemment, des complexes inorganiques de cadmium ( $\text{CdCl}^+$  et  $\text{CdCl}_2$ ) observés dans les sols salés ou irrigués avec des eaux chlorées pourraient être absorbés (Weggler-Beaton et *al.*, 2000; Weggler et *al.*, 2004): à concentration identique en  $\text{Cd}^{2+}$  dans le milieu, une augmentation du prélèvement de cadmium est observée en présence de chlorures, suggérant soit que le complexe est directement absorbé, soit qu'il participe à la diffusion vers la racine (Smolders et McLaughlin, 1996a ; Smolders et McLaughlin, 1996b). Les sulfates pourraient jouer le même rôle via des complexes  $\text{CdSO}_4$  (McLaughlin et *al.*, 1998a ; McLaughlin et *al.*, 1998b), mais ces résultats n'ont pas été confirmés par d'autres études (Bingham et *al.*, 1986). Il est également possible que des complexes Cd-citrate soient directement absorbés ou participent à l'absorption (Berkelaar et Hale, 2003).

#### 5.3.2.2. Les mécanismes de prélèvement racinaire

Puisque le  $\text{Cd}^{2+}$  est un ion métallique non essentiel, on considère qu'il n'existe pas de mécanisme spécifique d'absorption de cet élément. Le cadmium étant un métal facilement absorbé par les racines des plantes (Wagner, 1993) il est probable qu'il puisse entrer dans les cellules de plantes par l'intermédiaire de plusieurs systèmes de prélèvement des cations essentiels (Clemens, 2006). Il a cependant été rapporté que le cadmium peut être absorbé par simple diffusion et que les différentes voies d'absorption du cadmium peuvent varier selon l'espèce végétale considérée. Chez le riz, le maïs et le soja, l'absorption est réalisée principalement par des transporteurs membranaires (Cataldo et *al.*, 1988) alors que chez l'orge, l'absorption du cadmium se fait principalement par une simple diffusion (Cutler et Rains, 1974). Chez d'autres espèces, les deux voies peuvent coexister comme chez le blé dur où l'absorption du cadmium est effectuée par simple diffusion et par des transporteurs (Hart et *al.*, 1998b).

### 5.3.3. Accumulation du cadmium

#### 5.3.3.1. Variabilité interspécifique d'accumulation de cadmium

Il a été clairement démontré que la capacité d'accumulation de cadmium était dépendante de la famille végétale (Kuboi et *al.*, 1986) et de l'espèce (Coullery, 1997). Parmi les plantes consommables, aucune ne peut être classée dans la catégorie des plantes hyperaccumulatrices de cadmium. Les plantes cultivées les moins accumulatrices de cadmium sont les Légumineuses. Les Poacées, les Liliacées, les Cucurbitacées et Apiacées sont moyennement accumulatrices. Les Chénopodiacées (épinard, betterave), les Brassicacées (chou, navet, radis) et les Astéracées (laitue) sont les plus accumulatrices (Kuboi et *al.*, 1986). Cette hiérarchie est différente si on s'intéresse à d'autres métaux: à titre d'exemple, pour le nickel, une Légumineuse telle que le haricot est fortement plus accumulatrice que la carotte (Ombellifère) ou la laitue (Astéracées) (Coullery, 1997).

#### 5.3.3.2. Variabilité intraspécifique d'accumulation de cadmium

Des différences d'accumulation ont été observées entre différentes variétés d'une même espèce végétale. Par exemple, la concentration en cadmium varie d'un facteur 2 au sein de l'espèce "pomme de terre" (McLaughlin et *al.*, 1994), d'un facteur supérieur à 2 chez la laitue (Costa et Morel, 1994a; Florijn et *al.*, 1991), d'un facteur compris entre 2 et 6 suivant les années chez le blé tendre (Vinkel, 2001), d'un facteur 3 chez le blé dur, d'un facteur 4 dans le grain de tournesol et d'un facteur 10 dans la graine de lin (Li et *al.*, 1997) ou 11 dans des plantules de maïs (Florijn et Vanbeusichem, 1993).

Il apparaît cependant que les différences intervariétales varient en fonction des conditions de culture. Chez la laitue, il a été montré que les différences intervariétales étaient importantes quand les plantes sont cultivées sur des sols très faiblement contaminés alors que ces différences s'estompent quand les plantes sont cultivées sur des sols fortement contaminés par le cadmium (Florijn et *al.*, 1991; Costa et Morel, 1994a). Chez le blé les différences variétales d'accumulation de cadmium sont fonction du sol et du niveau d'exposition (Vinkel, 2001). Ces différences peuvent ainsi varier d'un site à un autre ou d'une année à une autre (Vinkel, 2001).

### 5.3.3.3. Variabilité d'accumulation de cadmium entre les organes

Comme cela a été mentionné, l'accumulation de cadmium diffère considérablement selon les organes et les tissus d'une même plante, par exemple entre les racines et les parties aériennes, et la distribution des teneurs en cadmium est elle-même fortement variable à la fois entre espèces et entre variétés au sein d'une même espèce. Aucun lien évident ne peut être établi entre la facilité à accumuler le cadmium et la répartition du cadmium entre organes (Wagner, 1993 ; Clemens, 2006).

À l'échelle de la plante entière, il y a généralement moins de Cd dans les feuilles que dans les racines, et encore moins dans les fruits et dans les graines (Wagner, 1993). Jarvis et *al.* (1976) ont remarqué que chez 20 espèces végétales, la quantité de cadmium retenu par les racines dépasse la moitié de la quantité totale absorbée par la plante. Chez *Azolla filiculoides*, les niveaux d'accumulation du Cd<sup>2+</sup> sont au moins deux fois plus élevés dans les racines que dans les parties aériennes (Sela et *al.*, 1989). Le même résultat a été observé chez le riz (Ros et *al.*, 1992), le petit pois (Chugh et *al.*, 1992) et la laitue (Costa et Morel, 1994b). Cependant, chez certaines espèces, le cadmium peut s'accumuler fortement en dehors des racines. C'est par exemple le cas du tabac qui accumule dans ses feuilles plus de 80% du cadmium prélevé par les racines (Elmayan et Tepfer, 1994). C'est aussi le cas des espèces sauvages dites hyperaccumulatrices: *A. halleri* et *T. caerulescens* (Lombi et *al.*, 2000 ; Dahmani-Müller et *al.*, 2001 ; Wojcik et *al.*, 2005).

### 5.3.3.4. Accumulation du cadmium à l'échelle cellulaire

À l'échelle cellulaire, la localisation du cadmium est encore mal connue. Deux compartiments cellulaires semblent jouer un rôle important dans le stockage et la localisation du cadmium: les parois cellulaires et les vacuoles. Selon les plantes et les techniques utilisées, les auteurs ont mis en évidence que le cadmium est: soit associé à des granules dans les vacuoles, le cytoplasme, les plastes ou le noyau (Vazquez et *al.*, 1992), soit lié aux parois cellulaires (Lozano-Rodriguez et *al.*, 1997; Ramos et *al.*, 2002), soit présent dans différents types de structures simultanément (Dahmani-Müller, 2000).

Ramos et *al.* (2002) ont quantifié cette répartition dans les feuilles de laitue: 63-64% du cadmium est lié aux parois cellulaires alors que 13 à 25 % est localisé dans le protoplasme et 6 à 16 % dans les chloroplastes. En fait, ces différences semblent liées au niveau de contamination considéré. Des microanalyses aux rayons X des racines de

*Zea mays* et d'*Agrotis gigantea*, ont montré que  $Cd^{2+}$  s'accumule sous forme de granules au niveau du cytoplasme et de la vacuole des cellules matures différenciées et dans le noyau des cellules indifférenciées (Rauser et Ackerly, 1987). Utilisant la technique de fractionnement cellulaire, Weigel et Jager (1980) ont montré que chez le haricot, le  $Cd^{2+}$  se localise au niveau du cytoplasme aussi bien dans les cellules foliaires que dans les cellules racinaires alors qu'une très faible partie du cadmium est retenue par les parois des cellules des deux types d'organes. Cependant, en utilisant la technique d'analyse aux rayons X, Vazquez et *al.* (1992) ont observé que chez la même espèce, le  $Cd^{2+}$  s'accumulait principalement dans la vacuole et le noyau, et en faible quantité dans le cytoplasme et les plastes.

#### 5.3.4. Transport du cadmium à longue distance

Le transport du cadmium des racines vers les feuilles se fait *via* la sève brute (xylème). Suite à l'absorption du cadmium par les racines, trois processus contrôlent le transport du cadmium des racines vers le xylème: la séquestration des métaux à l'intérieur des cellules racinaires, le transport symplasmique dans la stèle et la décharge du cadmium dans le xylème (Clemens et *al.*, 2002a).

Le transport du cadmium vers les feuilles semble être étroitement lié au processus de la transpiration (Hardiman et Jacoby, 1984). En effet, il a été démontré que la fermeture totale des stomates s'accompagne par une diminution importante de l'accumulation du cadmium au niveau des feuilles, suggérant l'implication de l'appel foliaire dans l'accumulation de cadmium dans les feuilles (Salt et *al.*, 1995). Cependant, la diminution de la translocation du cadmium des racines vers les feuilles n'affecte pas l'absorption du cadmium par les racines, révélant ainsi l'indépendance de ces deux processus (Salt et *al.*, 1995).

Chez plusieurs espèces, le complexe phytochélatine-cadmium (PC-Cd) est trouvé dans le xylème mais aussi dans le phloème, indiquant que les phytochélatines jouent un rôle important dans le transport à longue distance du cadmium, des racines vers les parties aériennes et inversement (Chen et *al.*, 2007 ; Gong et *al.*, 2003 ; Mendoza-Cózatl et *al.*, 2008). Cependant, les acteurs moléculaires impliqués dans le chargement des complexes PCs-Cd dans le xylème ou leur déchargement dans le phloème demeurent inconnus.

### 5.3.5. Systèmes de transport

On sait depuis longtemps qu'un excès de cations essentiels tels que le  $Zn^{2+}$  ou bien le  $Ca^{2+}$  a un effet protecteur contre la toxicité du  $Cd^{2+}$  (He *et al.*, 2005b; Boulila Zoghلامي *et al.*, 2006). Ceci a été interprété par la concurrence entre ces différents cations sur les sites d'absorption. Puisque le  $Cd^{2+}$  est un ion métallique non essentiel, on suppose qu'il n'existe pas de mécanisme spécifique d'absorption pour cet élément et que le cadmium peut entrer dans les cellules végétales par l'intermédiaire de systèmes de prélèvement des cations essentiels. Cependant, chez l'espèce hyperaccumulatrice de cadmium, *T. caerulescens* il pourrait exister des systèmes spécifiques de prélèvement du  $Cd^{2+}$  (Lombi *et al.*, 2001).

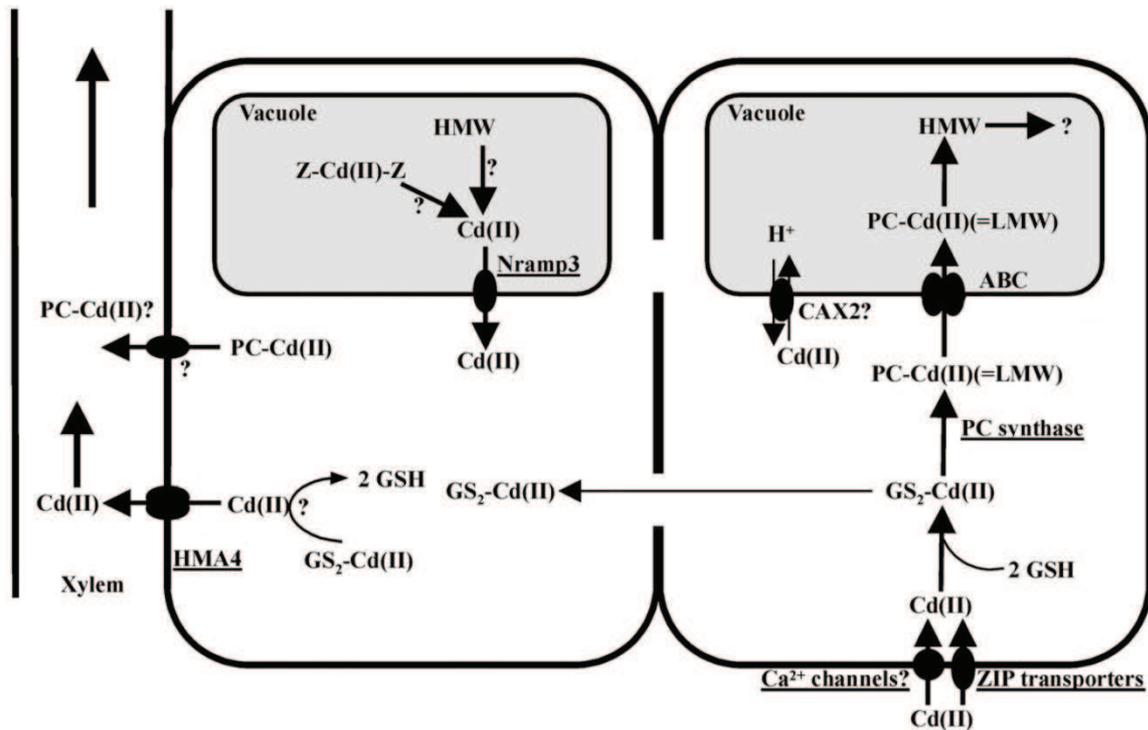
Au milieu des années 90, on a commencé à identifier des transporteurs de cations chez les plantes, notamment des transporteurs de  $Fe^{2+}$  et de  $Zn^{2+}$  (Fox et Guerinot, 1989 ; Mäser *et al.*, 2001). Il est devenu possible de savoir si ces transporteurs contribuent également à l'absorption de  $Cd^{2+}$ .

À ce jour, différentes familles de transporteurs capables de transporter le cadmium ont été identifiées chez les plantes. Des canaux, notamment les canaux calciques pourrait aussi être impliqués dans le transport du cadmium (Hinkle *et al.*, 1992 ; Perfus-Barbeoch *et al.*, 2002) (Figure 1.3).

#### 5.3.5.1. Les transporteurs pouvant transporter le cadmium

##### 5.3.5.1.1. LCT1

LCT1 (Low-affinity Cation Transporter 1) est un transporteur de cation de blé. Une fois surexprimé chez la levure, LCT1 induit une hypersensibilité au cadmium (Clemens, 1998). Cet effet a été attribué à une augmentation de l'absorption de  $Cd^{2+}$  assurée par LCT1. Cependant, la surexpression de *LCT1* de blé chez des plantes de tabac induit une augmentation de la tolérance au cadmium ainsi qu'une faible diminution de l'accumulation de cadmium dans les racines (Antosiewicz et Hennig, 2004). En raison d'un manque de résultats de génétique réverse chez le blé, et parce qu'aucun homologue à *LCT1* n'a été identifié chez *A. thaliana*, le rôle de LCT1 dans le transport de cadmium chez les plantes reste mal compris (Clemens, 2006).



**Figure 1.3.** Représentation schématique des processus impliqués dans l'absorption, la séquestration et la translocation du Cd au niveau des cellules racinaires.

Le schéma représente deux cellules racinaires: la première cellule (à droite) est en contact avec la rhizosphère, la deuxième (à gauche) est adjacente au xylème. Les deux cellules sont reliées d'une manière symplasmique grâce aux plasmodesmes.

Les ions  $\text{Cd}^{2+}$  sont, probablement, absorbés par les cellules végétales via des transporteurs de  $\text{Fe}^{2+}$  et/ou de  $\text{Zn}^{2+}$  de la famille ZIP et par des canaux de  $\text{Ca}^{2+}$ . Dans le cytosol, les ions  $\text{Cd}^{2+}$  sont chélatés par des ligands initiaux qui pourraient être le glutathion (GSH). Cette chélation permet la formation des complexes  $\text{GS}_2\text{-Cd(II)}$ . Ces complexes agissent les uns sur les autres pour induire l'expression de la phytochélatine synthase (PCS) ce qui a pour résultat l'activation de la synthèse de la phytochélatine (PC). Les complexes PC-Cd (II) (LMW = Low Molecular Weight) sont transportés dans la vacuole par l'intermédiaire d'un transporteur de type ABC (encore inconnu). À l'intérieur de la vacuole, les LMW s'agrègent les uns aux autres pour former des complexes de masse moléculaire élevée (HMW = High Molecular Weight). Le destin métabolique des complexes de HMW est encore inconnu.

La deuxième voie probable de séquestration vacuolaire se fait via des antiports  $\text{Cd}^{2+}/\text{H}^+$ . Les deux protéines candidates sont CAX2 et HMA3 d'*A. thaliana*.

Une partie des complexes HMWs, ou bien des complexes non identifiés (Z-Cd(II)-Z), pourrait probablement être mobilisée de nouveau dans le cytosol via des protéines telles qu'AtNramp3. Le transfert symplastique exige la disponibilité de ligands mobiles à haute affinité ( $\text{GS}_2\text{-Cd(II)}$ ,  $\text{XCd(II)}$ ).

Des pompes localisées dans les membranes plasmiques des cellules adjacentes au xylème sont impliquées dans la charge du xylème. Une de ces pompes chez *A. thaliana* est AtHMA4. Un flux des complexes PC-Cd (II) a été également proposé. D'après Clemens (2006).

### 5.3.5.1.2. Les transporteurs de la famille ZIP

Les protéines de la famille ZIP (ZRT-IRT-like Proteins) (Guerinot, 2000) sont des transporteurs non spécifiques d'un grand nombre de métaux ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  et  $\text{Zn}^{2+}$ ).

IRT1 (Iron-Responsive Transporter 1) est un transporteur de la famille ZIP. Plusieurs travaux ont montré que IRT1 représente la principale voie d'absorption des ions  $\text{Fe}^{2+}$  par les cellules racinaires d'*A. thaliana* (Vert et al., 2002). Les premiers travaux sur la surexpression de IRT1 chez la levure (*Saccharomyces cerevisiae*) ont montré une contribution de cette protéine dans l'absorption des ions  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  et  $\text{Cd}^{2+}$  (Korshunova et al., 1999). Des plantes d'*A. thaliana* qui surexpriment IRT1 accumulent plus de  $\text{Zn}^{2+}$  et de  $\text{Cd}^{2+}$  dans leurs tissus racinaires que les plantes témoin, et ce dans des conditions de déficience ferrique qui induisent la surexpression de la protéine IRT1 (Connolly et al., 2002). Ces expériences ont montré une implication évidente d'IRT1 dans l'influx de  $\text{Cd}^{2+}$  dans les cellules racinaires des plantes. Un tel rôle d'IRT1 a été conforté par des études physiologiques faites sur d'autres espèces végétales montrant qu'une limitation du fer dans le milieu de culture mène à une augmentation de l'accumulation du cadmium (Sharma et al., 2004). Ceci suggère que les systèmes d'absorption du  $\text{Fe}^{2+}$  permettent l'entrée de  $\text{Cd}^{2+}$  dans les cellules racinaires (Cohen et al., 1998).

Outre IRT1, d'autres transporteurs de la famille ZIP pourraient contribuer au transport de  $\text{Cd}^{2+}$ . Le transport de  $\text{Zn}^{2+}$  induit chez la levure par les protéines ZIP1, ZIP2 et ZIP3 d'*A. thaliana* est partiellement bloqué par le  $\text{Cd}^{2+}$  (Grotz et al., 1998). D'autre part, le transporteur ZNT1 (Zinc transporter 1) de *T. caerulescens* qui appartient à la famille ZIP, permet, une fois exprimé chez la levure, l'absorption à haute affinité des ions  $\text{Zn}^{2+}$  et celui à basse-affinité des ions  $\text{Cd}^{2+}$  (Pence et al., 2000).

### 5.3.5.1.3. Les transporteurs de la famille NRAMP

La famille NRAMP (Natural Resistance Associated Macrophage Protein) correspond à une famille de protéines impliquées dans le transport des ions métalliques bivalents. Ces protéines ont été trouvées chez un large éventail d'êtres vivants comprenant les bactéries, la levure, les insectes, les mammifères et les végétaux supérieurs (Cellier et Gros, 2004). La famille NRAMP est également appelée SLC11 (Mackenzie et Hediger, 2004). Chez les mammifères, la protéine DMT1 (également appelée DCT1 ou NRAMP2) est impliquée dans l'absorption intestinale de Cd et de Pb (Bressler et

*al.*, 2004). Chez *S. cerevisiae* les deux protéines de la famille NRAMP, SMF1 et SMF2, sont responsables du transport de plusieurs ions tel que les ions  $Mn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  et  $Cd^{2+}$  (Liu *et al.*, 1997). Concernant les NRAMP présentes chez les plantes, un premier travail a montré que les gènes *AtNRAMP1*, 3 et 4, une fois exprimés chez *S. cerevisiae*, assurent l'absorption de  $Cd^{2+}$  (Thomine *et al.*, 2000). En outre, la surexpression d'*AtNRAMP3* chez *A. thaliana* confère une sensibilité des plantes au  $Cd^{2+}$  (Thomine *et al.*, 2000). Cette hypersensibilité a été expliquée par un transport accru du Cd vacuolaire vers le cytosol (Thomine *et al.*, 2003). Il a ensuite été montré ensuite qu'*AtNRAMP3* et *AtNRAMP4* sont localisés sur la membrane tonoplastique et sont impliqués dans la remobilisation des métaux essentiels (Fe, Mn et Zn) stockés dans la vacuole au moment de la germination des graines (Lanquar *et al.*, 2005). Récemment, Oomen *et al.* (2009) ont montré que le double mutant *nramp3 nramp4* d'*A. thaliana* montre une hypersensibilité au cadmium. Cette hypersensibilité a été entièrement restaurée par la surexpression des gènes *TcNRAMP3* ou *TcNRAMP4* de *T. caerulea* chez ce double mutant. La tolérance au cadmium induite par les protéines *TcNRAMP3* et *TcNRAMP4* chez le double mutant *nramp3 nramp4* d'*A. thaliana* ne dépasse pas celle des plantes sauvages d'*A. thaliana*. Ceci suggère qu'il n'y a pas de différence entre les protéines *TcNRAMP3* et *TcNRAMP4* et leurs orthologues d'*A. thaliana*.

#### 5.3.5.1.4. Les transporteurs de la famille ABC

Les protéines de la famille ABC (ATP-Binding Cassette) sont présentes dans de nombreuses espèces, de la bactérie à l'Homme, et elles sont impliquées dans le transport actif de divers substrats, en utilisant l'énergie produite par l'hydrolyse de l'ATP (Higgins, 1992).

Kim *et al.* (2007) suggèrent que *AtPDR8*, un transporteur de la famille ABC, pourrait jouer un rôle important dans l'efflux du cadmium. En effet, la surexpression du gène *PDR8* chez *A. thaliana* induit une forte diminution des teneurs en cadmium aussi bien au niveau foliaire qu'au niveau racinaire. La mutation *pdr8* entraîne à l'inverse une augmentation de l'accumulation de cadmium dans les feuilles comme dans les racines. Par ailleurs, Bovet *et al.* (2003) ont montré que le niveau de transcription du gène *AtMRP3*, qui code un transporteur du type ABC chez *A. thaliana*, était directement régulé par le cadmium. Cependant, il n'existe à ce jour aucun résultat qui démontre qu'*AtMRP3* est vraiment impliqué dans le transport de cadmium (Bovet *et al.*, 2003).

### 5.3.5.1.5. Les transporteurs de la famille CAX

Les transporteurs de la famille CAX (calcium exchanger) sont des antiports cation/H<sup>+</sup> ou cation/Na<sup>+</sup> qui échangent H<sup>+</sup> ou Na<sup>+</sup> contre des cations tels que Cd<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup> ou Mn<sup>2+</sup>. Ils ont un rôle important dans la séquestration vacuolaire des métaux qui existent en excès dans le cytoplasme (Krämer *et al.*, 2007 ; Clemens, 2006).

AtCAX2 est un antiport cation/H<sup>+</sup> qui possède une large gamme de substrat. La surexpression de *CAX2* chez des plantes de tabac augmente d'un facteur 3 le contenu racinaire de Cd. Cette augmentation a également été observée pour le calcium et le manganèse (Hirschi *et al.*, 2000), ce qui peut être expliqué par des activités de transport tonoplastique plus élevées dans les racines pour Cd<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup> et Mn<sup>2+</sup> chez les plantes transgéniques surexprimant *CAX2*. Par contre, aucun changement de la tolérance au Cd<sup>2+</sup> n'a été observé chez les plantes transgéniques. De même, aucun phénotype en relation avec le cadmium n'a été observé chez une lignée de mutante *cax2* (Pittman *et al.*, 2004). Le rôle de ces transporteurs dans la séquestration du cadmium n'est donc pas totalement éclairci.

### 5.3.5.1.6. Les transporteurs de la famille CDF

Il existe une autre famille protéique dont les membres peuvent contrôler le transport des métaux dans la vacuole ou dans d'autres compartiments intracellulaires. Cette famille est la famille des CDF (Cation Diffusion Facilitator) également appelée MTP (Metal Tolerance Protein) (Mäser *et al.*, 2001). Chez la levure, l'inactivation du transporteur ZHF (Zinc Homeostasis Factor) de la famille CDF, qui assure vraisemblablement le transport du Zn et probablement celui du Cd à l'intérieur du réticulum endoplasmique, rend les cellules de *S. pombe* remarquablement tolérantes au Cd<sup>2+</sup> (Clemens *et al.*, 2002b). Cependant, un rôle des transporteurs de la famille CDF dans la désintoxication des métaux non essentiels comme le cadmium n'a pas encore été montré chez les plantes (Clemens, 2006).

### 5.3.5.1.7. Les transporteurs P-type ATPase de la famille HMA

D'autres transporteurs connus de cadmium sont les ATPases de type P de la sous-famille 1B, connu sous le nom d'HMAs (Heavy Metal transporting P<sub>1B</sub>-type ATPases) (Axelsen et Palmgren, 2001). Chez *A. thaliana*, la famille HMA se divise en deux groupes, les pompes LsHMA2 à 4 transportent les cations bivalents tels que

$Cd^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ , tandis que les pompes LsHMA1 et LsHMA5-8 transportent les cations monovalents (Ag, Cu...) (Williams et Mills, 2005). Les deux gènes *AtHMA2* et *4* sont exprimés au niveau des tissus vasculaires, pour assurer la charge du xylème en zinc (Verret *et al.*, 2004). Les ions  $Cd^{2+}$  sont un deuxième substrat pour ces pompes métalliques. La surexpression d'*AtHMA4* chez le mutant *ycf1* de *S. cerevisiae* complémente l'hypersensibilité au  $Cd^{2+}$  de ce mutant *ycf1* (YCF1: Yeast Cadmium Factor 1) est un transporteur localisé sur la membrane vacuolaire de *S. cerevisiae* et participe à la détoxification du Cd (Li et Kaplan, 1997) et du Hg (Gueldry *et al.*, 2003)). Les lignées mutantes d'*A. thaliana hma4* montrent une faible réduction de croissance en présence de  $Cd^{2+}$  par comparaison au sauvage (Mills *et al.*, 2005). D'autre part, Verret *et al.* (2004) montrent clairement qu'*AtHMA4* joue un rôle important dans la translocation du cadmium des racines vers les feuilles chez *A. thaliana*: une surexpression d'*AtHMA4* provoque une augmentation du contenu des feuilles en cadmium alors que la mutation *hma4* est à l'origine d'un transport plus faible de cadmium des racines vers les parties aériennes. Récemment, Hanikenne *et al.* (2008) ont attribué l'hyperaccumulation des métaux observée chez *A. halleri* à la présence de trois copies du gène *HMA4*, contre une seule copie chez *A. thaliana*, ainsi qu'à une augmentation très importante de l'expression de ces gènes chez *A. halleri*. Enfin, des croisements entre les deux espèces interfertiles *A. halleri* et *Arabidopsis lyrata* ont permis d'identifier un QTL (Quantitative Trait Loci, en français locus d'intérêt quantitatif) de tolérance au cadmium qui se colocalise avec le gène *HMA4* (Courbot *et al.*, 2007). Le gène *HMA4* semble être un acteur majeur du transport du cadmium des racines vers les parties aériennes *in planta*.

Chez *A. thaliana*, le gène *HMA2* semble jouer un rôle dans la translocation du cadmium des racines vers les parties aériennes. Néanmoins, son rôle reste secondaire, du fait que son inactivation n'a pas de conséquence phénotypique en soi (Hussain *et al.*, 2004 ; Wong *et al.*, 2009a ; Wong *et al.*, 2009b). Toutefois, la double mutation *hma2 hma4* montre mieux le phénotype de faible translocation de cadmium des racines vers les parties aériennes par comparaison à la simple mutation *hma4*. Cela montre que *HMA2* est fonctionnellement redondant avec *HMA4*. (Wong *et al.*, 2009a ; Wong *et al.*, 2009b).

Par comparaison aux gènes *HMA2* et *HMA4*, le gène *HMA3* joue un rôle très différent chez *A. thaliana*. La tolérance au cadmium conférée par l'expression de *HMA3* chez la levure ainsi que la localisation tonoplastique de *HMA3*-GFP montrent l'implication

de ce gène dans la séquestration vacuolaire du cadmium (Gravot et al., 2004). In planta, Morel et al. (2009) ont confirmé qu'*AtHMA3* était localisé sur le tonoplaste. Ils ont montré que la surexpression d'*AtHMA3* améliorait la tolérance des plantes au cadmium et qu'elle induisait une augmentation du contenu des feuilles en cadmium d'un facteur 2 à 3 par comparaison aux plantes sauvages. *AtHMA3* joue vraisemblablement un rôle important dans la séquestration vacuolaire du cadmium, une fonction originale pour une ATPase de type P<sub>1B</sub> chez un organisme eucaryote multicellulaire.

### 5.3.5.2. Les canaux calciques

Des études ont montré que des canaux calciques étaient impliqués dans le prélèvement de Cd<sup>2+</sup> par les cellules de mammifères (Hinkle et al., 1992). Pour les plantes, l'idée que l'absorption de Cd<sup>2+</sup> puisse être réalisée par l'intermédiaire de canaux calciques est survenue suite à des études de Perfus-Barbeoch et al. (2002) qui ont montré par électrophysiologie que les canaux calciques des cellules de garde sont perméables au Cd<sup>2+</sup> (Chez *Vicia faba*). Cependant, un rôle dans le transport du cadmium chez les plantes n'a pas encore été montré avec certitude.

Malgré l'existence de plusieurs systèmes de transport qui sont potentiellement susceptibles de transporter le cadmium dans la plante, on n'a aucune idée de l'importance relative de tel ou tel système dans le contrôle effectif de l'accumulation du cadmium dans les différents organes ou tissus de la plante.

## 6. La laitue

### 6.1. Présentation

La laitue (*Lactuca sativa*) est une plante qui appartient à la famille des Astéracées (ex-composées), division des magnoliophytes, et la classe des magnoliopsides.

La laitue est une plante herbacée, annuelle, avec deux phases bien distinctes: la phase végétative, formant une pomme plus ou moins fermée, correspond au stade de développement utilisé pour la commercialisation, et la phase reproductrice au cours de laquelle la tige principale s'allonge (montaison) aboutit à la floraison et à la production de graines.

L'origine de la laitue cultivée est incertaine: est-ce une descendante de la forme sauvage *Lactuca serriola* ou une demi-sœur de *L. serriola* ? D'après le botaniste

Boissier, l'espèce laitue pourrait provenir de formes sauvages originaires des montagnes du Kurdistan. Sa culture n'est pas très ancienne puisque les premières mentions indiscutables de culture de laitue ont été trouvées dans la littérature grecque et romaine. La laitue semble avoir été très populaire dans le monde grec (nom: *tridax*) et romain (nom: *lactuca*).

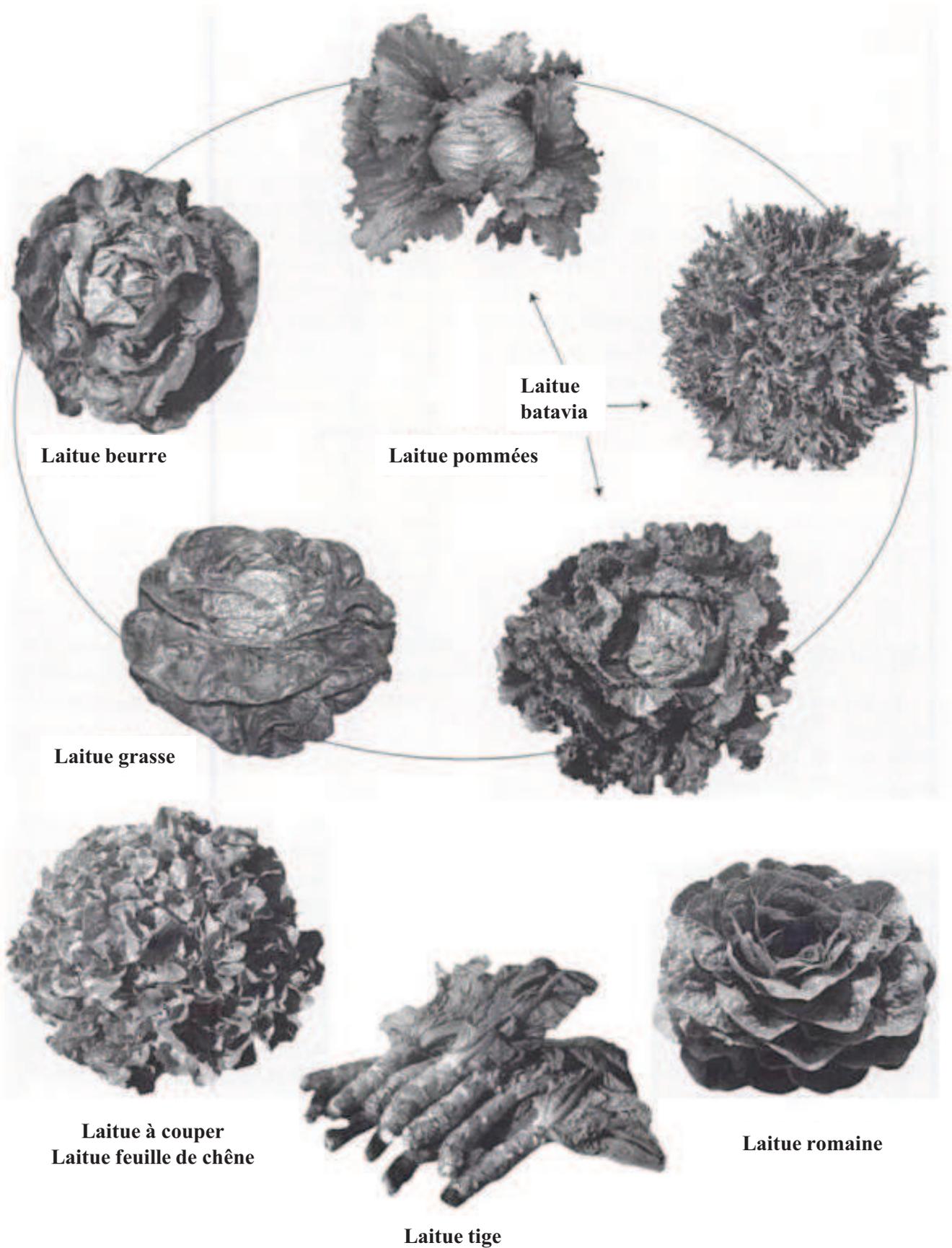
La laitue cultivée se distingue des formes sauvages par plusieurs caractères morphologiques dits de domestication: formation d'une pomme, ou tout au moins d'un stade végétatif marqué, avec un grand nombre de feuilles formant un paquet plus ou moins serré, absence d'épines sous les feuilles, diminution du latex et de l'amertume, capitules resserrés dans les bractées permettant de retenir les graines sur la plante à maturité (d'après Pitrat et Foury, 2004).

## 6.2. Les différents cultigroupes de laitue

Durant la phase végétative, la plante de laitue forme d'abord une rosette de feuilles entières. Puis survient la période de pomaison, au cours de laquelle se différencient les types de laitue. En effet, les feuilles se redressent, s'imbriquent plus ou moins, aboutissant à la formation d'une pomme fermée ou d'un ensemble de feuilles serrées formant un bouquet ouvert.

Plusieurs types de plantes ont été définis en fonction de la forme de la pomme ainsi que de la forme et de la texture des feuilles. Des dénominations très différentes ont été utilisées dans la pratique et l'unité botanique n'est guère perçue par le consommateur. Parmi les salades vertes commercialisées, le consommateur peut choisir entre plusieurs laitues de forme, couleur, texture et goût différents. Au XIX<sup>e</sup> siècle, cinq variétés botaniques ont été définies. Cette nomenclature est tombée en désuétude et a été remplacée par des cultigroupes définis par quelques caractères morphologiques:

- les laitues pommées comprenant les laitues beurre à feuilles tendres et nervures pennées et les laitues batavia à feuilles plus craquantes et nervures parallèles. Ces deux types ont des pommes assez rondes. À l'origine les laitues beurre avaient des feuilles fines, souvent claires, d'où leur nom. Les batavias ont été elles-mêmes subdivisées en batavia et *iceberg*.



**Photo 1.1.** La diversité de la laitue. Des types, pommant ou non (laitue à couper), sont cultivés pour leurs feuilles; mais on rencontre également des types cultivés pour leur tige (laitue asperge ou celtuce). D'après Pitrat et Foury, 2004.

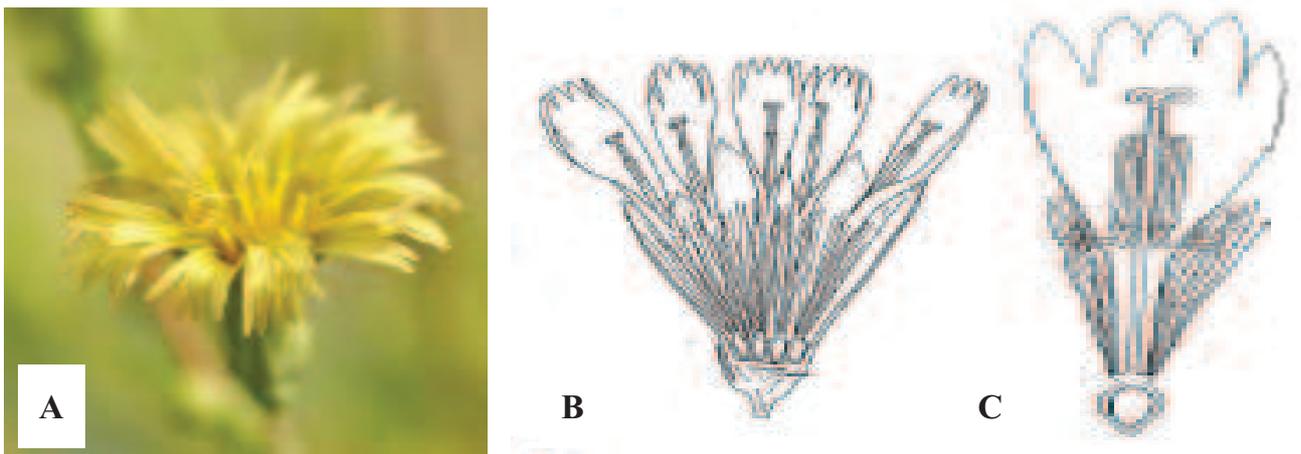
- Les laitues grasses sont des laitues pommées à feuilles épaisses, assez craquantes et nervures pennées;
- les laitues romaines sont des laitues à feuilles oblongues et craquantes avec une grosse nervure centrale; elles ont une pomme allongée;
- les laitues à couper se présentent comme un bouquet de feuilles ouvert; selon la forme des feuilles, plus ou moins lobées ou découpées, elles sont subdivisées en plusieurs catégories.
- Les laitues tigent, ou laitues asperge ou celtuce ne forment jamais de pomme; elles sont cultivées pour leurs tiges renflées que l'on mange cuites, surtout en Asie (d'après Pitrat et Foury, 2004) (Photo 1.1).

### 6.3. Biologie florale de la laitue

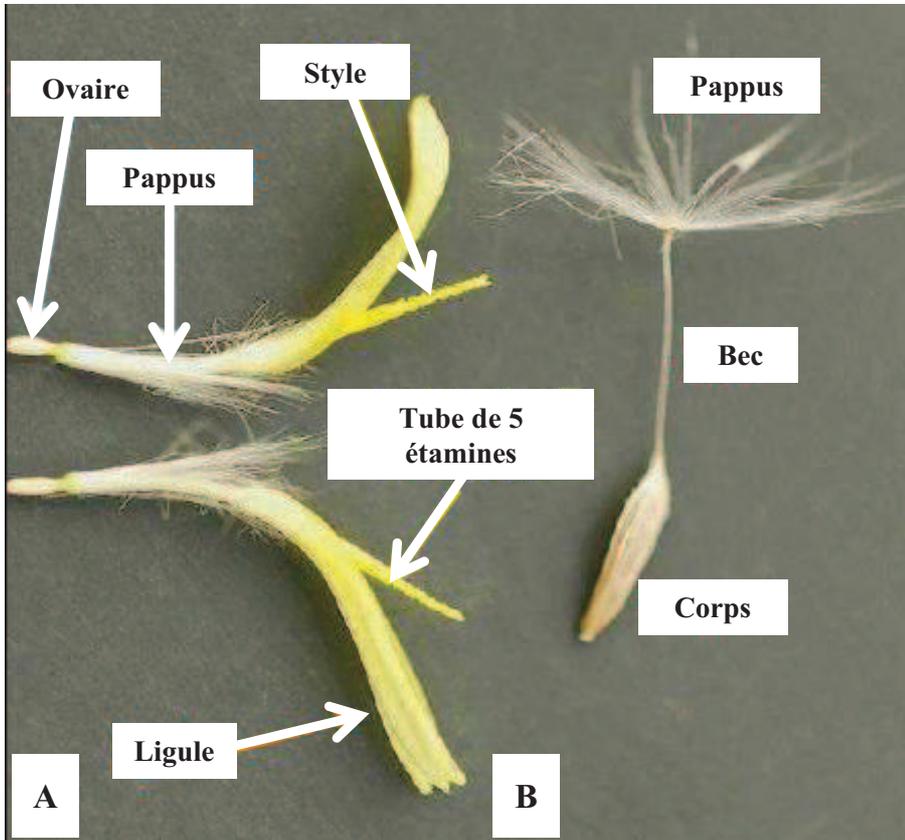
Après la phase végétative, la tige s'allonge et la hampe florale ramifiée en corymbe se développe. Les plantes ont alors 1 m à 1,5 m de haut (Photo 1.2. B) et portent de nombreux capitules (appelés couramment fleurs) de 10 à 15 fleurons (Photo 1.3). Tous les fleurons sont ligulés et présentent un développement quasi synchrone. Les ligules sont jaunes avec, chez certaines variétés, la face externe anthocyanée. La ligule correspond à 5 pétales soudés que l'on peut identifier en comptant ses dents. L'inflorescence ne s'ouvre qu'une fois, le matin après le lever du soleil. À l'écartement des ligules, les stigmates ne sont pas visibles. Ils sont entièrement à l'intérieur du manchon des 5 étamines. Puis le style s'allonge et le stigmate apparaît déjà chargé de pollen; si les conditions climatiques sont bonnes, dans les minutes qui suivent, le capitule se referme et l'unique ovule de chaque fleuron est fécondé. La graine va grossir dans les 15 jours suivants l'ouverture du capitule (Photo 1.5). À maturité, elle est enfermée dans les bractées et reste sur la plante. La « graine » (en réalité un fruit sec ou akène) est formée de deux parties, le corps de la graine, dur, oblong, de couleur brun foncé (graines noires) ou blanc-crème (graines blanches), et le bec portant une aigrette ou pappus qui est éliminé au battage (Photo 1.4). La montaison est plus ou moins rapide selon les conditions climatiques et les génotypes. Elle est favorisée par des jours longs et de hautes températures (d'après Pitrat et Foury, 2004).



**Photo 1.2.** Aspect morphologique de plantes de laitue durant la phase végétative au cours de laquelle la plante forme une rosette de feuilles (A). Aspect morphologique d'une plantes de laitue durant la phase reproductrice au cours de laquelle la tige principale s'allonge aboutissant à la floraison et à la production de graines (B) .



**Photo 1.3.** Aspect morphologique (A) et schéma d'un capitule de laitue (appelé couramment fleur) (B), chaque capitule porte de 10 à 15 fleurons (C).  
Photos de Dr. Brigitte Maisonneuve (INRA Avignon)

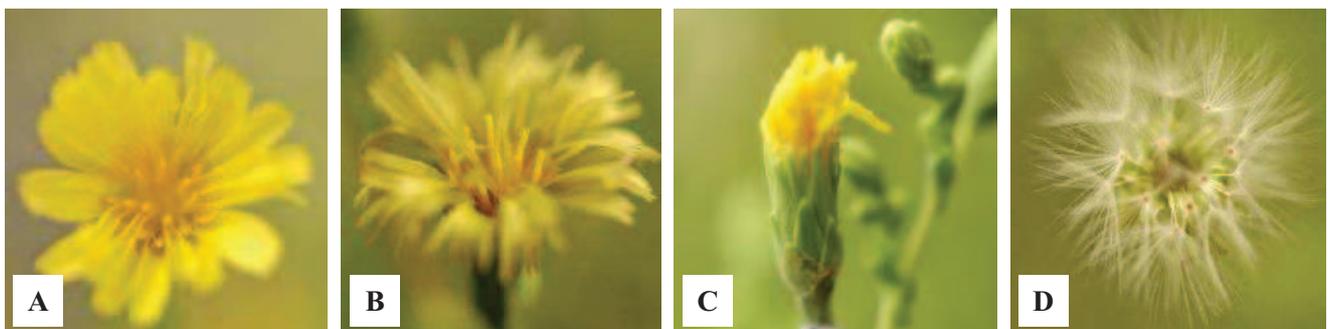


**Photo 1.4.** Aspect morphologique d'un fleuron de laitue (A).

Aspect morphologique d'un fruit (akène) contenant la graine de laitue (B et C) .

Le pappus permet le transport du fruit par le vent

Photos de Dr. Brigitte Maisonneuve (INRA Avignon)



**Photo 1.5.** Aspect morphologique d'un capitule de laitue avant l'autopollinisation (A), en cours d'autopollinisation (B), après autofécondation (C) et après deux semaines de l'autofécondation (D).

Après ouverture du capitule le matin, le style s'allonge et traverse le manchon d'étamines en se chargeant de pollen induisant l'autopollinisation de la fleur.

Photos de Dr. Brigitte Maisonneuve (INRA Avignon)

#### 6.4. La production des hybrides

La structure des capitules de laitue favorise fortement l'autogamie. Néanmoins, la pollinisation croisée n'est pas totalement exclue. Tous les types de laitue sont parfaitement intercompatibles et des croisements manuels entre ces types sont couramment réalisés par les sélectionneurs. La castration manuelle est délicate, effectuée à l'ouverture du capitule par ablation à la pince du manchon d'étamines de chaque fleuron ou par lavage des capitules à l'eau. Des stérilités mâle, généralement utilisées par les sélectionneurs pour produire des variétés hybrides, ont été identifiées. Mais l'absence d'insectes pollinisateurs assez efficaces et le faible nombre de graines par capitule n'ont pas permis d'utiliser ce caractère en production de semences. Aussi, les variétés commerciales sont toutes des variétés fixées reproduites par autofécondation. Néanmoins, la stérilité mâle, associée à une pollinisation manuelle peut être une aide pour le sélectionneur (d'après Pitrat et Foury, 2004).

#### 6.5. Ressources génomiques

La laitue est une espèce diploïde ( $2n=18$ ). Son génome est d'une taille très grande (entre 2.6 et 2.7 Gb), à savoir 16 fois plus grand que celui d'*A. thaliana* (Michaelson *et al.*, 1991). Mis à part des séquences EST et des séquences du génome chloroplastique, les ressources génomiques de la laitue sont très limitées. Les deux principaux projets qui se sont intéressés au séquençage de la laitue sont :

- un projet américain (The Compositae Genome Project - University of California, Davis - Project ID NCBI: 12868) qui a engendré les 80779 séquences EST disponibles dans les banques de données et qui correspondent à 26720 gènes (<http://compgenomics.ucdavis.edu>).
- un projet japonais (Project ID NCBI: 16160 - Research Institute of Innovative Technology for the Earth) qui a permis d'engendrer les séquences du génome chloroplastique elles aussi disponibles dans les banques de données.

Une carte génétique correspondant à plus de 2700 marqueurs groupés en 9 «linkage groups» a été élaborée suite à un croisement interspécifique entre *L. sativa* et *L. serriola* (Landry *et al.*, 1987; Kesseli *et al.*, 1994; Truco *et al.*, 2007). Ces lignées recombinantes ont été produites dans le cadre du projet européen ANGEL (<http://www.plant.wageningen-ur.nl/projects/angel/>), et elles ont été distribuées à plusieurs groupes de recherche pour la réalisation de la cartographie. Grâce à cette

carte, plusieurs QTL ont été identifiés pour plusieurs caractères phénotypiques y compris par exemple: l'architecture racinaire, la dormance des graines, la teneur en huile...(Johnson et *al.*, 2000). De nombreux gènes de résistance à plusieurs maladies ont aussi été caractérisés grâce à cette carte (Kesseli et *al.*, 1993, Kesseli et *al.*, 1994; Maisonneuve et *al.*, 1994; Robbins et *al.*, 1994).

Actuellement, un nouveau projet est en cours de développement (Lettuce SFP Chip Project) dont l'objectif est d'exploiter une puce à ADN (Affymetrix high density GeneChip<sup>®</sup> microarray) pour la détection de polymorphisme du type SFP (Single Feature Polymorphisms) pour plus que 35000 gènes de laitue (<http://chiplett.ucdavis.edu>).

Vu les ressources génomiques très limitées chez la laitue, l'initiation d'une approche moléculaire chez cette espèce est un travail assez lourd.

## 6.6. Ressources génétiques

La base de données des ressources génétiques internationale du genre *Lactuca* (The International *Lactuca* database ; <http://documents.plant.wur.nl/cgn/pgr/ildb/>) montre plus de 12000 accessions du genre *Lactuca* appartenant à plusieurs collections dans le monde. Néanmoins, un chevauchement considérable existe entre les collections.

Le centre des ressources génétiques de Wageningen inclut 2429 accessions de laitue y compris les espèces sauvages. Mis à part cette collection, d'autres petites collections existent partout dans le monde.

## 6.7. La laitue: espèce "à risque"

La laitue est connue par sa capacité d'accumuler en quantité importante du cadmium dans ses feuilles (Mensch et Baize, 2004). Elle est de ce fait classée de ce fait parmi les espèces "à risque". La laitue présente une grande diversité génétique pour le caractère accumulation de cadmium (Costa et Morel, 1994b). Elle constitue ainsi un bon modèle d'étude.

Plusieurs travaux de recherche se sont intéressés à l'étude de l'espèce laitue et à son comportement vis-à-vis du cadmium. Certaines de ces études ont visé à comprendre les phénomènes d'absorption et de distribution du cadmium entre les différentes parties de la plante ainsi que l'effet du cadmium sur la croissance et la production de la biomasse (Garate et *al.*, 1993 ; Costa et Morel, 1994a ; Costa et Morel, 1994b). Globalement ces études ont toutes montré que le cadmium avait un effet toxique sur la

production de la biomasse chez la laitue. Cet effet toxique se manifeste par une réduction de la production de la biomasse des parties aériennes et des racines ainsi que par une accumulation de cadmium plus importante dans les racines par comparaison aux feuilles (Garate et *al.*, 1993 ; Costa et Morel, 1994b). Une autre étude a cherché à mieux comprendre les mécanismes permettant l'absorption du cadmium par la laitue en utilisant du cadmium marqué (Costa et Morel., 1994a). Cette étude a montré que l'absorption du cadmium est un phénomène actif impliquant une pompe du type  $H^+$ ATPase qui pourrait être partiellement inhibée par des inhibiteurs métaboliques. Une étude récente a eu pour objectif de modéliser le phénomène d'absorption du cadmium par la laitue (Chen et *al.*, 2008). Cette étude a montré que le phénomène d'absorption de cadmium est un phénomène de nature dynamique modulé principalement par deux facteurs, la concentration de cadmium dans le milieu de culture et les teneurs en cadmium dans la plante.

L'interaction du cadmium avec plusieurs éléments minéraux a aussi été étudiée chez la laitue, pour mieux comprendre les mécanismes physiologiques intervenant dans l'absorption du cadmium, mais aussi pour élaborer des stratégies d'amélioration variétale limitant l'accumulation de cadmium dans une espèce cultivée. Ces études ont montré une forte relation de compétition entre le cadmium et d'autres cations essentiels notamment le  $Fe^{2+}$  et le  $Mn^{2+}$  (Ramos et *al.*, 2002, Thys et *al.*, 1991). Ces observations s'expliquent par des compétitions entre le cadmium et les autres cations sur leurs sites de transport (Ramos et *al.*, 2002, Thys et *al.*, 1991).

Malgré l'existence de certains travaux de recherche qui se sont intéressés à l'étude de l'espèce laitue et à son comportement vis-à-vis du cadmium, les résultats restent peu satisfaisants, et les mécanismes impliqués dans l'accumulation du cadmium chez cette espèce restent presque indéchiffrables. De même, aucun travail de recherche n'a tenté de se lancer dans une approche génétique ou bien moléculaire afin d'identifier ces mécanismes. De ce point de vue, notre étude qui a eu comme objectif d'identifier des déterminants physiologiques, génétiques et moléculaires contrôlant l'accumulation de cadmium chez la laitue est en rupture avec les travaux précédemment conduits chez la laitue.

## Chapitre II

### Matériels et méthodes

Tableau 2.1. Composition minérale de la solution nutritive

Eléments	Concentration finale dans la solution nutritive
<b>Macro-éléments</b>	
KNO <sub>3</sub>	2,5 (mM)
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 2(H <sub>2</sub> O)	0,5 (mM)
Ca (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> 4(H <sub>2</sub> O)	2,5 (mM)
Mg SO <sub>4</sub> 7(H <sub>2</sub> O)	0,5 (mM)
<b>Fer</b>	
Fe Na EDTA	0,1 (mM)
<b>Micro-éléments</b>	
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,05 (mM)
Mn SO <sub>4</sub> (H <sub>2</sub> O)	0,05 (mM)
Zn SO <sub>4</sub> 7(H <sub>2</sub> O)	0,015 (mM)
Mo O <sub>4</sub> Na <sub>2</sub> 2(H <sub>2</sub> O)	0,003 (mM)
KI	0,0025 (mM)
CuSO <sub>4</sub> 5(H <sub>2</sub> O)	0,05 (μM)
CoCl <sub>2</sub> 6(H <sub>2</sub> O)	0,044 (μM)

## Chapitre II Matériels et méthodes

### 1. Matériel végétal

La laitue (*Lactuca sativa*) est une plante herbacée, annuelle, originaire de l'Asie de l'Ouest et appartenant à la famille des Astéracées. La laitue présente deux phases bien distinctes: la phase végétative, formant une pomme plus ou moins fermée et la phase reproductrice, au cours de laquelle la tige principale s'allonge pour aboutir à la floraison et la production de graines. Selon quelques caractères morphologiques, on peut répertorier les laitues en différents cultigrupes: les laitues pommées, les laitues romaines, les laitues à couper... (voir chapitre I).

Tout au long de nos expériences, 18 génotypes de laitue ont été utilisés. Ces 18 génotypes nous ont été fournis par Dr. Brigitte Maisonneuve de l'Unité de Génétique et Amélioration des Fruits et Légumes (INRA Avignon), et ils ont été choisis parmi différents cultigrupes de laitue afin de mieux représenter la diversité génétique de l'espèce. Ils ont aussi été choisis sur la base d'études physiologiques décrivant le comportement de la laitue vis-à-vis du cadmium (Costa et Morel, 1994a; Thys et *al.*, 1991 ; Ramos et *al.*, 2002 ; Maier et *al.*, 2003). Parmi ces 18 génotypes, nous avons inclus 2 génotypes de *L. serriola*, espèce sauvage apparentée à *L. sativa*, et interfertile avec elle. Les génotypes sont listés dans le (Tableau 3.1).

### 2. Conditions de culture

Toutes nos expériences ont été conduites dans une salle climatisée sous un plafond lumineux, avec une photopériode de 16 heures de lumière et un rayonnement efficace de  $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . La température et l'humidité relative moyennes étaient respectivement de 20°C et 70 %. Les graines, placées sur du papier Whatman stérile, ont été humidifiées pendant 5 jours avec de l'eau distillée puis avec une solution nutritive de Hoagland diluée 2 fois. La composition du milieu de culture utilisé est détaillée dans le tableau 2.1. À l'âge de 10 jours, les plantules ont été transférées sur des flotteurs placés dans des bassines contenant 8l de la solution nutritive (24 plantes par bassine). Quatre jours après le transfert des plantules de laitue sur le système hydroponique, c'est-à-dire au 14<sup>e</sup> jour de la culture, les traitements  $\text{CdCl}_2$  ont été effectués à des concentrations finales entre 15 et 50  $\mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$ .

Si nécessaire, des plantes cultivées en absence de cadmium ( $0 \mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$ ) ont été utilisées à titre de témoin. Les récoltes ont été faites le 22<sup>e</sup> jour du traitement, soit après 8 jours de traitement. Afin d'homogénéiser au maximum les conditions de culture, la disposition et l'orientation des bassines ont été changées aléatoirement tous les 2 jours. Durant toute la durée de l'expérience, la solution nutritive a été changée tous les 4 jours, et était aérée en permanence. Le protocole de culture est schématisé sur la Figure 2.1.

### **3. Récolte des plantes**

Lors de la récolte, les parties aériennes des plantes ont été séparées des racines. Afin d'éliminer le cadmium non absorbé par la plante, les racines ont été lavées trois fois par une solution de  $\text{CaCl}_2$   $0,5 \text{ mM}$  maintenue à  $4^\circ\text{C}$ , puis soigneusement essorées entre deux couches de papier absorbant. Si nécessaire, la matière fraîche des parties aériennes et des racines a été pesée immédiatement après la récolte. Les échantillons ont été ensuite placés dans des tubes thermorésistants et ont été soumis à dessiccation pendant 48h à  $80^\circ\text{C}$ . La matière sèche des différents échantillons (parties aériennes et racines) a ensuite été pesée.

### **4. Extraction et dosage des ions minéraux**

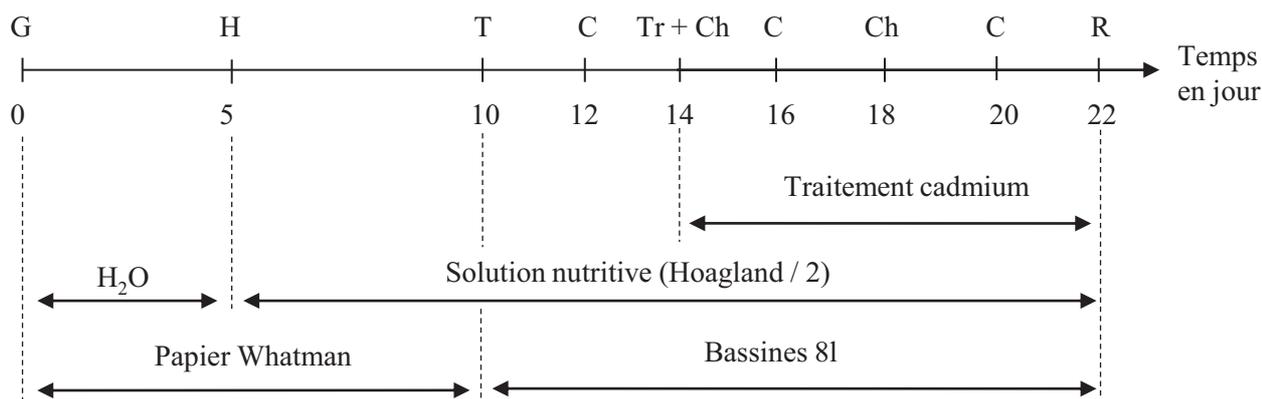
#### **4.1. Extraction et dosage des cations**

Les échantillons de matière sèche sont incubés dans 2ml d'acide sulfurique ( $\text{H}_2\text{SO}_4$  1N) pendant 30 min à  $80^\circ\text{C}$  puis sont laissés pendant une nuit à température ambiante. Ceci permet l'extraction totale des éléments de l'échantillon.

Les différents cations ( $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$  et  $\text{Ca}^{2+}$ ) ont été analysés à l'aide d'un spectrophotomètre à absorption atomique (Atomic Absorption Spectrometer (SpectrAA 220 Varian)). Pour chaque élément, une gamme étalon a été effectuée (Tableau 2.2).

#### **4.2. Extraction et dosage des anions majeurs**

Après détermination de la masse de la matière fraîche (MF), les anions sont extraits par incubation des tissus dans de l'eau Milli-Q à  $70^\circ\text{C}$  durant 30 min. Le surnageant est récupéré après 3 centrifugations successives à 14000 tr/min à  $4^\circ\text{C}$ .



**Figure 2.1.** Représentation schématique du protocole expérimentale adopté pour la culture hydroponique.

**G:** germination; **H:** ajout de la solution nutritive Hoagland; **T:** transfert sur milieu hydroponique; **C:** changement de l'orientation et de la disposition des bassines, **Tr:** application du traitement cadmium; **Ch:** changement du milieu de culture; **R:** récolte.

**Tableau 2.2.** Appareil et gammes d'étalonnage utilisées dans le dosage des ions

Ion	Gamme d'étalonnage, mg.l <sup>-1</sup>	Produit utilisé	Appareil
Cd <sup>2+</sup>	0 ; 0,3 ; 0,5 ; 0,7 ; 1 ; 2 ; 3 ; 4 ; 5	CdCl <sub>2</sub>	Spectrophotomètre à Absorption Atomique
Zn <sup>2+</sup>	0 ; 0,5 ; 1 ; 2 ; 3 ; 5 ; 7 ; 10	Zn SO <sub>4</sub> 7(H <sub>2</sub> O)	
Ca <sup>2+</sup>	0 ; 0,5 ; 1 ; 2 ; 5 ; 10 ; 20	Ca (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> 4(H <sub>2</sub> O)	
K <sup>+</sup>	0 ; 0,1 ; 0,2 ; 0,3 ; 0,4 ; 0,7 ; 1	KNO <sub>3</sub>	

La quantification des anions majeurs a été effectuée par HPIC (High-Performance Ionic Chromatography ; ICS-2500 apparatus; Dionex) en utilisant une colonne IonPac AS11 et un gradient NaOH (1-35,4 mM). La concentration en NaOH a été augmentée de façon linéaire de 3,5 à 5 mM en 3 min, puis de 5 à 35,4 mM en 8min. L'identification et la quantification de chaque anion ont été effectuées en utilisant le logiciel Chromeleon (Dionex).

## 5. Détermination des paramètres physiologiques

### 5.1. Paramètres de croissance

#### 5.1.1. Production de la biomasse

Les masses de matière fraîche sont déterminées à l'aide d'une balance de précision du type Sartorius Basic. Celles de la matière sèche sont déterminées après dessiccation à l'étuve à 80°C, pendant 48 h.

#### 5.1.2. Croissance relative

La croissance relative est déterminée par la formule suivante:

$$\text{La croissance relative} = (\text{Masse des plantes traitées} / \text{Masse des plantes témoins}) * 100$$

### 5.2. Paramètres hydriques

Tout au long de notre étude l'hydratation des tissus a été estimée grâce au rapport biomasse sèche sur biomasse fraîche exprimé en pourcentage.

### 5.3. Détermination des teneurs ioniques

#### 5.3.1. La teneur des éléments

La teneur de chaque élément, exprimée en  $\mu\text{g} / \text{g}$  de matière sèche est déterminée à partir de la concentration de l'échantillon analysé au spectrophotomètre par la formule suivante :

$$\text{Teneur } (\mu\text{g} / \text{gMS}) = \frac{\text{concentration de l'échantillon } (\mu\text{g} / \text{l}) * \text{dilution de l'extrait} * \text{volume d'extraction (l)}}{\text{masse de la matière sèche (g)}}$$

### 5.3.2. Translocation des éléments des racines vers les parties aériennes

La translocation d'un élément des racines vers les parties aériennes est définie comme la proportion entre la quantité de cet élément présente dans les parties aériennes et la quantité totale de cet élément présente dans la plante :

$$\text{Translocation} = \frac{\text{quantité accumulée dans les feuilles } (\mu\text{g})}{\text{quantité accumulée dans les racines } (\mu\text{g}) + \text{quantité accumulée dans les feuilles } (\mu\text{g})} * 100$$

## 6. Technique de production des hybrides

La structure des capitules de laitue favorise fortement l'autogamie. Néanmoins, la pollinisation croisée n'est pas totalement exclue. Tous les types de laitue sont parfaitement intercompatibles et des croisements manuels entre ces types sont couramment réalisés par les sélectionneurs (Pitrat et Foury, 2004). Durant notre travail la production de plantes hybrides a été faite par des croisements manuels qui ont été réalisés en deux étapes. Pour les capitules des parents femelles, une première étape de castration a été effectuée à l'ouverture du capicule par ablation à la pince du manchon d'étamines de chaque fleuron et aussi par lavages des capitules à l'eau. L'étape suivante est l'étape de pollinisation : elle a consisté à frotter les capitules de parents mâles sur les capitules femelles castrés, après allongement des stigmates de ces dernières (Photo 2.1).

## 7. Mesure de l'influx, de l'efflux et de la translocation des racines vers les parties aériennes du cadmium marqué $^{109}\text{Cd}$

Les mesures d'influx, d'efflux et de translocation des racines vers les parties aériennes du cadmium marqué  $^{109}\text{Cd}$  ont été réalisées avec des plantes de laitue âgées de 5 à 6 semaines.

### 7.1. Mesure de l'efflux racinaire et de la translocation

Afin de mesurer l'efflux racinaire du cadmium marqué  $^{109}\text{Cd}$ , chacune des plantes a été chargée avec du  $^{109}\text{Cd}$  pendant 3 heures en utilisant un milieu Hoagland / 2 marqué avec 1,67 kBq/ml de cadmium radioactif  $^{109}\text{Cd}$ . Afin de se mettre dans des conditions d'un traitement cadmium, notre solution a été additionnée avec du  $\text{CdCl}_2$  à la concentration finale de 1  $\mu\text{M}$ .



**Photo 2.1.** Production des plantes hybrides par croisement manuel:

Etape 1: castration par ablation à la pince du manchon d'étamines (A) et par lavages des capitules à l'eau (B).

Etape 2: pollinisation par frottement des capitules des parents mâles sur les capitules femelles castrés (après allongement des stigmates) (C).

Photos de Dr. Brigitte Maisonneuve (INRA Avignon)

Après cette étape de marquage, chaque plante a été lavée dans une solution froide de  $10\mu\text{M}$  de  $\text{CaCl}_2$  afin d'éliminer le cadmium adsorbé par les racines. Suite à cette étape, chaque plante a été placée dans une solution de  $10\mu\text{M}$  de  $\text{CaCl}_2$  sous agitation et à température ambiante (solution d'efflux). Pour suivre l'efflux racinaire du cadmium marqué en fonction du temps, des prélèvements de 1ml de la solution d'efflux ont été effectués au bout de 5s, 1min, 2 min, 5min, 10 min et 15 min. Après quantification de la radioactivité présente dans ces échantillons en utilisant un compteur Gamma (PerkinElmer Wizard 1470 Gamma counter), l'efflux racinaire du cadmium marqué a été exprimé en nombre de CPM (coups par minute) de la solution d'efflux / mg de matière fraîche racinaire.

Le pourcentage de translocation du cadmium marqué des racines vers les parties aériennes a alors été déterminé. Pour cela, les parties aériennes et les racines de chaque plante ont été séparées, essuyées, pesées et passées sur compteur Gamma.

## 7.2. Mesure de l'influx racinaire

Pour mesurer l'influx racinaire de cadmium marqué  $^{109}\text{Cd}$ , les racines des plantes ont été placées pendant 5 min dans une solution contenant du milieu Hoagland / 2 additionnée de  $\text{CdCl}_2$  à la concentration finale de  $1\mu\text{M}$  et marquée avec du  $^{109}\text{Cd}$  à raison de 1.67 kBq/ml. Après 5 min de marquage, chaque plante a été lavée dans une solution constituée de  $10\mu\text{M}$  de  $\text{CaCl}_2$  et maintenue à  $4^\circ\text{C}$ . Les racines ont été ensuite séparées des parties aériennes, essuyées, pesées et passées sur compteur Gamma. Les résultats ont été exprimés en nombre de CPM / mg de matière fraîche racinaire.

## 8. Techniques de biologie moléculaire

### 8.1. Extraction d'ADN génomique

L'extraction d'ADN se fait à partir de feuilles congelées (4 à 5 jeunes feuilles). Les échantillons sont broyés dans de l'azote liquide à l'aide d'un mortier, mis dans des tubes de 15ml, puis repris dans 4,5ml de tampon d'extraction (EDTA 50 mM pH8, NaCl 500 mM, Tris-HCl 100 mM pH 8,  $\beta$ -mercaptoéthanol 10 mM) et 300  $\mu\text{l}$  de SDS 20% (p/v) (Sodium dodécyl sulfate). Le mélange est incubé pendant 10 min à  $65^\circ\text{C}$ . On ajoute un volume de 1,5 ml d'un mélange d'acétate de potassium 5M (Acétate de potassium 60 % (v/v), Acide acétique pur 11,5 % (v/v),  $\text{H}_2\text{O}$  28,5 % (v/v)) et on incube pendant 20 min dans la glace.

Après centrifugation à une vitesse 10000 xg à 4°C pendant 10 min, le surnageant est filtré sur tissu "Miracloth" puis mélangé avec 3,6 ml d'isopropanol. Le mélange est incubé pendant 20 min à -20°C puis centrifugé à 10000 xg à 4°C pendant 20 min. Le culot est repris dans 1 ml de Tris 50 mM pH 8 et 3 µl de RNase, puis incubé pendant ¾ d'heure à 37°C. Au bout des ¾ d'heure le contenu est centrifugé pendant 10 min à 10000 xg. Puis le surnageant est reparti dans deux tubes de 1,5 ml. On ajoute 1/10 volume d'acétate de sodium 3M pH 5,2 et 2 volumes d'éthanol pur. Après homogénéisation et incubation pendant 20 min à -20°C, les échantillons sont centrifugés à 14000 xg à 4°C pendant 10 min. Le culot est ensuite rincé avec 1 ml d'éthanol 70 % (v/v), centrifugé à 14000 xg pendant 10 min, et laissé pour sécher pendant une nuit. Le culot sec est alors repris dans 200 µl d'eau Milli-Q.

## 8.2. Dosage de l'ADN et de l'ARN

L'ADN et l'ARN sont dosés au spectrophotomètre. 1 µl d'échantillon est dilué 80 fois dans l'eau. L'absorbance (A) est déterminée à 260 nm. Pour l'ADN 1 unité d'absorbance à 260 nm correspond à une concentration de 50 µg/ml. La quantité d'ADN est par la suite déterminée par la formule suivante:  $Q = (A_{260} * \text{facteur de dilution} * 50)$  où Q est exprimée en µg/µl. Pour l'ARN 1 unité d'absorbance à 260 nm correspond à une concentration de 40 µg/ml.

## 8.3. Amplification des séquences par PCR

Les réactions PCR sont réalisées dans un volume final de 40 µl en présence de 3 µl d'ADN génomique (1-20 ng), d'1 unité d'ADN Polymérase GoTaq (GoTaq™ DNA Polymerase, Promega), du tampon approprié à l'enzyme (Green GoTaq™ Reaction Buffer, Promega), de 20 pmol d'amorces et des dNTPs à une concentration finale de 125 µM. Les séquences des amorces utilisées sont données dans les Annexes.

L'amplification est assurée à l'aide de la machine « Master Cycler gradient » (Eppendorf) en appliquant le programme suivant: une étape de dénaturation est réalisée pendant 4 min à 94°C, suivie d'une série de 49 cycles constitués d'une phase de dénaturation d'une durée de 40 sec à 94°C, d'une phase d'hybridation des amorces avec la séquence cible d'une durée de 30 sec à la température spécifique d'hybridation des amorces et d'une phase d'élongation à 72°C. La durée de la phase d'élongation est variable selon la longueur du fragment a été amplifié. Elle varie de 30

secondes pour les plus petits fragments à 2 min pour les fragments d'une longueur de 2000 pb. À la fin des 49 cycles, les échantillons sont amenés à 4°C pour arrêter la réaction.

#### **8.4. Séparation de l'ADN par électrophorèse**

L'ADN est analysé après séparation par électrophorèse horizontale en utilisant un gel contenant de 0,8 à 2 % (p/v) d'agarose selon la taille attendue des fragments. La migration des échantillons d'ADN s'effectue en présence de tampon TAE 0,5X à un voltage constant (de 50 à 100 V). Un marqueur de taille migrant en parallèle (1 Kb Plus DNA Ladder ou bien 1Kb DNA Ladder (Invitrogen)) permet de déterminer la taille des acides nucléiques. La visualisation se fait grâce au bromure d'éthidium (BET) intercalant des acides nucléiques qui fluoresce sous un rayonnement ultraviolet (310 nm). Le BET est additionné directement dans la cuve d'électrophorèse (entre 5 et 10 µl de BET 1 % selon la taille de la cuve).

#### **8.5. Purification de l'ADN à partir d'un produit PCR**

L'ADN produit par PCR est purifié en suivant les recommandations du kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System commercialisé par Promega. L'ADN est alors en solution dans 50 µl d'eau pur.

#### **8.6. Purification de l'ADN à partir d'un gel d'agarose**

Après avoir découpé sous rayonnement ultraviolet les bandes d'intérêt sur le gel, le fragment d'ADN est extrait de l'agarose conformément au protocole décrit dans la notice du kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System commercialisé par Promega. À l'issue du protocole, l'ADN est alors en solution dans 50 µl d'eau pure.

#### **8.7. Souche bactérienne et culture**

La souche d'*Escherichia coli* utilisée est la souche DH5α (génotype: F'/endA1 hsdR17 (rK-mK+); glnV44; thi-1; recA1; gyrA(Nal<sup>r</sup>); relA1Δ(lacZYA-argF) U169 deoR (φ80dlacΔ(lacZ)M15)). Les cultures bactériennes sont réalisées sur milieu LB (bactotryptone 1% (p/v), extrait de levure 0,5% (p/v) et NaCl 1% (p/v)) en présence d'une concentration finale de 100 mg/l d'ampicilline pour les cultures bactériennes transformées par le vecteur pGEM-T easy® (Promega). La culture est réalisée à 37°C. Quand il s'agit de culture liquide, la culture est réalisée sous forte agitation (200

tr/min). Pour la culture en milieu solide, le milieu LB est additionné d'agar à 2% (p/v).

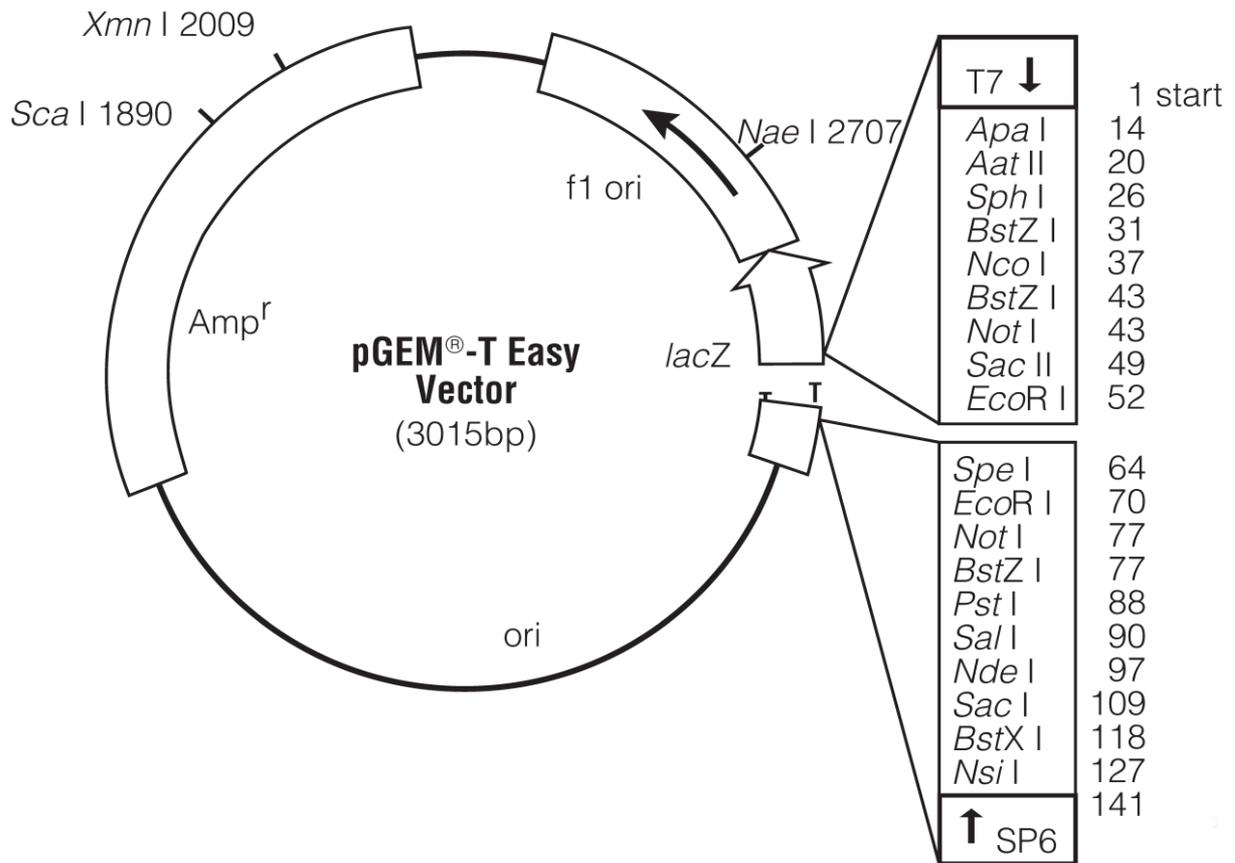
Pour conserver les bactéries à 80°C, 500 à 1000 µl d'une culture de la nuit sont mélangés avec un même volume de glycérol pur stérile, et le mélange est rapidement placé à -80°C.

### 8.8. Clonage des produits PCR

Le clonage d'un fragment d'ADN amplifié par PCR dans un vecteur se déroule en 2 étapes. Le fragment est d'abord ligaturé au vecteur puis le résultat de cette opération est introduit dans des bactéries *E. coli*. Pour la ligature, 25 ng de plasmide pGEM-T easy® (Figure 2.2) sont mélangés au fragment PCR purifié dans un ratio molaire insert/vecteur de 3/1. 3 U de T4 DNA Ligase (Promega) et du tampon Rapid ligation Buffer (Promega) sont ajoutés dans un volume final 10µl. Le mélange est placé à 4°C durant une nuit.

Le produit de ligation est transformé par choc thermique dans 100µl de bactérie *E. coli* DH5α préalablement rendues thermocompétentes (Inoue *et al.*, 1990). Pour cela, les bactéries sont mélangées à 1 à 3 µl du produit de la ligation et incubées pendant 30 minutes à 4°C. Un choc thermique à 42°C est appliqué pendant 90 secondes puis les échantillons sont remis dans la glace pendant 2 minutes. 1 ml de LB liquide sans ampicilline est ajouté et les échantillons sont mis en culture à 37°C pendant 1h sans agitation. La suspension de bactéries est étalée sur milieu solide LB Agar additionné d'ampicilline (100 mg/l), d'IPTG (1 mM), et d'X-GAL (50 mg/l) puis incubé une nuit à 37°C. L'IPTG est un inducteur d'opérons lactose. L'X-GAL est un analogue du galactose qui devient bleu lors de la réaction enzymatique catalysée par la β-galactosidase codée pour le gène *LacZ* du plasmide pGEM-T easy® (Figure 2.2). Ces composés permettent donc de distinguer les bactéries qui ont intégré un plasmide portant un insert par discrimination des colonies blanches (avec insert) des colonies bleues (sans insert).

La présence de l'insert est vérifiée aussi par PCR en utilisant les amorces universelles M13 Forward - M13 Reverse. L'ADN plasmidique obtenu après extraction est séquencé par la société GATC ([www.gatc-biotech.com](http://www.gatc-biotech.com)).



**Figure 2.2. Carte de restriction de pGEM®T easy**

Le plasmide pGEM®-T easy (3015 pb) (Promega) possède le gène de résistance à l'ampicilline, l'origine de réplication du phage f1 et un multisite de clonage localisé dans le gène *lacZ*. Il a été utilisé pour le clonage des produits d'amplification par PCR dans *E. coli*. Ce plasmide linéaire possède une base thymidine à chacune de ses extrémités 3'OH, permettant d'augmenter l'efficacité de ligation des produits PCR obtenus avec l'ADN polymérase. Celle-ci rajoute en effet une molécule de dATP aux extrémités 3'OH des fragments d'ADN qu'elle génère. Des amorces M13 Forward - M13 Reverse encadrent la cassette de clonage et permettent d'amplifier le fragment d'ADN cloné dans ce vecteur pour vérifier son insertion.

T7 RNA Polymerase transcription initiation site	1
SP6 RNA Polymerase transcription initiation site	141
T7 RNA Polymerase promoter (-17 to +3)	2999-3
SP6 RNA Polymerase promoter (-17 to +3)	139-158
multiple cloning region	10-128
<i>lacZ</i> start codon	180
<i>lac</i> operon sequences	2836-2996, 166-395
<i>lac</i> operator	200-216
b-lactamase coding region	1337-2197
phage f1 region	2380-2835
binding site of pUC/M13 Forward Sequencing Primer	2956-2972
binding site of pUC/M13 Reverse Sequencing Primer	176-192

## 8.9. Extraction d'ADN plasmidique

Les extractions d'ADN plasmidique sont réalisées à partir de 10 ml de culture réalisée pendant une nuit à 37°C dans un milieu LB additionné d'ampicilline (100 mg/l). On utilise le kit SV minipreps DNA purification System (Promega), à partir de 10 ml de culture bactérienne. Le volume final d'ADN est de 100 µl avec un rendement moyen, estimé par spectrophotométrie, de 200 ng/µl.

## 8.10. La PCR quantitative

### 8.10.1. Principe de la PCR quantitative

Une amplification PCR est composée d'une phase exponentielle, d'une phase linéaire puis d'un plateau (Figure 2.3). La phase d'amplification exponentielle est celle pendant laquelle les réactifs ne sont pas limitants. Théoriquement, l'augmentation de la quantité de matrices à chaque cycle conduit à la formule mathématique suivante:

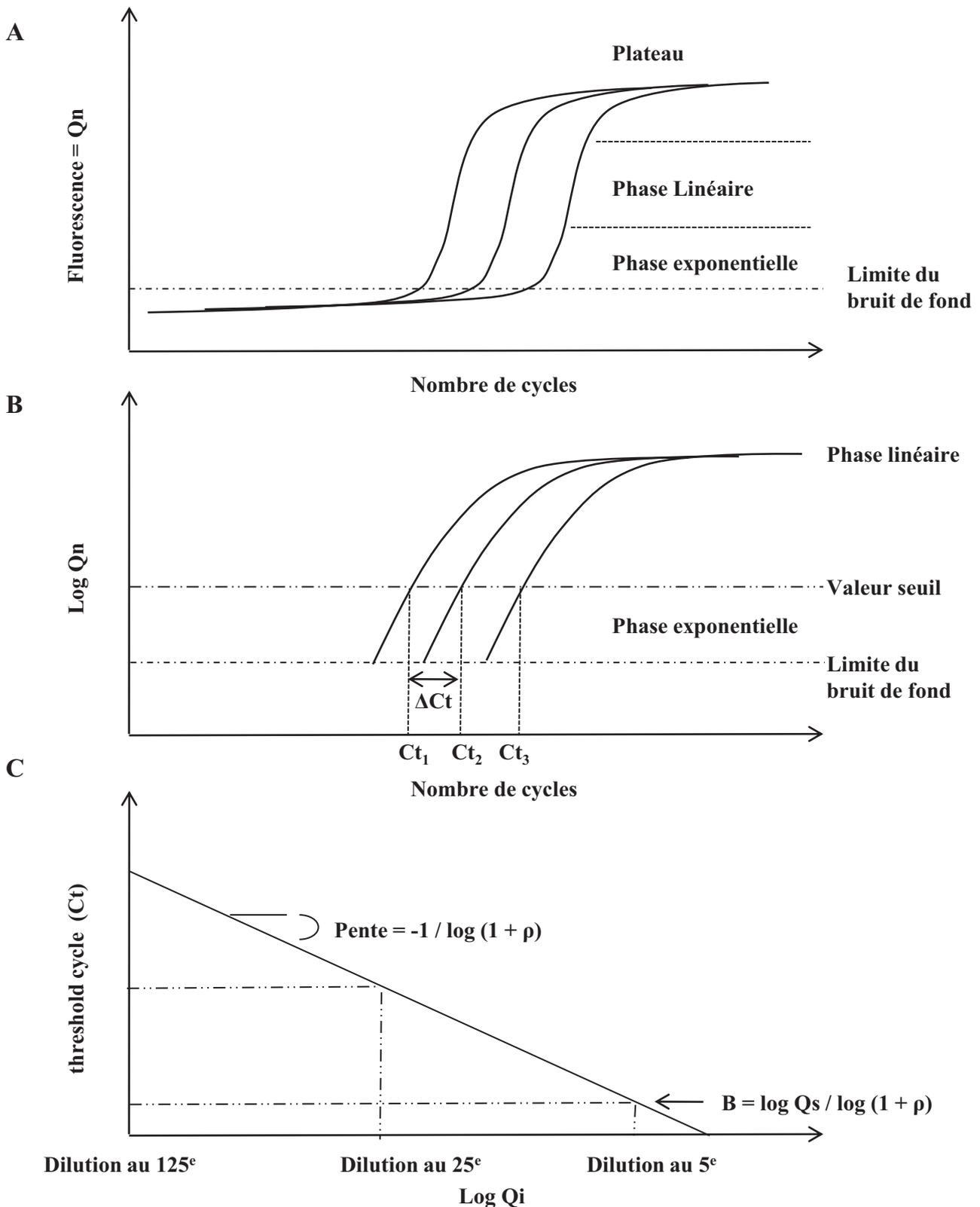
$$Q_n = Q_i (1 + \rho)^n$$

où  $Q_i$  est la quantité initiale de matrice,  $Q_n$  est la quantité de matrice obtenue au cycle  $n$  et  $\rho$  le rendement de la réaction PCR (ou efficacité).

Si le rendement est de 100%,  $\rho = 1$  alors  $Q_n = Q_i(2)^n$ . Il y a doublement de la quantité de l'ADN cible à chaque cycle.

Théoriquement, il existe donc une relation quantitative, à un instant donné, entre la quantité de la séquence cible de départ et la quantité de produit amplifié.

Dès la phase linéaire, le rendement d'amplification diminue fortement et devient variable d'un échantillon à un autre. En effet, à l'étape de renaturation il y a compétition entre la renaturation des amplicons et l'hybridation des amorces (Poitras et Houde, 2002). Pendant la phase de plateau, les réactifs deviennent limitants, le taux d'amplification décroît et ainsi très peu de nouveaux amplicons sont générés. La phase exponentielle est la phase où il y a proportionnalité entre la quantité de matrice au cycle  $n$  ( $Q_n$ ) et la quantité au cycle 0 ( $Q_i$ ). Si on peut mesurer la quantité d'ADN produite au moment de la phase exponentielle et si on connaît le rendement de la PCR pour un couple d'amorce donné et des conditions de PCR données, on pourra calculer la quantité initiale de matrice.



**Figure 2.3. Les différentes étapes aboutissant à l'analyse des données de la PCR en temps réel.**

Les courbes représentent des échantillons avec 3 dilutions différentes (au 5<sup>ème</sup>, au 25<sup>ème</sup> et au 125<sup>ème</sup> par exemple).

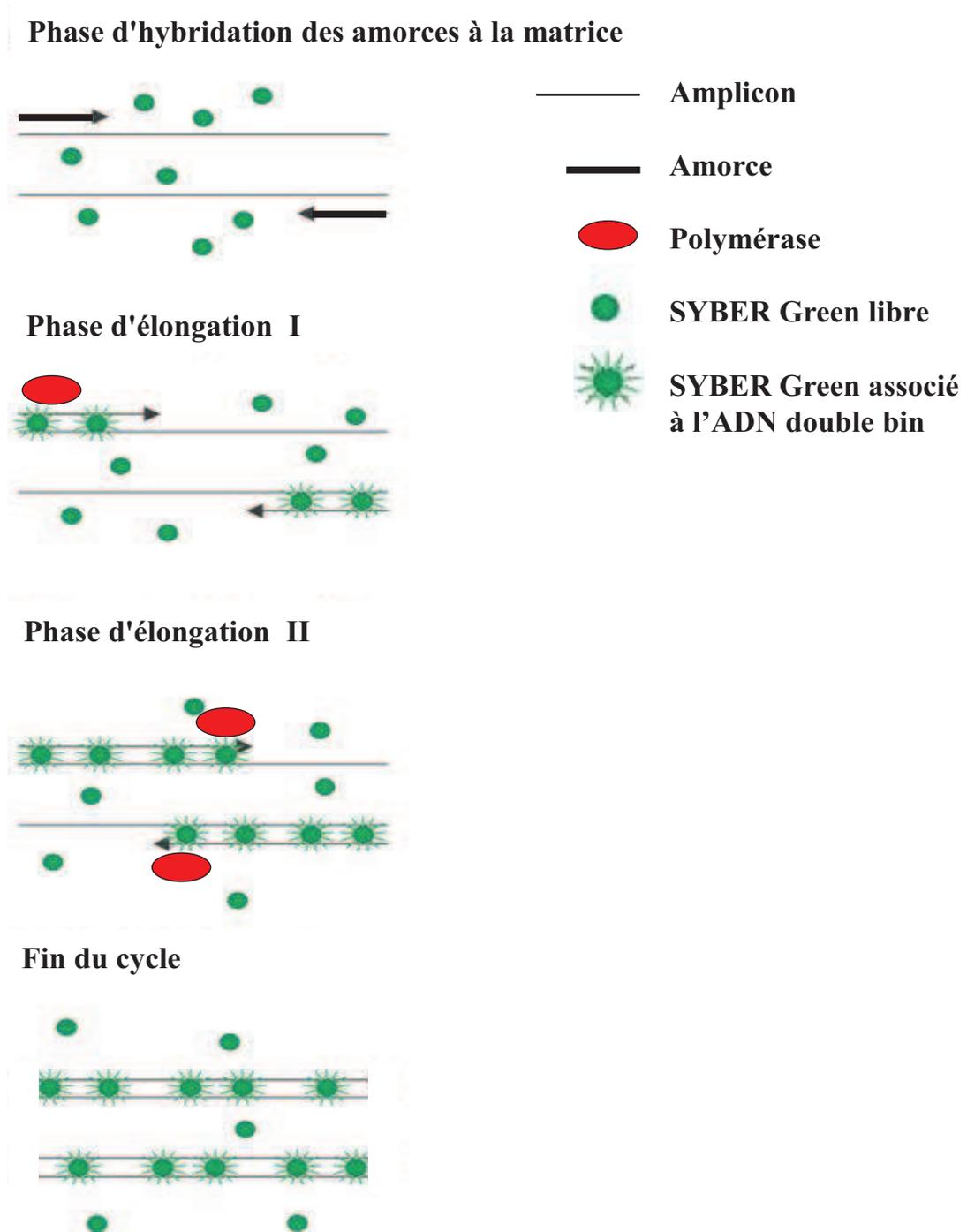
A: graphique de sortie de la PCR en temps réel on reconnaît les trois phases classiques de la PCR (phase exponentielle, phase linéaire, plateau). La limite de détection et valeur seuil sont matérialisées. B: le graphique de sortie est présenté avec les valeurs logarithmiques C: obtention de la droite d'étalonnage grâce aux valeurs de  $Ct$  obtenues pour différentes dilutions, ce qui permet de calculer le rendement de la PCR.

Pour détecter les amplicons générés lors de la PCR quantitative, on utilise une «sonde» fluorescente dont l'émission est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés pendant la réaction de PCR. Nous avons choisi d'utiliser le SYBR Green. Le SYBR Green est un agent intercalant fluorescent qui ne se lie qu'à l'ADN double brin et qui n'inhibe pas la réaction d'amplification. L'émission fluorescente du SYBR Green augmente lorsqu'il est intercalé à l'ADN double brin. Lorsque la PCR est suivie en temps réel, l'augmentation du signal de fluorescence est observée en fin de chaque étape de polymérisation (Figure 2.4). Lorsque le signal devient significativement supérieur au bruit de fond on se trouve toujours en phase d'amplification exponentielle. On fixe alors une valeur de fluorescence seuil à partir de laquelle on va déterminer le nombre de cycles qui permet, pour un échantillon donné, d'atteindre cette valeur seuil. Plus il y a de matrices à amplifier au départ, moins élevé sera le nombre de cycles requis pour atteindre cette valeur seuil.

Pour déterminer la valeur seuil le logiciel présente les données sous forme logarithmique de sorte à linéariser la phase exponentielle (Figure 2.3.B). Et à un niveau où toutes les droites sont linéaires, le logiciel définit alors un seuil arbitraire supérieur au bruit de fond. L'interception de ce seuil et de la courbe d'amplification définit le «threshold cycle» ou Ct (Figure 2.3.B). Le Ct représente donc le nombre de cycles  $n$  nécessaires pour atteindre une quantité de matrice ( $Q_i$ ) définie arbitrairement par le logiciel. Moins il y a de matrices au départ, plus le Ct sera élevé.

Pour le calcul de la quantité initiale de matrice ( $Q_i$ ), il est essentiel de connaître le rendement (ou efficacité) de la PCR. L'efficacité de la PCR dépend des amorces et de la qualité des matrices. Pour estimer l'efficacité de l'amplification, les échantillons sont dilués systématiquement (au 5<sup>ème</sup>, au 25<sup>ème</sup>, au 125<sup>ème</sup> et au 625<sup>ème</sup> dans notre cas). Et on détermine les Ct correspondant à chacune de ces dilutions. On reporte alors les mesures sur un graphique sur lequel les dilutions sont représentées selon une échelle logarithmique en base 10 (Figure 2.3.C). On trace alors la droite de régression et on obtient l'efficacité par la formule suivante :

$\rho = 10^{-1/\text{pente}} - 1$ . Si l'efficacité est parfaite ( $\rho=1$ ), la pente vaut -3,32 ce qui signifie que chaque fois que le cycle seuil Ct baisse de 3,32, l'échantillon analysé contenait 10 fois plus de matrice.



**Figure 2.4. Incorporation du SYBR Green lors de la réaction de PCR en temps réel**

Le SYBR Green s'intercale dans les molécules d'ADN double brin et devient fluorescent. C'est après la phase d'élongation, quand tout l'ADN est sous forme double brin, que le taux de fluorescence est mesuré.

La démonstration mathématique est la suivante :

On applique la formule donnée ci-dessus qui lie la quantité amplifiée au bout de  $n$  cycles  $Q_n$  à la quantité initiale de matrice  $Q_i$  et à l'efficacité  $\rho$  à la détermination du nombre de cycles d'amplification  $C_t$  nécessaires pour que la quantité d'ADN amplifié atteigne la valeur seuil  $Q_s$

$$Q_s = Q_i (1 + \rho)^{C_t}$$

on obtient en prenant le logarithme :

$$\log Q_s - \log Q_i = C_t \log(1 + \rho)$$

$$\text{soit } C_t = -1/\log(1 + \rho) \log Q_i + 1/\log(1 + \rho) \log Q_s$$

Cette formule lie le nombre de cycles d'amplification  $C_t$  à la quantité initiale  $\log Q_i$  de matrice selon une équation linéaire qui se présente sous la forme  $Y = a X + b$ . Dans cette équation, l'ordonnée à l'origine ( $b$ ) représente  $1/\log(1 + \rho) \log Q_s$  et la pente ( $a$ ) correspond à  $-1/\log(1 + \rho)$ . L'efficacité de la PCR  $\rho$  se calcule donc à partir de la pente de cette droite selon la formule précédemment indiquée  $\rho = 10^{-1/a} - 1$ .

Plusieurs contrôles de qualité sont à effectuer pour valider une PCR en temps réel :

- Approximation visuelle de l'homogénéité de l'efficacité d'amplification entre les échantillons correspondant à l'amplification par un même couple d'amorce. Si toutes les droites sont parallèles (comme dans la figure 2.3.A), cela signifie que l'amplification lors de la phase exponentielle s'est produite de la même manière suivant les échantillons.
- Vérification de l'efficacité de la PCR pour chaque couple d'amorces grâce au tracé de la courbe donnant le  $C_t$  (threshold cycle) en fonction de  $\log Q_i$  (quantité de matrice) (figure 2.3.C).
- Vérification de l'amplification d'un seul produit PCR grâce à la courbe de fusion (melting curve). La vérification de ce dernier point se déroule de la façon suivante. À la fin de la PCR, la courbe de fluorescence est suivie lors d'une augmentation progressive de la température jusqu'à atteindre la température où tous les ADN double brin se séparent. À un amplicon donné, correspond une température de « décrochage » donnée. Il est ainsi possible de distinguer l'existence d'un seul ou bien de plusieurs amplicons. Seules les amplifications ayant donné une seule courbe, donc un seul produit PCR, sont conservées. La spécificité de la réaction reposant entièrement sur les

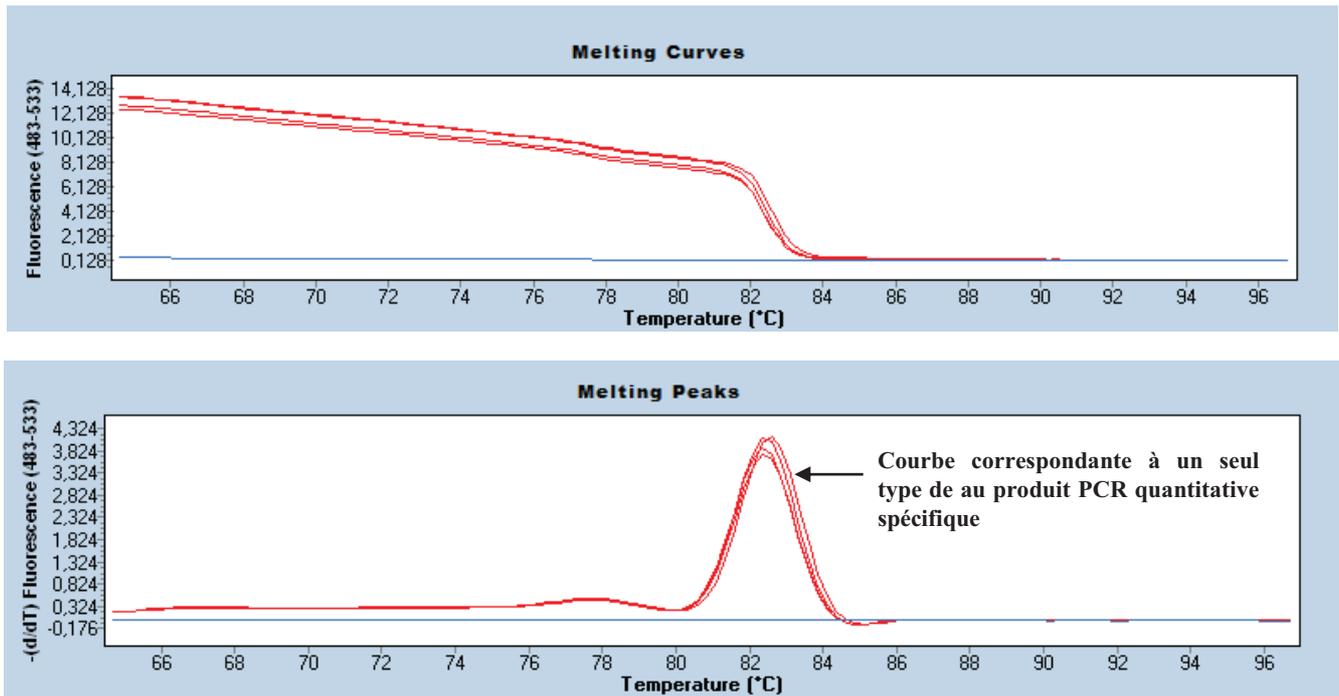
propriétés physico-chimiques des amorces, le choix de ces dernières est primordial (Figure 2.5).

Dans notre cas l'objectif de la PCR quantitative était de déterminer les niveaux d'expression de nos gènes candidats. Donc il s'agit bien d'une RT-PCR. L'acronyme RT-PCR signifie *Reverse Transcriptase* PCR, soit une PCR après transcription inverse d'un acide ribonucléique (ARN) en ADN complémentaire (ADNc). En réalité, il s'agit d'une PCR en temps réel réalisée sur un ADN complémentaire (ou ADNc), qui est une copie d'un ARN obtenue par une transcription inverse.

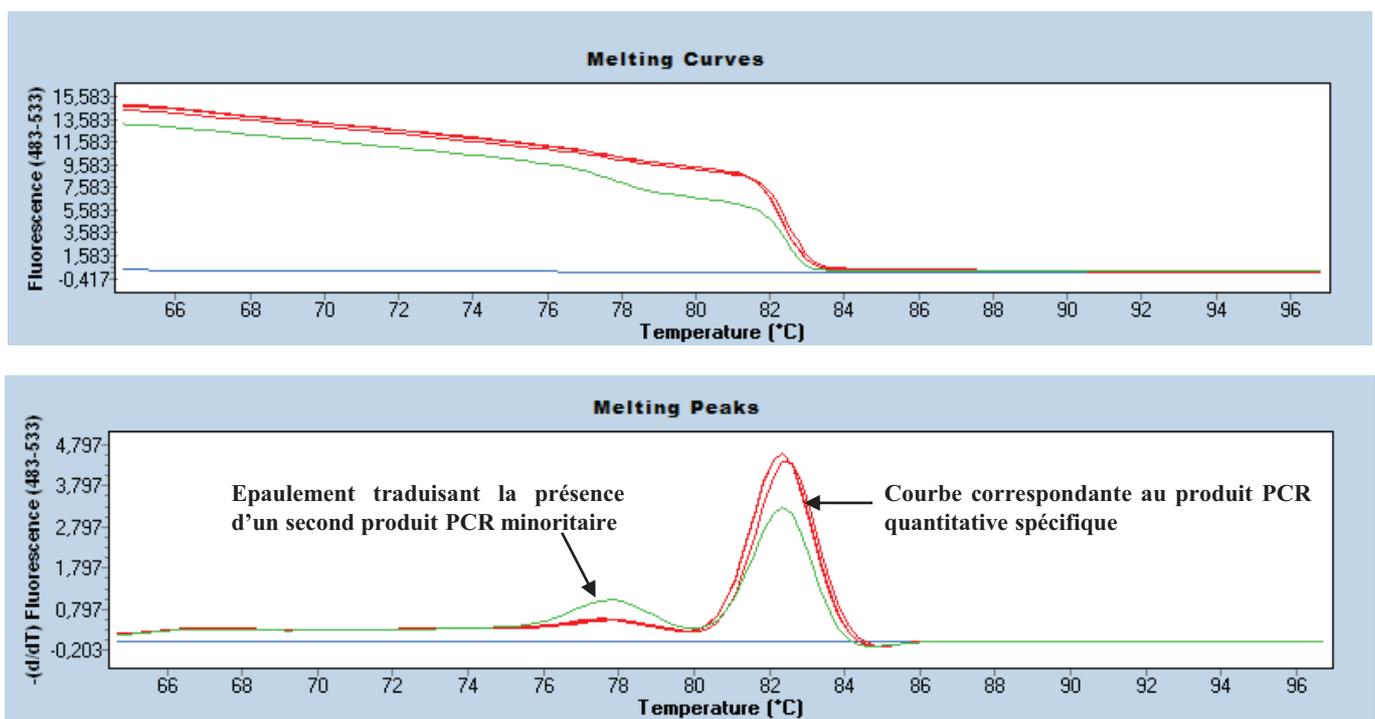
### **8.10.2. Extraction des ARNs totaux**

Les tissus sont broyés dans de l'azote liquide jusqu'à obtention d'une fine poudre. Environ 100 mg de cette poudre sont utilisés pour extraire les ARNs totaux suivant les recommandations du kit RNeasy Plant Mini Kit commercialisé par Qiagen. Le principe de ce Kit est basé sur la fixation sélective de l'ARN sur une résine (gel de silice) contenue dans une colonne centrifugeable. En résumé, 100 mg de tissu végétal (bien broyé dans de l'azote liquide) sont lysés dans le tampon dénaturant à base d'isothiocyanate de guanidine (tampon RLT, utilisé à raison de 450µl par 100mg d'échantillon) additionné de β-Mercaptoethanol (1µl pour 100µl de tampon de lyse), et l'ensemble est homogénéisé par pipetages successifs. Après une incubation de 3 min à 56°C, le mélange est déposé sur une première colonne et centrifugé pendant 2 min à la vitesse maximale. Un demi-volume d'éthanol est additionné à l'éluat. La suspension est déposée sur une deuxième colonne et centrifugée pendant 15s à 8000 xg. La colonne est lavée par 700µl de tampon RW1 en faisant une centrifugation à 8000 xg pendant 15s. Les ARN fixés à la colonne sont ensuite traités deux fois par un tampon de lavage RPE (500 µl) contenant de l'éthanol en faisant à chaque fois une centrifugation à 8000 xg (15s puis 2min). L'éluat des ARN est enfin réalisé en déposant sur la colonne 30 µl d'eau RNase-free (RNase-free water), l'éluat est récupéré en centrifugeant la colonne à 8000 xg pendant 1 min.

A



B



**Figure 2.5. Vérification de la pureté de l'amplicon produit grâce à la courbe de fusion (melting curve).** La courbe de fusion correspond à l'intégration de la courbe de fluorescence obtenue lors d'une augmentation progressive de la température jusqu'à atteindre la température où tous les ADN double brin se séparent. Un amplicon donné, présente une température de fusion spécifique. Deux amplicons différents présentent des températures de fusion différentes. Lorsque la température de l'échantillon atteint puis dépasse cette température de fusion spécifique, il ya une baisse brutale de la fluorescence due à la libération du SYBR green associé à l'amplicon sur la forme double brin. En fonction du nombre de décrochages que l'on repère et des températures aux quels ces décrochages ont lieu, il est possible de distinguer l'existence d'un seul (Courbe A) ou de plusieurs types d'amplicons (Courbe B). Seules les amplifications ayant donné une seule courbe, donc un seul produit PCR, sont analysées.  $-(d/dT)$  Fluorescence: Dérivée du signal de fluorescence.

### 8.10.3. Traitement à la DNase

Pour éliminer toute trace d'ADN génomique résiduel, un traitement à la DNase est effectué. Les ARNs totaux extraits sont traités à la RQ1 DNase RNase free (Promega) à raison de 1U/μg d'ARNs en présence du tampon approprié. La réaction est ensuite incubée à 37°C pendant 1h. Pour inactiver la DNase, 1μl de RQ1 DNase Stop Solution est ajouté à la réaction. La réaction est enfin incubée pendant 10 min à 65°C. Afin de vérifier la présence ou non d'ADNg résiduel et de confirmer la réussite du traitement DNase, une PCR classique est effectuée sur les ARNs en utilisant les amorces LsGS Forward et LsGS Reverse (voir annexes tableau II) permettant l'amplification du gène codant la glutathion synthase de la laitue. Dans le cas de la réussite du traitement à la DNase, aucune amplification ne doit être obtenue. Un témoin positif d'ADNg est utilisé pour s'assurer de la réussite de la PCR.

Après un traitement à la DNase, l'intégrité des ARNs est vérifiée par électrophorèse et la concentration en ARN de la préparation est déterminée par dosage spectrophotométrique. Grâce à ce dosage, la qualité des ARNs est vérifiée aussi en calculant le rapport  $D_{260}/D_{280}$ . Ce rapport doit être compris entre 1,8 et 2.

### 8.10.4. Séparation des ARNs par électrophorèse

Afin de vérifier la qualité des ARNs, ces derniers sont séparés par électrophorèse horizontale en gel contenant 1% (p/v) d'agarose. Pour ne pas induire leur dégradation, la migration des ARNs doit être faite avec un voltage de 130 V (pour permettre une migration rapide) et sur un gel frais et une cuve très bien nettoyée.

Comme pour l'ADN, la migration des échantillons s'effectue en présence de tampon TAE 0,5X. Un marqueur de taille migrant en parallèle permet de déterminer la taille des acides nucléiques. La visualisation se fait grâce au BET, intercalant les ARNs, qui fluoresce sous un rayonnement ultraviolet (310 nm).

### 8.10.5. Transcription inverse

La transcription inverse est réalisée à partir de 3 μg d'ARN traités à la DNase. Pour chaque échantillon, les ARN, 2,5 μg d'oligo(dT)<sub>15</sub> (Promega), les dNTP (200μM chacun), 400 U de l'enzyme MMLV-RT (Promega), du tampon approprié, et de l'eau sont mélangés dans un volume finale de 50 μl. L'ensemble est incubé à 42°C pendant 1h. La réaction est stoppée par stockage des échantillons à -20°C. Une PCR classique est effectuée avec des amorces bordant un intron du gène codant l'actine (amorces

LsActin Forward et LsActin Reverse, voir annexes tableau II) afin de vérifier la réussite de la transcription inverse. Un témoin positif d'ADNg est utilisé pour s'assurer de la réussite de la PCR.

#### **8.10.6. Définition des amorces pour la PCR quantitative**

Le choix des amorces est déterminant lors d'une expérience PCR quantitative. Nous avons été très exigeants sur notre choix d'amorces. Les amorces ont été définies avec le logiciel Primer Express<sup>®</sup> Software v1.0, après proposition de nos exigences sur la température de fusion (T<sub>m</sub>) (température comprise entre 58 et 62°C) et sur la taille de l'amplicon (taille comprise entre 100 et 200 pb). Une étude systématique sur les centaines de couples d'amorce proposés par le logiciel a été faite afin de choisir ceux qui présentent, a priori, le moins de risque de formation de dimères et surtout ceux qui peuvent amplifier spécifiquement nos gènes appartenant à des familles multigéniques (voir chapitre VI). Pour les couples choisis, la possibilité de formation de dimères a été enfin vérifiée pour une dernière fois avec le logiciel AmplifX v1.4.4. Pour éviter le risque d'amplifier de l'ADNg résiduel dans les échantillons d'ADNc utilisés pour la PCR quantitative, tous les couples amorces ont été définis de telle manière à ce qu'ils bordent un intron. Pour tous les couples d'amorce, une PCR classique a été faite sur les plasmides contenant nos gènes d'intérêt afin de vérifier la qualité de l'amplification ainsi que la spécificité des amorces définies pour les gènes appartenant aux familles multigéniques (voir chapitre VI), et ce, en faisant toutes les combinaisons possibles entre amorces et plasmides. Les amorces utilisées sont décrites dans les annexes (Tableau II).

#### **8.10.7. Protocole de la PCR quantitative**

Le mix *LightCycler*<sup>®</sup> 480 SYBR Green (Roche Diagnostics, USA) contient les dNTPs, la Taq polymérase et le SYBR Green. Le mélange réactionnel se fait dans un volume final de 10 µl. Il est composé de 5µl de mix, 1µl du couple d'amorces à 10 µM, 4 µl d'ADNc. Les mélanges sont placés sur des plaques PCR à 384 puits (Roche). L'appareil utilisé est le LightCycler 480 (Roche) et le logiciel utilisé est le *LightCycler*<sup>®</sup> 480 Software release 1.5.0 (Roche).

Les cycles sont ceux d'une PCR classique, mais avec des temps beaucoup plus courts. Le programme se compose comme suit :

1. Une première phase de dénaturation se déroule pendant: 5min à 95°C pour dénaturer l'ADN et activer l'enzyme
2. L'amplification se découpe en 45 cycles de trois phases chacun.
  - Une phase de dénaturation à 95 °C qui dure 10s
  - Une phase d'hybridation des amorces réalisée à 64 °C et qui dure 10s
  - Une phase d'élongation à 72 °C d'une durée de 10s
3. Mesure de la spécificité de l'amplification « melting curve »  
Montée progressive de la température de 65 à 97 °C à raison de 0,11°C par seconde.

### 8.10.8. Normalisation des données

Pour éviter que les variations mesurées de l'abondance des ARNm d'intérêts entre les variétés de laitue en réponse au traitement cadmium soient dues à des variations de la quantité d'ARN total d'un échantillon à l'autre. L'amplification est aussi réalisée pour des gènes dont l'expression est considérée comme indépendante de la variété considérée et du traitement par le cadmium. L'analyse de ces gènes (que l'on qualifie de « gènes contrôle ») permet de normaliser les données et de comparer les échantillons entre eux. Nous avons choisi 2 gènes, qui sont considérés comme stables chez la laitue, la Triose Phosphate Isomérase (TPI) et l'Actine 2 (Actin 2) (He et *al.*, 2005b ; Bennett et *al.*, 2002). Des fragments de ces gènes ont été amplifiés puis séquencés chez 5 variétés de laitue. Les séquences obtenues ont servi à la définition des amorces pour la PCR quantitative (voir chapitre VI).

Pour chaque échantillon l'expression relative du gène d'intérêt par rapport au gène gènes contrôle (R) a été calculée en utilisant les valeurs d'efficacité ( $\rho$ ) ainsi que les valeurs de Ct (threshold cycle) correspondants à la dilution au 25ème, et ce, en utilisant cette formule :

$$R (\%) = (\rho_{(\text{gène d'intérêt})}^{-Ct(\text{gène d'intérêt})} / \rho_{(\text{gène contrôle})}^{-Ct(\text{gène contrôle})}) * 100$$

## 9. Outils d'analyse bioinformatique

### 9.1. Alignements de séquences

Les séquences obtenues dans ce travail ont été comparées aux séquences des banques de données en utilisant le logiciel BLAST (Basic Alignment Search Tool) (Altschul *et al.*, 1990) du serveur NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Les alignements

multiples ont été réalisés grâce aux programmes MULTALIN (Corpet, 1988) et CLUSTALW (Thompson et *al.*, 1994) accessibles sur le serveur du pôle bioinformatique lyonnais (<http://pbil.univ-lyon1.fr/>).

## 9.2. Construction des arbres de relation

Les arbres de relation « arbres phylogénétiques » ont été construits en utilisant le package de programmes de phylogénie PHYLIP « Phylogeny Inference Package » (PHYLIP, Department of Genetics, University of Washington, Seattle). Les associations entre les séquences ont été estimées avec les programmes PROTDIST, PROTPARS et PROML de PHYLIP en utilisant différentes méthodes d'estimation (la méthode des distances, la méthode de parcimonie et la méthode de maximum de vraisemblance). La signification statistique a été testée avec l'analyse de bootstraps réalisée par les programmes SEQBOOT et CONSENSUS de PHYLIP (Felsenstein 1985). L'arbre a été dessiné par Drawtree.

Les valeurs de bootstrap permettent de donner un niveau de confiance aux relations proposées par l'arbre. Il y a ré-assemblage de manière aléatoire des séquences et à nouveau analyse des distances des nouvelles séquences générées. Ce procédé est recommencé 100 fois. Un arbre consensus est alors généré. Les valeurs de bootstrap présentées à chaque embranchement représentent le nombre de fois où cet embranchement a été généré lors des combinaisons aléatoires.

## 10. Outils de calcul et de présentation graphique

Les calculs ainsi que les représentations graphiques ont été conduits à l'aide du logiciel Microsoft Office Excel de Microsoft versions 2003 et 2007.

## 11. Outils d'analyse statistique

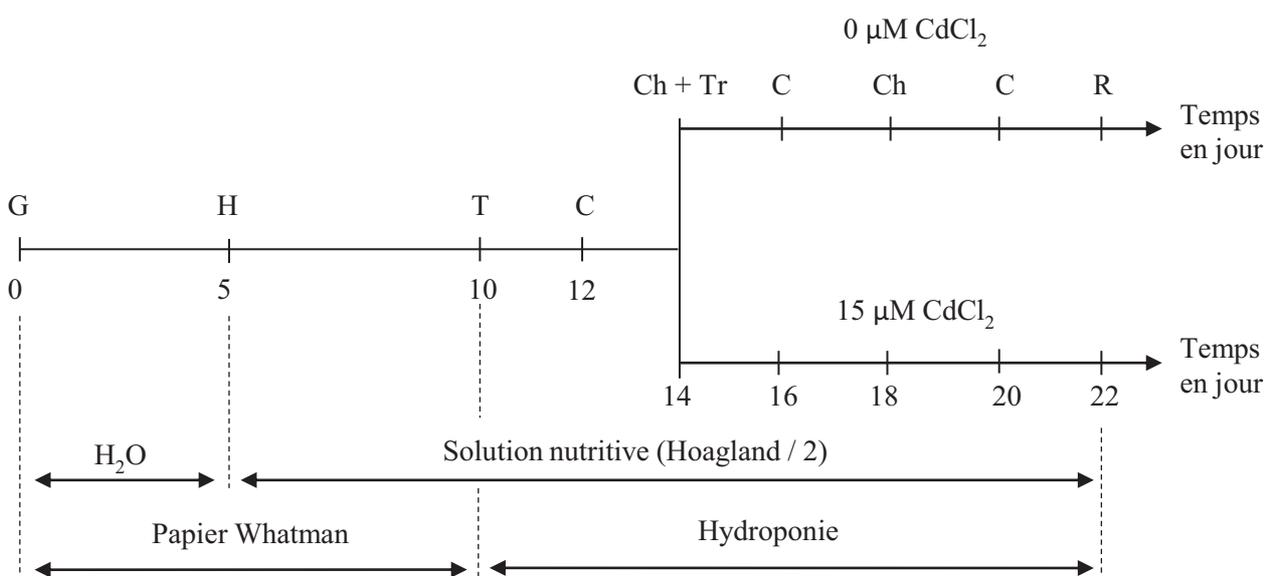
Toutes les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel R (R Development Core Team, 2008). Tout au long de ce travail, trois types d'analyse statistique ont été effectués : des comparaisons multiples de moyennes (Test de Tukey), des tests de corrélations (Test de Spearman) et des analyses de la variance à un facteur (ANOVA).

## Chapitre III

Analyse de la diversité phénotypique de tolérance  
au cadmium et d'accumulation de cadmium au sein  
de l'espèce laitue

**Tableau 3.1.** Les 18 géotypes utilisés pour analyser de la diversité génétique de l'espèce laitue vis-à-vis de cadmium.

Géotype	Espèce	Cultigroupe
Red Salad Bowl	<i>L. sativa</i>	à couper
Ruby	<i>L. sativa</i>	à couper
Delsay	<i>L. sativa</i>	batavia
Pierre Bénite	<i>L. sativa</i>	batavia
GL 659	<i>L. sativa</i>	batavia type iceberg
Roxette	<i>L. sativa</i>	batavia type iceberg
Saladin	<i>L. sativa</i>	batavia type iceberg
Gobham green	<i>L. sativa</i>	beurre
Divina	<i>L. sativa</i>	beurre
Fenja	<i>L. sativa</i>	beurre
Kordaat	<i>L. sativa</i>	beurre
Mélina	<i>L. sativa</i>	beurre
Oresto	<i>L. sativa</i>	beurre
Pia	<i>L. sativa</i>	beurre
Paris Island Cos	<i>L. sativa</i>	romaine
Remus	<i>L. sativa</i>	romaine
Ls CR01	<i>L. serriola</i>	
Ls 239	<i>L. serriola</i>	

**Figure 3.1.** Représentation schématique du protocole expérimental utilisé pour l'analyse de la diversité phénotypique de l'espèce laitue vis-à-vis du cadmium.

**G:** germination; **H:** ajout de la solution nutritive Hoagland; **T:** transfert sur milieu hydroponique; **C:** changement de l'orientation et de la disposition des bassines, **Tr:** application du traitement cadmium; **Ch:** changement du milieu de culture; **R:** récolte.

## Chapitre III: Analyse de la diversité phénotypique de tolérance au cadmium et d'accumulation de cadmium au sein de l'espèce laitue

### 1. Introduction

La laitue est une espèce connue pour présenter une grande diversité phénotypique pour le caractère accumulation de cadmium (Costa et Morel, 1994a). Afin d'essayer d'identifier les bases génétiques et moléculaires qui sous-tendent cette diversité (ce qui sera exposé dans les chapitres V et VI), nous avons commencé par réaliser un criblage phénotypique de 18 génotypes de laitue pour les caractères de tolérance au cadmium et d'accumulation de cadmium. Les génotypes analysés ont été choisis parmi différents cultigrupes de laitue afin de mieux représenter la diversité génétique de l'espèce. Ils ont également été choisis sur la base d'études physiologiques décrivant le comportement de la laitue vis-à-vis du cadmium et documentées dans la littérature (Costa et Morel, 1994a ; Costa et Morel, 1994b ; Thys et *al.*, 1991 ; Ramos et *al.*, 2002 ; Maier et *al.*, 2003). Parmi les 18 génotypes que nous avons sélectionnés et dont la liste est donnée dans le tableau (Tableau 3.1), nous avons inclus 2 génotypes de l'espèce *L. serriola* espèce sauvage apparentée à *L. sativa* et interfertile avec elle.

### 2. Protocole expérimental

Avant de commencer le criblage phénotypique des 18 génotypes, plusieurs expériences préliminaires ont été menées. Ces expériences avaient pour but:

- (1) de définir les conditions idéales pour la culture hydroponique de la laitue, y compris le choix du traitement de cadmium,
- (2) de mettre au point les procédures d'extraction et de dosage de cadmium par spectrophotométrie d'absorption atomique.

Le protocole de culture établi à l'issue de ces expériences préliminaires est décrit dans la figure 3.1 (voir chapitre II: matériels et méthodes). Pour le criblage phénotypique, des plantes âgées de 14 jours ont été exposées pendant 8 jours à la seule concentration de 15 $\mu$ M de CdCl<sub>2</sub>. Des plantes cultivées en absence de cadmium ont été utilisées comme témoins.

L'effet du cadmium sur la croissance des feuilles et des racines a été déterminé par mesure du poids de matière sèche.

L'accumulation de cadmium a été évaluée d'une part à travers les mesures de teneurs en cadmium des racines et des parties aériennes, et d'autre part à travers la détermination de la proportion de cadmium accumulé dans les parties aériennes par rapport à la quantité totale de cadmium absorbé par la plante. La détermination de cette dernière variable avait pour objectif de rendre compte de la capacité de translocation du cadmium des racines vers les parties aériennes.

### 3. Résultats

#### 3.1. Effet du cadmium sur la production de la biomasse

À l'issue des 8 jours d'exposition au cadmium, les plantes des 18 génotypes manifestent dans leur quasi-totalité une réduction de la biomasse sèche des parties aériennes et des racines par comparaison aux plantes non traitées.

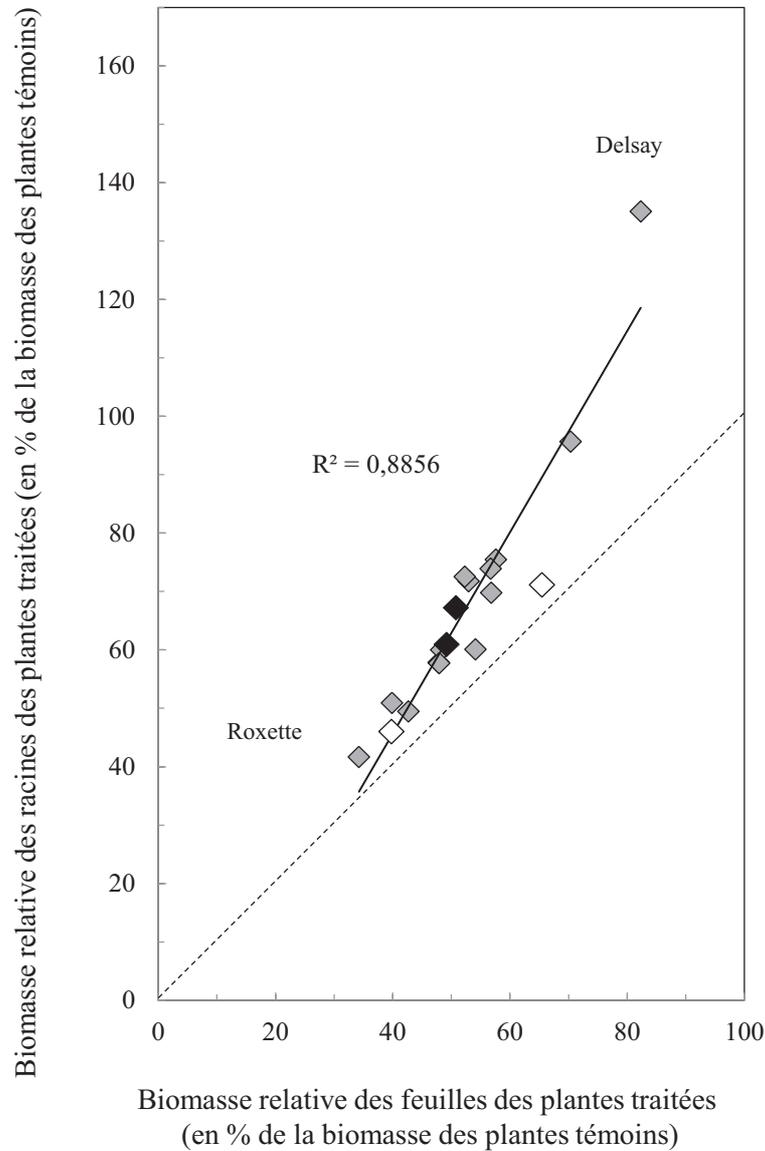
Cet effet dépressif du cadmium est légèrement plus marqué sur les parties aériennes que sur les racines. La biomasse relative des plantes traitées, exprimée en pourcentage de la biomasse des plantes témoins, varie de 41% à 135% pour les racines et de 34% à 82% pour les parties aériennes. La variété Delsay se distingue même par le fait que la biomasse de ses racines est augmentée lors du traitement par le cadmium (Tableau 3.2). Une relation étroite peut cependant être observée entre l'effet du cadmium sur la biomasse relative racinaire et sur la biomasse relative foliaire ( $R^2 = 0,88$ ) (Figure 3.2). Si on fait abstraction des deux génotypes de laitue sauvage (*L. serriola*), cette corrélation est encore plus élevée:  $R^2 = 0,94$ . L'analyse des effets du cadmium sur la production de la biomasse nous a permis de trouver une grande variabilité de réponse des différents génotypes de laitue (Figure 3.2). Les deux variétés de laitue présentant des comportements extrêmes du point de vue de la tolérance au cadmium sont les variétés Delsay (tolérante) et Roxette (sensible). Les deux génotypes de laitue sauvage (*L. serriola*) ont présenté une production de la biomasse très ralentie par comparaison aux variétés de laitue cultivée (Tableau 3.2), mais ils ne se sont pas particulièrement distingués des variétés de laitue cultivées selon le critère de tolérance au cadmium (Figure 3.2).

**Tableau 3.2.** Masses sèches (exprimées en mg) des parties aériennes (A) et des racines (B) des plantes des 18 génotypes de laitue cultivées en absence ou en présence de 15  $\mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$ . Les prélèvements ont été effectués, plante par plante, après 8 jours de traitement. Les calculs des moyennes sont réalisés à partir de 7 répétitions. Les valeurs ES correspondent aux valeurs des erreurs standards. La dernière colonne (%) représente la biomasse relative des plantes cultivées en présence de cadmium exprimée en % de la biomasse des plantes cultivées sans cadmium. Les valeurs suivies par la même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 0,05.

A					
Génotype	MS (mg) 0 $\mu\text{M}$ de $\text{CdCl}_2$		MS (mg) 15 $\mu\text{M}$ de $\text{CdCl}_2$		%
Delsay	66,0 ± 2,8	cde	54,3 ± 2,8	ef	<b>82,3</b>
Divina	71,2 ± 5,5	cd	41,0 ± 4,2	fgh	57,6
Fenja	90,1 ± 4,6	b	43,1 ± 4,0	fgh	47,8
GL 659	82,3 ± 7,6	bc	35,1 ± 4,9	ghi	42,7
Gobham green	89,8 ± 11,7	b	35,7 ± 4,0	ghi	39,8
Kordaat	83,2 ± 4,4	bc	40,8 ± 4,3	fgh	49,0
LS 239	26,3 ± 4,4	ij	17,2 ± 3,4	jk	65,5
LS CR01	25,6 ± 4,2	ij	10,2 ± 0,4	k	39,9
Mélina	79,4 ± 6,0	bc	38,3 ± 3,4	ghi	48,3
Oresto	44,3 ± 4,2	fg	31,2 ± 2,0	ghij	70,3
Paris Island Cos	105,5 ± 5,7	a	53,7 ± 8,9	ef	50,9
Pia	60,1 ± 3,4	de	31,8 ± 3,0	ghij	52,9
Pierre Bénite	77,6 ± 9,4	bc	44,0 ± 6,5	fg	56,7
Red Salad Bowl	72,3 ± 4,9	cd	34,7 ± 4,4	ghi	47,9
Remus	70,5 ± 3,6	cd	36,9 ± 7,6	ghi	52,3
Roxette	69,8 ± 4,9	cd	23,9 ± 6,3	ijk	<b>34,2</b>
Ruby	52,9 ± 3,8	ef	30,0 ± 3,9	hij	56,8
Saladin	77,7 ± 6,9	bc	42,0 ± 4,0	fgh	54,1

B					
Génotype	MS (mg) 0 $\mu\text{M}$ de $\text{CdCl}_2$		MS (mg) 15 $\mu\text{M}$ de $\text{CdCl}_2$		%
Delsay	13,5 ± 1,0	c'd'e'f'	18,2 ± 1,2	a'b'c'	<b>135,1</b>
Divina	15,2 ± 1,6	b'c'd'	11,5 ± 1,1	d'e'f'g'h'i'j'k'	75,5
Fenja	20,5 ± 1,2	a'	11,8 ± 1,4	d'e'f'g'h'i'j'	57,8
GL 659	16,9 ± 2,0	a'b'c'	8,4 ± 1,2	j'k'l'm'n'	49,5
Gobham green	19,5 ± 2,5	a'b'	9,0 ± 0,8	h'i'j'k'l'm'n'	46,1
Kordaat	18,7 ± 0,5	a'b'c'	11,4 ± 1,3	e'f'g'h'i'j'k'	60,7
LS 239	7,8 ± 1,6	k'l'm'n'	5,6 ± 0,9	n'o'	71,1
LS CR01	5,6 ± 1,1	n'o'	2,9 ± 0,2	o'	50,9
Mélina	17,9 ± 3,1	a'b'c'	10,8 ± 0,5	f'g'h'i'j'k'l'	60,0
Oresto	8,8 ± 0,9	j'k'l'm'n'	8,4 ± 0,5	j'k'l'm'n'	95,7
Paris Island Cos	19,6 ± 0,9	a'	13,2 ± 2,3	c'd'e'f'g'	67,3
Pia	12,5 ± 1,0	d'e'f'g'h'i'	9,0 ± 1,0	i'j'k'l'm'n'	71,8
Pierre Bénite	17,5 ± 3,5	a'b'c'	12,9 ± 1,7	d'e'f'g'h'	73,9
Red Salad Bowl	14,6 ± 1,0	c'd'e'	8,4 ± 1,0	j'k'l'm'n'	57,7
Remus	13,1 ± 1,0	d'e'f'g'	9,5 ± 1,4	g'h'i'j'k'l'm'	72,5
Roxette	14,1 ± 1,3	c'd'e'f'	5,9 ± 1,5	m'n'o'	<b>41,7</b>
Ruby	10,5 ± 1,0	f'g'h'i'j'k'l'	7,3 ± 0,8	l'm'n'	69,8
Saladin	14,9 ± 1,9	c'd'e'	8,9 ± 0,7	j'k'l'm'n'	60,1



**Figure 3.2. Effet du cadmium sur la production de la biomasse sèche.** La biomasse relative des racines des plantes des 18 génotypes cultivées en présence de  $15 \mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$  exprimée en % de la biomasse des plantes cultivées sans cadmium est donnée en fonction de la biomasse relative correspondante des feuilles. Chaque point représente les résultats obtenus pour un des 18 génotypes de laitue. Les losanges blancs ( $\diamond$ ) représentent les deux génotypes de laitue sauvage (*Lactuca serriola*). Les losanges noirs ( $\blacklozenge$ ) représentent les deux variétés de laitue les plus extrêmes du point de vue de l'accumulation de cadmium (Kordaat et Paris island cos.). Les prélèvements ont été effectués, plante par plante, après 8 jours de traitement. Les calculs de pourcentage sont réalisés à partir de 7 répétitions pour chacun des traitements.

## 3.2. Analyse de l'accumulation de cadmium

### 3.2.1. Analyse des teneurs en cadmium

À l'issue de 8 jours d'exposition à une solution nutritive contenant du cadmium à la concentration de 15 $\mu$ M, les plantes des différents géotypes de laitue accumulent de l'ordre de deux fois plus de cadmium dans leurs racines que dans leurs parties aériennes. Les teneurs racinaires en cadmium varient de 500 à 1000  $\mu$ g Cd<sup>2+</sup>/g MS alors que les teneurs foliaires en cadmium varient de 250 à 540  $\mu$ g Cd<sup>2+</sup>/g MS (Tableau 3.3 et Figure 3.3).

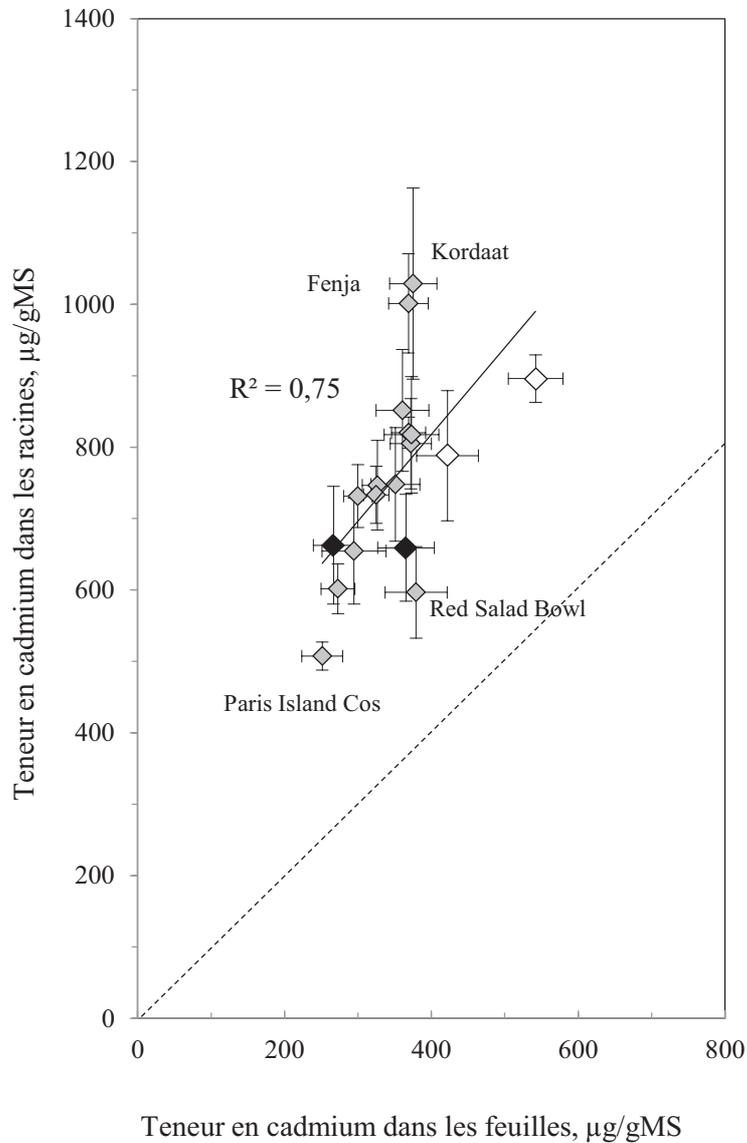
Dans les conditions de notre expérience, la valeur de 400  $\mu$ g Cd<sup>2+</sup>/gMS semble correspondre à la teneur maximale de cadmium que l'on peut trouver dans les parties aériennes pour l'espèce *L. sativa*. Les deux géotypes de laitue sauvage (*L. serriola*) se distinguent par le fait qu'ils présentent des teneurs foliaires de cadmium supérieures à 400  $\mu$ g Cd<sup>2+</sup>/gMS. Considérant les variétés de laitue cultivée une relation étroite a été mise en évidence entre les teneurs racinaire et foliaire en cadmium (Figure 3.3). Deux géotypes, la variété Delsay et la variété Red Salad Bowl s'en écartent. Si on fait abstraction de ces géotypes, les teneurs racinaires et foliaires de cadmium sont bien corrélées ( $R^2 = 0,75$ ) chez les variétés de *L. sativa* restantes (Figure 3.3).

Les résultats de ce criblage phénotypique nous ont permis d'identifier des géotypes extrêmes pour le caractère accumulation de cadmium, particulièrement la variété Paris Island Cos comme étant la variété la moins accumulatrice de cadmium et les variétés Kordaat et Fenja comme étant les variétés les plus accumulatrices de cadmium (Figure 3.3).

**Tableau 3.3. Accumulation de cadmium ( $\mu\text{g/gMS}$ ) dans les racines et les feuilles de 18 géotypes de laitue cultivées en présence de  $15 \mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$** 

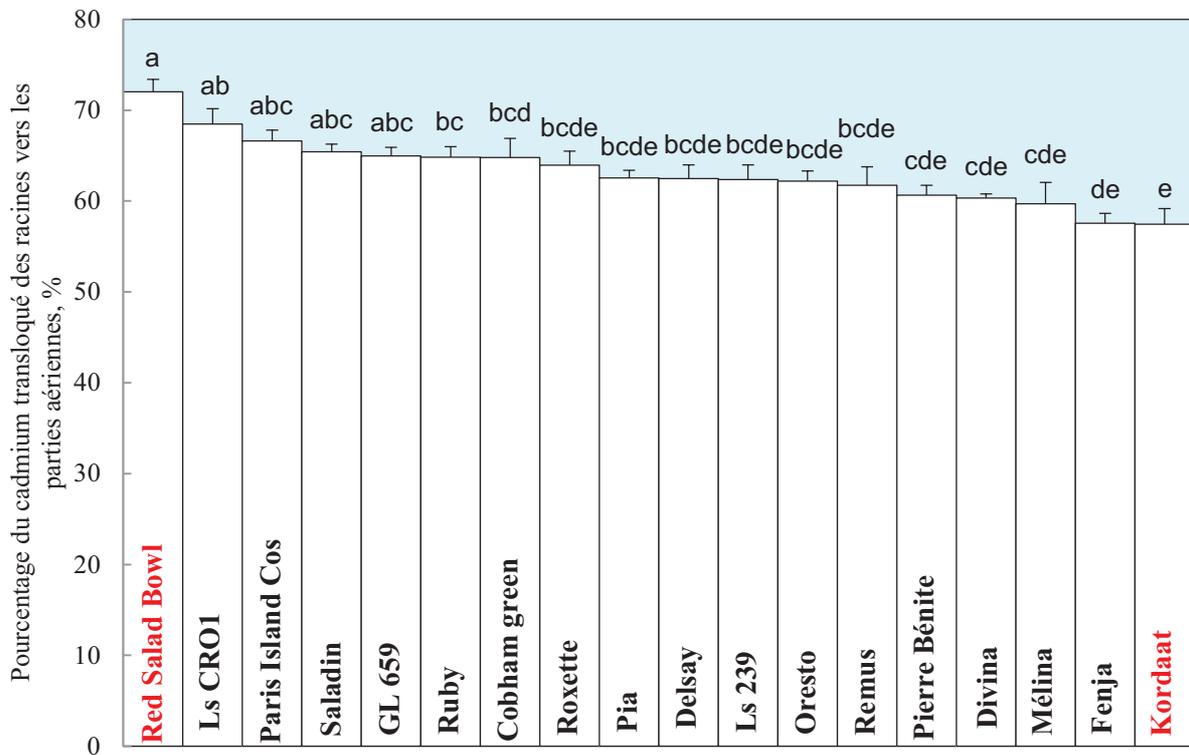
Les prélèvements ont été effectués, plante par plante, après 8 jours de traitement. Les calculs sont réalisés à partir de 7 répétitions pour chacun des traitements. Les valeurs ES correspondent aux valeurs des erreurs standards. Les valeurs suivies par la même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 0,05.

<b>Géotype</b>	<b>Feuilles</b>		<b>Racines</b>	
<b>Delsay</b>	366 ± 39	bc	659 ± 75	d'e'f'g'
<b>Divina</b>	327 ± 21	bcde	747 ± 63	c'd'e'f'
<b>Fenja</b>	369 ± 27	bc	1001 ± 70	a'b'
<b>GL 659</b>	325 ± 17	cde	733 ± 40	c'd'e'f'
<b>Gobham green</b>	351 ± 33	bcd	748 ± 80	c'd'e'f'
<b>Korlaat</b>	375 ± 32	bc	1029 ± 134	a'
<b>LS 239</b>	422 ± 42	b	788 ± 91	c'd'e'f'
<b>LS CR01</b>	542 ± 37	a	896 ± 33	a'b'c'
<b>Mélina</b>	361 ± 36	bc	852 ± 85	a'b'c'd'
<b>Oresto</b>	369 ± 23	bc	820 ± 22	b'c'd'e'
<b>Paris Island Cos</b>	251 ± 28	e	507 ± 20	g'
<b>Pia</b>	372 ± 28	bc	805 ± 63	c'd'e'
<b>Pierre Bénite</b>	373 ± 37	bc	817 ± 82	b'c'd'e'
<b>Red Salad Bowl</b>	379 ± 42	bc	597 ± 64	f'g'
<b>Remus</b>	295 ± 44	cde	654 ± 74	e'f'g'
<b>Roxette</b>	267 ± 27	de	662 ± 82	d'e'f'g'
<b>Ruby</b>	273 ± 23	de	602 ± 35	f'g'
<b>Saladin</b>	300 ± 19	cde	731 ± 44	c'd'e'f'

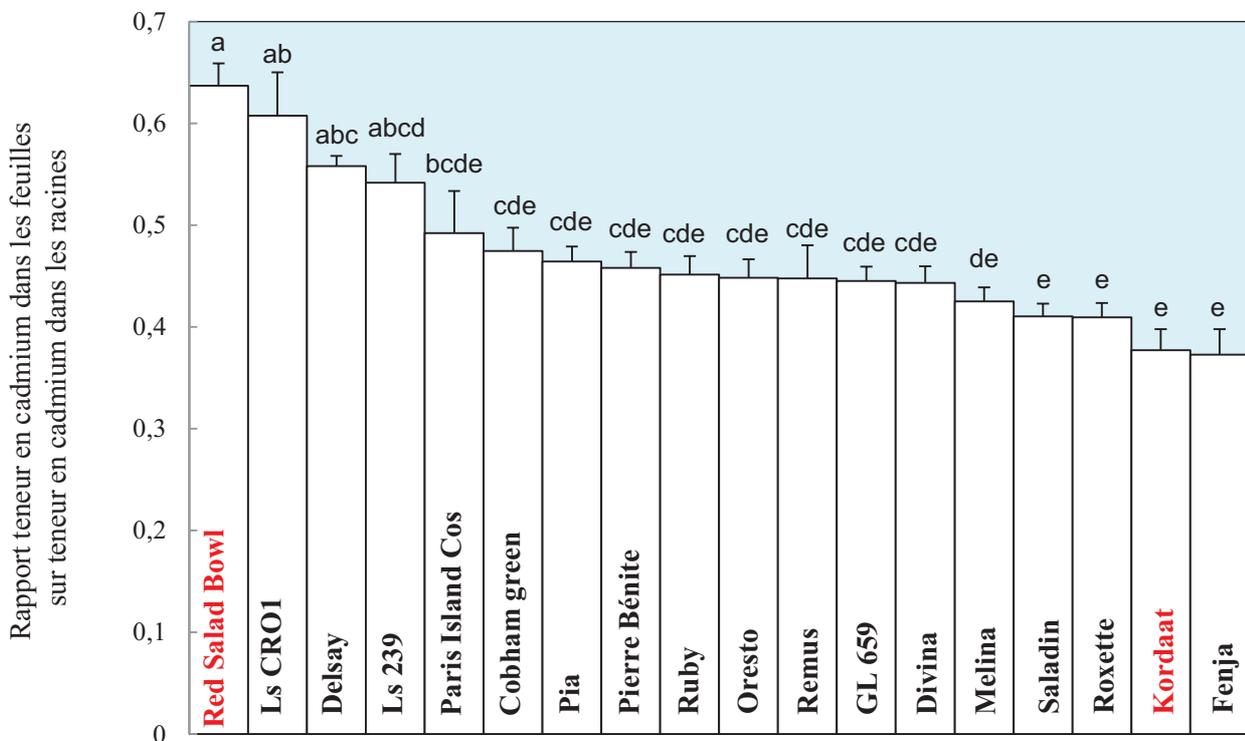


**Figure 3.3. Accumulation de cadmium dans les racines et les feuilles de 18 génotypes de laitue cultivés en présence de  $15 \mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$**

Chaque point représente les résultats obtenus pour un des 18 génotypes de laitue. Les prélèvements ont été effectués, plante par plante, après 8 jours de traitement. Les calculs sont réalisés à partir de 7 répétitions pour chacun des traitements. Les barres d'erreur correspondent aux erreurs standards. Les losanges blancs ( $\diamond$ ) représentent les deux génotypes de laitue sauvage (*Lactuca serriola*). Les losanges noirs ( $\blacklozenge$ ) représentent les deux variétés de laitue les plus extrêmes du point de vue de la tolérance au cadmium (Delsay et Roxette).



**Figure 3.4.** Pourcentage du cadmium transloqué des racines vers les parties aériennes chez 18 génotypes de laitue cultivés en présence de  $15 \mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$ . Le pourcentage représente la quantité de cadmium présent dans les parties aériennes rapportée à la quantité totale de cadmium absorbé par la plante. Les prélèvements ont été effectués, plante par plante, après 8 jours de traitement. Les calculs de pourcentage sont réalisés à partir de 7 répétitions pour chacun des traitements. Les barres d'erreur correspondent aux erreurs standards. Les valeurs marquées par la même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil 0,05 (comparaisons multiples des moyennes (Test de Tukey)).



**Figure 3.5.** Rapport entre teneur foliaire en cadmium et teneur racinaire en cadmium chez 18 génotypes de laitue cultivés en présence de  $15 \mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$ . Les prélèvements ont été effectués, plante par plante, après 8 jours de traitement. Les calculs de pourcentage sont réalisés à partir de 7 répétitions pour chacun des traitements. Les barres d'erreur correspondent aux erreurs standards. Les valeurs marquées par la même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil 0,05 (comparaisons multiples des moyennes (Test de Tukey)).

### 3.2.2. Translocation de cadmium des racines vers les parties aériennes

La capacité de translocation du cadmium des racines vers les parties aériennes a été calculée pour les 18 génotypes de laitue. Cette capacité de translocation représente la quantité de cadmium présent dans les parties aériennes rapportée à la quantité totale de cadmium absorbé par la plante. Nos calculs ont révélé une variabilité de réponse entre les différents génotypes de laitue. En effet, la variété Red Salad Bowl présente un comportement intéressant qui est que 72% du cadmium qu'elle a absorbé se retrouve dans ses parties aériennes. Par contraste la variété Kordaat ne présente dans ses parties aériennes que 57% du cadmium qu'elle a absorbé (Figure 3.4).

Les valeurs du pourcentage de translocation données par les différentes variétés peuvent paraître en contradiction avec les teneurs foliaires et racinaires. En effet, les valeurs du pourcentage de translocation indiquent que plus de la moitié du cadmium absorbé par la plante se trouvent dans les parties aériennes alors que nous avons vu que les teneurs foliaires en cadmium étaient en moyenne deux fois plus faibles que les teneurs racinaires en cadmium. L'apparente contradiction s'explique par le fait que la translocation est calculée à partir des quantités de cadmium présentes dans les racines et dans les feuilles : la différence de masse entre ces deux organes est à l'origine de cette apparente contradiction. Dans la mesure où le facteur « biomasse » est susceptible de jouer un rôle important dans la différence intervariétale de translocation de cadmium, nous avons regardé si les différences intervariétales observées se retrouvaient si on comparait les rapports entre teneur foliaire et teneur racinaire en cadmium. L'analyse de ce rapport nous a permis de constater que la variabilité de réponse entre les différents génotypes de laitue était globalement très similaire à celle obtenue pour la valeur du pourcentage de translocation de cadmium des racines vers les parties aériennes. En effet, la variété Red Salad Bowl présente le rapport teneur en cadmium dans les feuilles sur teneur en cadmium dans les racines le plus élevée (0,63). Par contraste les deux variétés Kordaat et Fenja présentent les rapports les plus faibles (0,37) (Figure 3.5). Il y a cependant des variétés dont le positionnement relatif change fortement selon que l'on regarde la translocation du cadmium ou le rapport entre teneurs foliaires et teneurs racinaire. C'est par exemple, le cas des variétés Roxette, Saladin ou GL659. Ces résultats prouvent que la variabilité du pourcentage de translocation de cadmium des racines vers les parties aériennes observée n'est en général pas due à une variabilité morphologique du

rapport masse racinaire sur masse foliaire entre les différents génotypes, même si ponctuellement, cette variabilité morphologique peut jouer un rôle significatif.

#### 4. Discussion

Dans ce travail un criblage phénotypique de la tolérance au cadmium, de la capacité d'accumulation de cadmium ainsi que de la capacité de translocation de cadmium des racines vers les parties aériennes pour 18 génotypes de laitue a été effectué. Suite à ce criblage, des comportements différentiels en réponse à la présence de cadmium dans le milieu de culture ont été observés. Les génotypes présentant des comportements extrêmes vis-à-vis du cadmium ont été utilisés par la suite pour développer une approche physiologique et une approche génétique.

Notre analyse de la diversité phénotypique montre un effet toxique du traitement par le cadmium chez les différents génotypes de laitue. Cet effet toxique se manifeste par la réduction de la biomasse des 18 génotypes de laitue aussi bien au niveau foliaire qu'au niveau racinaire. En effet, à partir d'un certain seuil, le cadmium devient toxique et affecte négativement la croissance de la plupart des végétaux. Il a été démontré que le cadmium réduit considérablement la production de la biomasse chez un grand nombre d'espèces végétales cultivées dans des conditions expérimentales variées (Kim et *al.*, 2003 ; Ghnaya et *al.*, 2007). Ces effets toxiques sont dus à la vulnérabilité de plusieurs processus physiologiques et biochimiques au cadmium et peuvent être liés, entre autres, à la perturbation de l'équilibre de certaines hormones de croissance, notamment l'auxine (Hasenstein et *al.*, 1988), à la perturbation de l'homéostasie des éléments minéraux essentiels pour la croissance des plantes (Das et *al.*, 1997), à une action délétère du cadmium sur la composition des parois cellulaires (Chaoui et Ferjani, 2005), ainsi qu'à des perturbations de la machinerie photosynthétique notamment la structure des chloroplastes et la biosynthèse de la chlorophylle (Mobin et Khan, 2007 ; Ebbs et Uchil, 2008). Il est toutefois important de noter que le cadmium n'affecte pas la croissance de tous les génotypes de laitue avec la même sévérité. En effet, l'analyse des effets du cadmium sur la croissance nous a permis d'identifier une grande variabilité de réponse entre les différents génotypes de laitue. Cette variabilité nous a permis d'identifier deux variétés de laitue présentant des comportements extrêmes du point de vue de leurs tolérances au cadmium (Delsay et Roxette). Une telle variabilité a déjà été décrite chez la laitue (Florijn et *al.*, 1991).

Un des 18 géotypes se distingue par le fait que la production de la biomasse de ses racines est augmentée en présence de cadmium (Delsay). Ce résultat n'est pas en lui-même extraordinaire. Plusieurs chercheurs ont en effet noté qu'une stimulation de la croissance pourrait être observée en réponse à l'ajout d'une très faible concentration de Cd dans le milieu chez plusieurs espèces telles que *Betula pendula*, *Miscanthus sinensis* et *Arabidopsis paniculata* (Gussarsson, 1996 ; Arduini et al., 2004 ; Tang et al., 2009). Selon Kennedy et Gonsalves (1987), ces effets pourraient être expliqués par l'induction d'une hyperpolarisation de la membrane cytoplasmique à la surface racinaire en présence de faibles concentrations de Cd, ce qui augmente ainsi le potentiel transmembranaire et présente une source d'énergie pour l'absorption des cations essentiels.

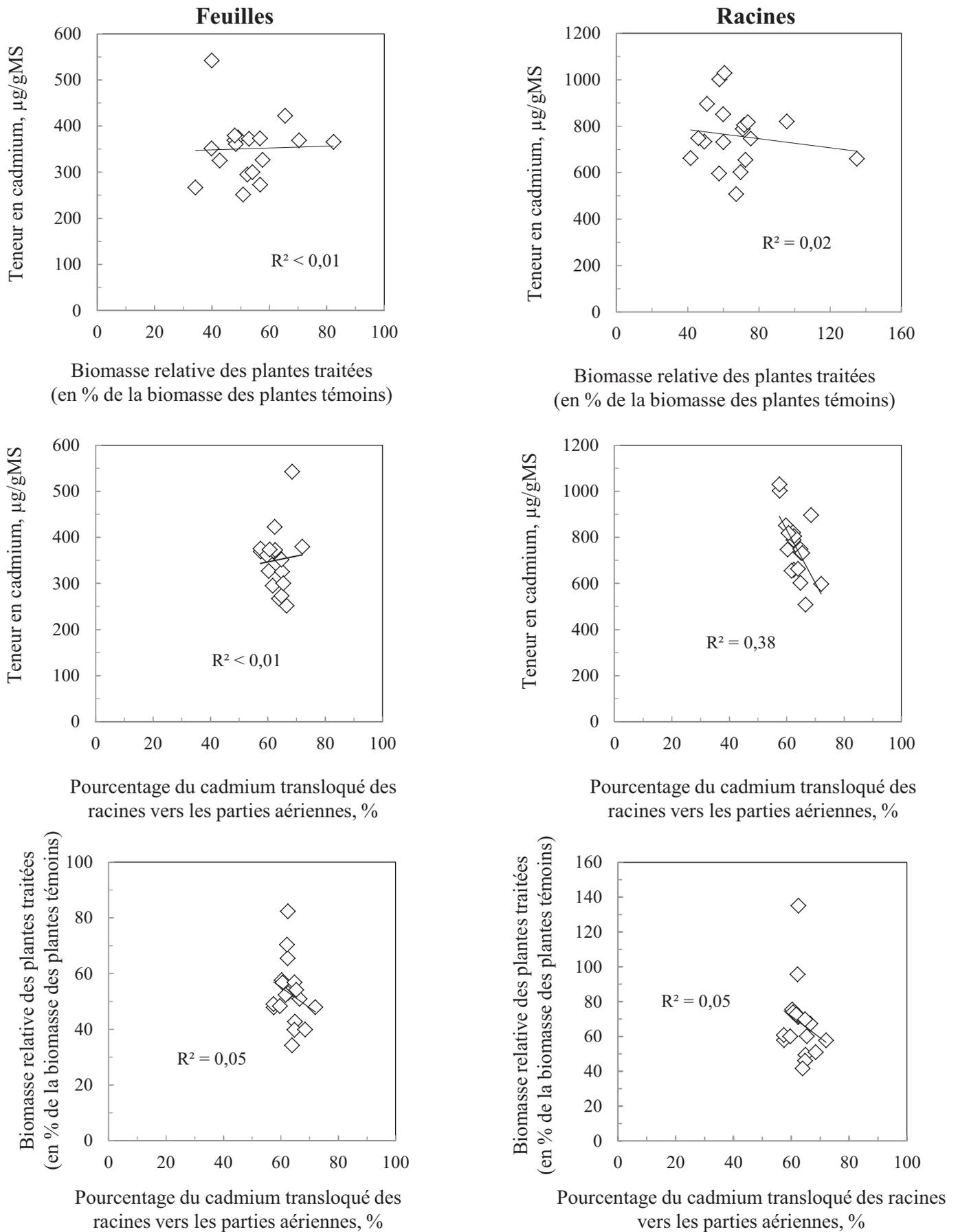
Nos résultats montrent que l'accumulation de cadmium diffère selon l'organe étudié. Les géotypes de laitue étudiés accumulent de l'ordre de deux fois plus de cadmium dans leurs racines que dans leurs parties aériennes. Des résultats similaires ont déjà été obtenus chez la laitue (Costa et Morel, 1994b; Ramos et al., 2002) ainsi que chez le riz (Ros et al., 1992) et le petit pois (Chugh et al., 1992).

Nos résultats nous ont permis de trouver une variabilité de réponse entre les différents géotypes de laitue pour le caractère accumulation de cadmium. Cette variabilité nous a permis d'identifier deux variétés de laitue présentant des comportements extrêmes du point de vue de leurs accumulations de cadmium (Paris Island Cos, Kordaat et Fenja). Le fait de trouver des différences d'accumulation de cadmium chez différentes variétés d'une même espèce végétale n'est pas surprenant en soi. Des différences d'un facteur supérieur à 2 ont déjà été observées chez la laitue (Costa et Morel, 1994a ; Florijn et al., 1991). Si on s'intéresse à d'autres espèces, des différences de teneurs en cadmium correspondaient à un facteur 2 chez la "pomme de terre" (McLaughlin et al., 1994b), un facteur compris entre 2 et 6 suivant les années chez le blé tendre (Vinkel, 2001), un facteur 3 chez le blé dur, un facteur 4 dans le grain de tournesol, un facteur 10 dans la graine de lin (Li et al., 1997) ou un facteur 11 dans des plantules de maïs (Florijn et Vanbeusichem, 1993).

Le comportement de la variété Paris Island Cos qui accumule le moins de cadmium dans la partie aérienne pourrait s'expliquer par la mise en place d'un ou de plusieurs mécanismes permettant de limiter l'absorption par la racine ou de favoriser l'efflux de cadmium en dehors du cytoplasme.

La détermination du pourcentage de translocation de cadmium des racines vers les parties aériennes a permis de trouver une variabilité de réponse entre les différents géotypes de laitue. En effet, la variété Red Salad Bowl possède la capacité la plus élevée de translocation de cadmium des racines vers les parties aériennes. Par contraste la variété Kordaat transloque en pourcentage le moins de cadmium de ses racines vers ses parties aériennes. Ce résultat est en accord avec celui de Florijn et *al.* 1991 qui montrent que la capacité de translocation du cadmium des racines vers la partie aérienne varie entre différentes variétés de laitue. L'allocation du cadmium entre les racines et les parties aériennes est supposée être étroitement dépendante de par plusieurs phénomènes: la séquestration des métaux à l'intérieur des cellules racinaires, le transport symplasmique dans la stèle et la décharge du cadmium dans le xylème (Clemens et *al.*, 2002a).

Il faut particulièrement noter que les variétés les plus extrêmes du point de vue de l'accumulation de cadmium ne présentent pas un comportement extrême du point de vue de la tolérance au cadmium ni du point de vue de la translocation du cadmium des racines vers les parties aériennes. Plus généralement, les corrélations entre les trois caractères étudiés (tolérance au cadmium, accumulation de cadmium et translocation de cadmium des racines vers les parties aériennes) sont très faibles pour les 18 variétés étudiées ce qui suggère que nos caractères sont indépendants génétiquement (Figure 3.6). Suite à ce résultat, nous nous sommes intéressés à l'étude des déterminismes génétiques de ces caractères indépendamment (voir chapitre V).



**Figure 3.6. Relation entre les trois caractères étudiés (tolérance au cadmium, accumulation de cadmium et translocation de cadmium des racines vers les parties aériennes) chez les 18 génotypes de laitue cultivés en présence de  $15 \mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$ .** Les prélèvements ont été effectués, plante par plante, après 8 jours de traitement. Les calculs de pourcentage sont réalisés à partir de 7 répétitions pour chacun des traitements.



## Chapitre IV

Recherche des déterminants physiologiques  
contrôlant l'accumulation du cadmium chez les  
lignées les plus extrêmes



## Chapitre IV: Recherche des déterminants physiologiques contrôlant l'accumulation du cadmium chez les lignées les plus extrêmes

### 1. Introduction

Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, des variétés de laitue présentant des phénotypes extrêmes pour les caractères d'accumulation de cadmium et de translocation du cadmium des racines vers la partie aérienne ont été sélectionnées (voir chapitre III). Afin de caractériser physiologiquement ces lignées extrêmes et de montrer l'origine de cette variabilité, nous avons entrepris une approche physiologique. Dans le cadre de cette approche, 5 expériences ont été réalisées.

Les 4 premières expériences étaient des expériences descriptives et exploratoires qui avaient comme objectif de caractériser physiologiquement les lignées extrêmes du point de vue de l'accumulation de cadmium et de la translocation de cadmium des racines vers les parties aériennes, et ce, dans le but de trouver des indices qui peuvent aider à comprendre l'origine de leurs variabilités. D'une manière plus précise, les objectifs respectifs de ces 4 expériences étaient les suivants :

1. étude de l'effet du cadmium sur la production de la biomasse, le statut hydrique et la nutrition minérale,
2. étude de l'effet du cadmium sur l'accumulation des anions majeurs,
3. étude de l'effet du calcium sur l'accumulation du cadmium,
4. et étude de l'effet du fer sur l'accumulation du cadmium.

Les expériences 3 et 4 avaient comme objectif secondaire de déterminer s'il existait d'autres conditions de cultures qui permettent d'augmenter la différence d'accumulation de cadmium observée entre les variétés de laitue afin d'avoir plus de chance de réussite pour notre approche moléculaire (voir chapitre VI).

La 5<sup>e</sup> expérience, réalisée en collaboration avec Dr. Catherine Sarrobert du CEA de Cadarache, était beaucoup plus ciblée. Cette expérience a consisté à mesurer l'influx et l'efflux de cadmium radioactif chez les lignées extrêmes pour les caractères d'accumulation de cadmium et de translocation du cadmium des racines vers les parties aériennes, toujours dans l'objectif de comprendre l'origine de leurs variabilités.

## **2. L'effet du cadmium sur la production de la biomasse et le statut hydrique**

### **2.1. Introduction**

Chez les plantes, le cadmium est toxique à de faibles concentrations. Les symptômes d'une plante cultivée en présence de cadmium sont: l'inhibition de la croissance, la chlorose, la nécrose, la perturbation de la photosynthèse... (Clemens, 2006).

Dans le cadre de notre étude, nous avons analysé l'effet de traitements par des concentrations croissantes de cadmium sur la production de la biomasse et le statut hydrique de nos trois variétés de laitue extrêmes pour les caractères d'accumulation de cadmium et de translocation de cadmium des racines vers les parties aériennes.

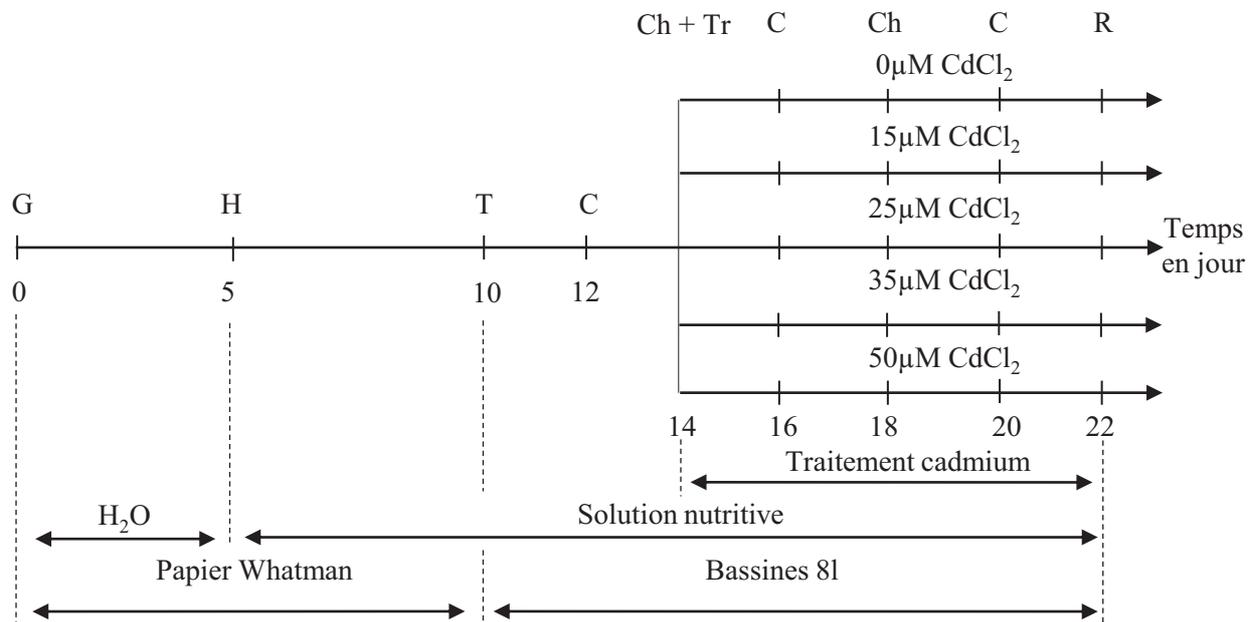
### **2.2. Protocole expérimental**

Les plantes ont été cultivées en hydroponie (voir chapitre II: matériels et méthodes). Des plantes âgées de 14 jours ont été exposées à différentes concentrations de CdCl<sub>2</sub> (0, 15, 25, 35 et 50 µM) pendant 8 jours. Le schéma du protocole expérimental est représenté dans la figure 4.1. L'effet du cadmium sur la biomasse foliaire et racinaire a été déterminé immédiatement au moment de la récolte, par mesure du poids de matière fraîche. Le poids de matière sèche, ainsi que la variation de la teneur en eau, ont été déterminés après dessiccation des échantillons dans une étuve à 80 °C pendant 48 heures.

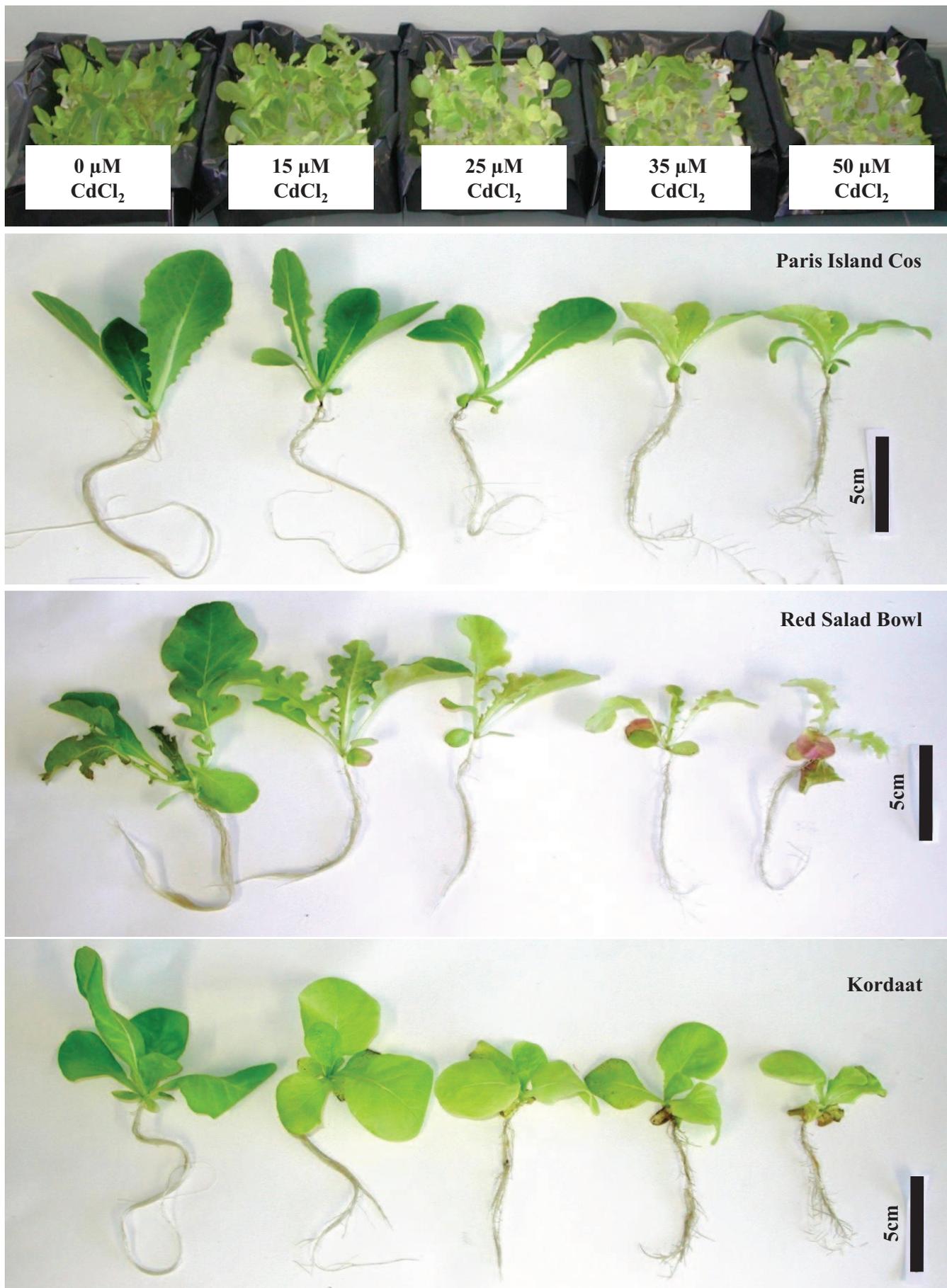
### **2.3. Résultats**

#### **2.3.1. Effet du cadmium sur la production de la biomasse**

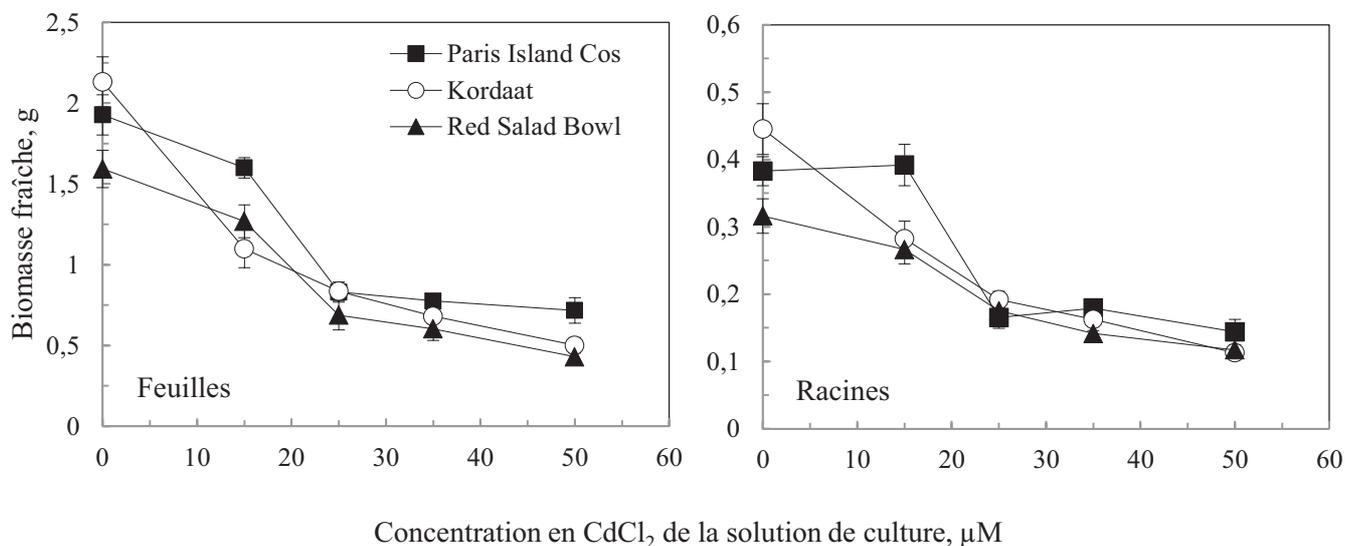
À l'issue des 8 jours d'exposition au cadmium, les plantes des trois variétés manifestent une sévère réduction de la biomasse aérienne et racinaire en réponse à l'augmentation de la concentration du cadmium dans le milieu de culture pour les trois variétés considérées (Photos 4.1). Nous avons aussi noté des symptômes de chlorose, surtout à des concentrations élevées de cadmium (35 et 50 µM de CdCl<sub>2</sub>). Afin d'avoir des données quantitatives sur l'effet du traitement en cadmium sur la production de la biomasse (feuilles et racines), nous avons déterminé le poids de la matière fraîche et de la matière sèche des parties aériennes et des racines pour chacune des plantes (Figure 4.2 ; Figure 4.3 ; Figure 4.4; Figure 4.5). La figure 4.2 montre qu'au fur et à mesure que la concentration de cadmium augmente dans le milieu de culture il est possible de distinguer deux phases: la première entre 0 et 25 µM de CdCl<sub>2</sub> dans le milieu et la deuxième entre 25 et 50 µM.



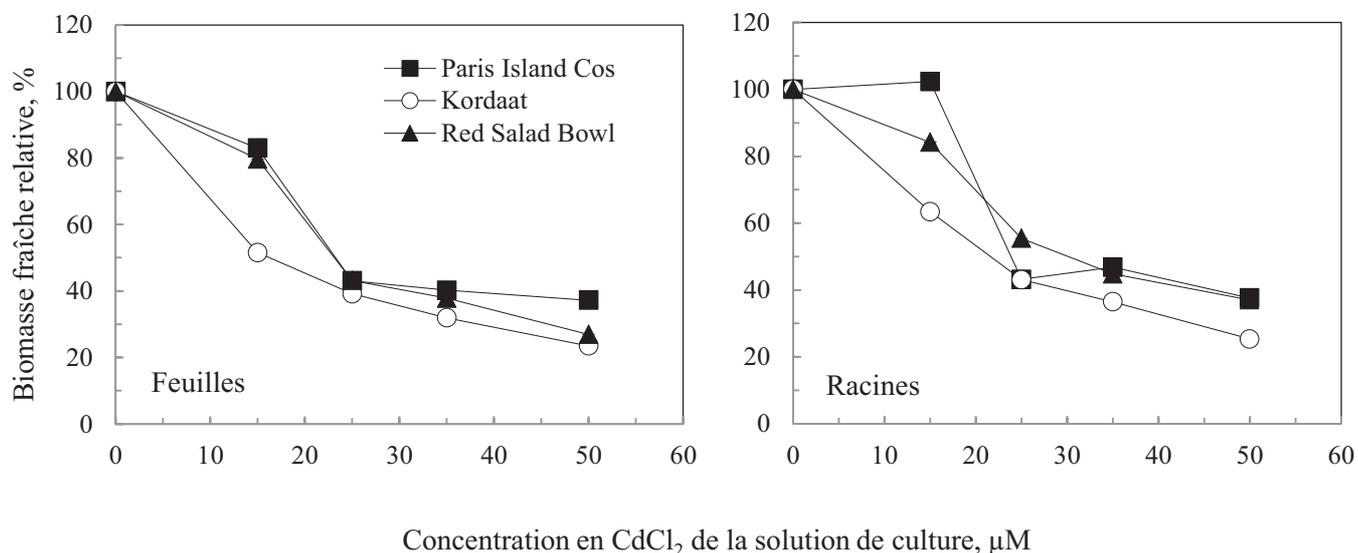
**Figure 4.1.** Représentation schématique du protocole expérimental adopté pour la culture hydroponique. **G**: germination; **H**: ajout de la solution nutritive; **T**: transfert sur milieu hydroponique; **C**: changement de l'orientation et de la disposition des bassines, **Tr**: application du traitement cadmium; **Ch**: changement du milieu de culture; **R**: récolte.



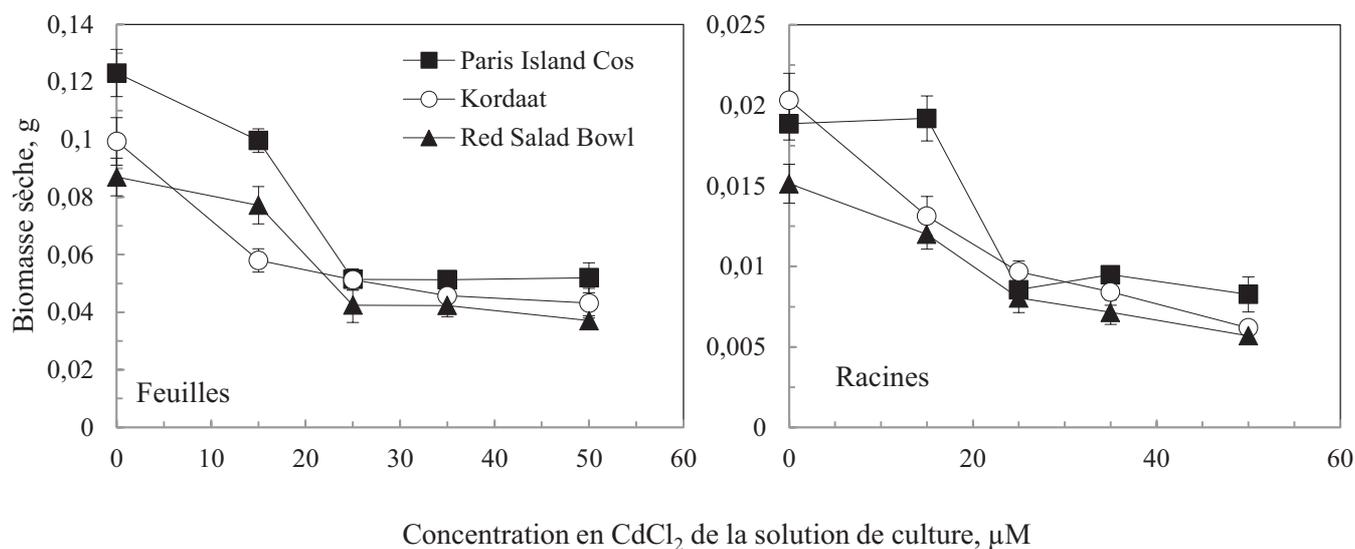
**Photos 4.1.** Effet des différentes concentrations en cadmium sur la production de biomasse des parties aériennes et des racines des variétés de laitue Paris Island Cos, Kordaat et Red Salad Bowl. Des plantes âgées de 14 jours ont été exposées à différentes concentrations de cadmium (0, 15, 25, 35 et 50 μM de CdCl<sub>2</sub>) durant les 8 derniers jours de culture.



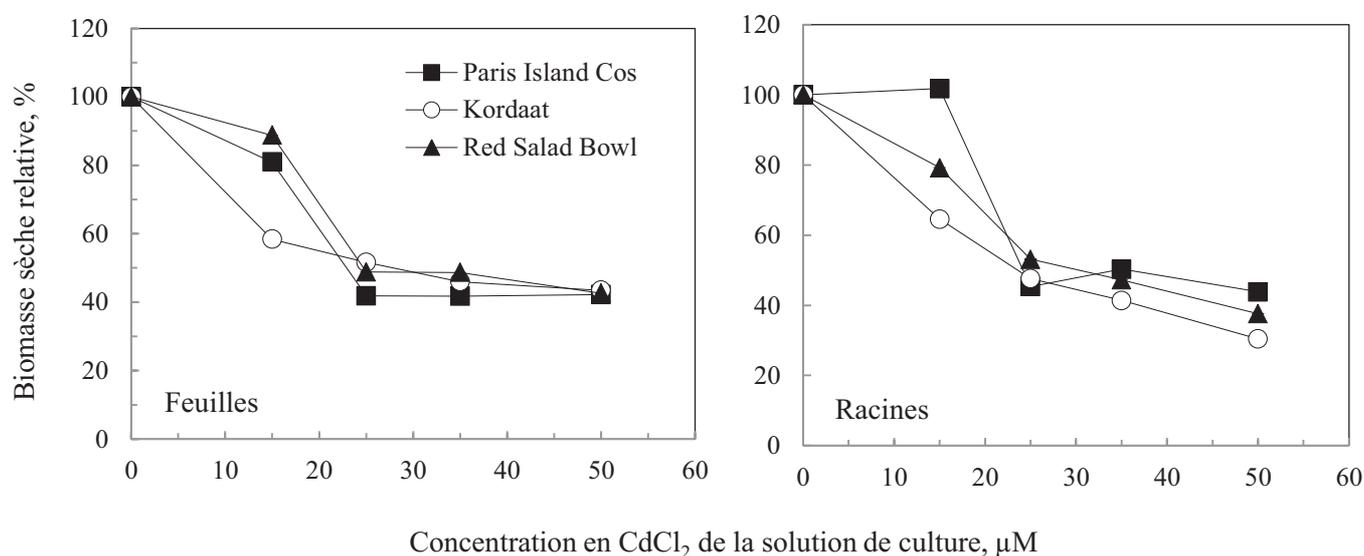
**Figure 4.2.** Effet de différentes concentrations de cadmium sur la variation du poids de la matière fraîche des parties aériennes et des racines pour les variétés de laitue Paris Island Cos, Kordaat et Red Salad Bowl. Des plantes âgées de 14 jours ont été exposées à différentes concentrations de CdCl<sub>2</sub> durant les 8 derniers jours de culture. Les prélèvements ont été effectués plante par plante. Les valeurs sont des moyennes de 8 répétitions. Les barres d'erreur correspondent aux erreurs standards.



**Figure 4.3.** Effet des différentes concentration de cadmium sur la biomasse fraîche relative des parties aériennes et des racines pour les variétés de laitue Paris Island Cos, Kordaat et Red Salad Bowl. Cette biomasse fraîche relative est exprimée par référence à la biomasse mesurée sur des plantes témoins cultivées en absence de cadmium; elle est exprimée en pourcentage. Des plantes âgées de 14 jours ont été exposées à différentes concentrations de CdCl<sub>2</sub> durant les 8 derniers jours de culture. Les prélèvements ont été effectués plante par plante. Les valeurs sont des moyennes de 8 répétitions.



**Figure 4.4.** Effet des différentes concentrations de cadmium sur la variation du poids de matière sèche des parties aériennes et des racines pour les variétés de laitue Paris Island Cos, Kordaat et Red Salad Bowl. Des plantes âgées de 14 jours ont été exposées à différentes concentrations de CdCl<sub>2</sub> durant les 8 derniers jours de culture. Les prélèvements ont été effectués plante par plante. Les valeurs sont des moyennes de 8 répétitions. Les barres d'erreur correspondent aux erreurs standards.



**Figure 4.5.** Effet des différentes concentration de cadmium sur la biomasse sèche relative des parties aériennes et des racines pour les variétés de laitue Paris Island Cos, Kordaat et Red Salad Bowl. Cette biomasse sèche relative est exprimée par référence à la biomasse mesurée sur des plantes témoins cultivées en absence de cadmium; elle est exprimée en pourcentage. Des plantes âgées de 14 jours ont été exposées à différentes concentrations de CdCl<sub>2</sub> durant les 8 derniers jours de culture. Les prélèvements ont été effectués plante par plante. Les valeurs sont des moyennes de 8 répétitions.

Dans la première phase, les trois variétés montrent le même comportement, à savoir une chute importante des biomasses fraîches: à 25  $\mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$  dans le milieu, on enregistre des baisses de biomasses fraîches de 61%, 57% et 57% par rapport aux valeurs mesurées pour des plantes témoins non soumises au cadmium des variétés Kordaat, Paris Island Cos et Red Salad Bowl, respectivement. Pour la deuxième phase, entre 25 et 50  $\mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$  dans le milieu, la masse de matière fraîche des plantes de la variété Paris Island Cos reste stable, contrairement à celles des plantes des variétés Kordaat et Red Salad Bowl qui continuent à décroître légèrement pour atteindre des baisses respectives de 76 % et de 73 % lorsque la concentration en  $\text{CdCl}_2$  dans le milieu de culture atteint 50  $\mu\text{M}$ .

En ce qui concerne les racines, à l'exception de la variété Paris Island Cos dont les plantes montrent une légère stimulation de la biomasse racinaire lorsque le  $\text{CdCl}_2$  se trouve à la concentration de 15 $\mu\text{M}$  dans le milieu de culture, le cadmium induit un effet inhibiteur sévère sur la production de la biomasse des racines dès les plus faibles concentrations de cadmium dans le milieu de culture (Figure 4.2 ; Figure 4.3). En présence de 15 $\mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$ , les plantes des variétés Kordaat et Red Salad Bowl montrent une réduction de la biomasse racinaire respective de 37% et 16% par rapport aux plantes non traitées, alors que les plantes de la variété Paris Island Cos montrent une augmentation de la biomasse racinaire de 2%. L'effet du cadmium sur la production de la biomasse des racines continue à s'accroître avec l'augmentation de la concentration de cadmium dans le milieu: il provoque des réductions de biomasse racinaire de 75%, 62% et 63% chez les plantes des variétés Kordaat, Paris Island Cos et Red Salad Bowl, respectivement, lorsqu'elles sont cultivées en présence de 50  $\mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$ .

Pour les trois variétés de laitue, la variation du poids des matières sèches des feuilles et des racines de laitue en fonction de la concentration de cadmium dans le milieu présente une allure générale identique à l'allure obtenue pour la variation de la biomasse fraîche (Figure 4.4 ; Figure 4.5).

### 2.3.2. Effet du cadmium sur l'hydratation des plantes

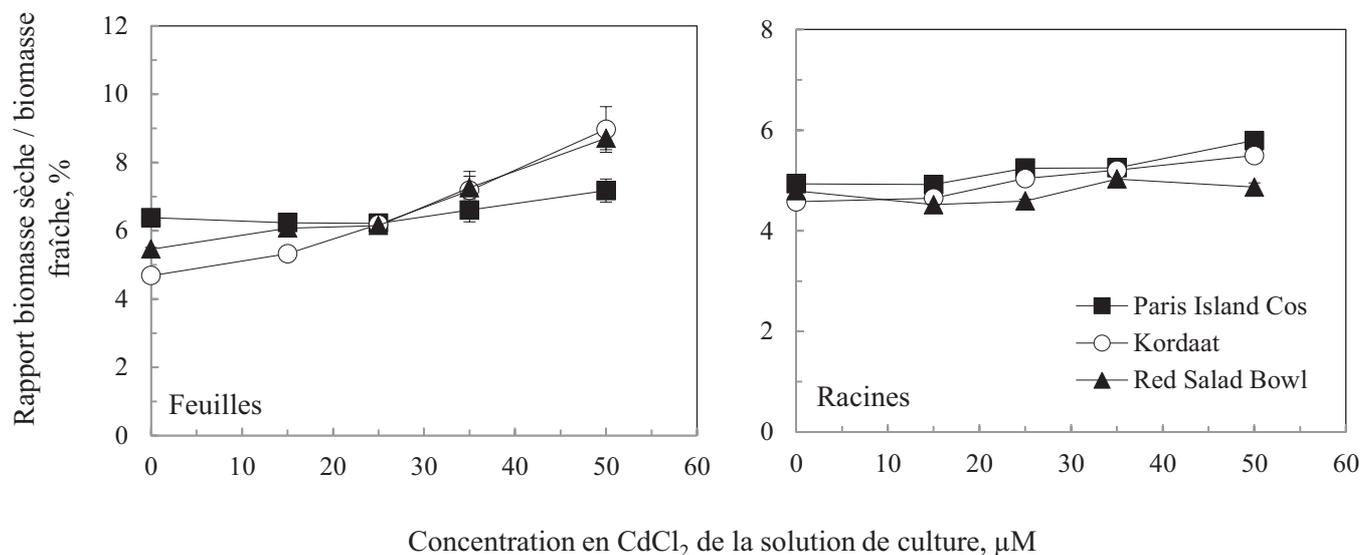
L'hydratation des tissus a été estimée d'après le calcul du rapport entre biomasse sèche et biomasse fraîche (MS/MF). Au niveau foliaire, le cadmium affecte d'une manière significative l'hydratation des deux variétés Kordaat et Red Salad Bowl, mais pas celle de la variété Paris Island Cos (Figure 4.6; Figure 4.7). Pour un traitement de 50  $\mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$ , la variété Kordaat présente la plus forte déshydratation des parties aériennes en réponse à la présence de cadmium dans le milieu de culture, avec une augmentation d'un facteur deux du rapport MS/MF. La variété Red Salad Bowl présente un comportement intermédiaire entre celui de Kordaat et celui de Paris Island Cos: son rapport MS/MF augmente de 60% chez les plantes cultivées en présence de 50  $\mu\text{mole}$  par litre (Figure 4.7).

Contrairement à celle des feuilles, l'hydratation des racines est moins affectée par le cadmium (Figure 4.6; Figure 4.7). En présence de 50  $\mu\text{mole}$  par litre de  $\text{CdCl}_2$  dans le milieu, on enregistre une augmentation du rapport MS/MF de 20%, de 17% et de 2% pour les variétés Kordaat, Paris Island Cos et Red Salad Bowl, respectivement.

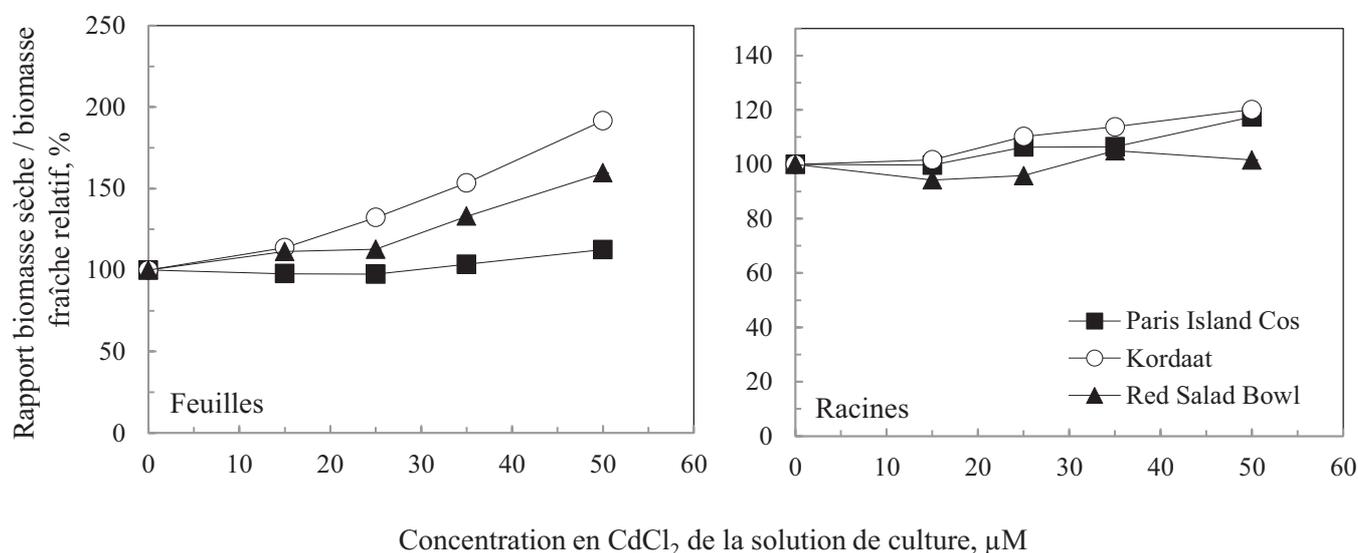
## 2.4. Discussion

Dans ce travail nos trois variétés de laitue ont été exposées à différentes concentrations de cadmium. Des comportements différentiels en réponse à la présence de cadmium dans le milieu de culture ont été observés.

Un effet toxique du traitement par le cadmium est observé chez les trois variétés de laitue. Cet effet se manifeste notamment par une décoloration jaunâtre partielle ou totale de la feuille (chlorose) (photos 4.1). La chlorose observée est un symptôme de la toxicité du cadmium, elle est due à une diminution de la teneur en pigments photorécepteurs, notamment les chlorophylles, résultant d'une désorganisation structurale des chloroplastes (Djebali et *al.*, 2005 ; Mobin et Khan, 2007 ; Ebbs et Uchil, 2008), ainsi que d'une inhibition de l'activité des enzymes responsables de la biosynthèse de la chlorophylle (Pietrini et *al.*, 2003 ; Faller et *al.*, 2005 ; Mobin et Khan, 2007 ; Ghnaya et *al.*, 2007). Cette diminution de la teneur en chlorophylles peut être attribuée également à une déficience en oligo-éléments notamment le fer (Larbi et *al.*, 2002 ), dont la biodisponibilité peut être limitée par la présence de  $\text{Cd}^{2+}$  dans le milieu ou par une répression du fonctionnement de la Fe(III) réductase au niveau des cellule racinaires (Larbi et *al.*, 2002; Sharma et *al.*, 2004).



**Figure 4.6.** Effet des différentes concentrations de cadmium sur le rapport entre masse sèche et masse fraîche des parties aériennes et des racines pour les variétés de laitue Paris Island Cos, Kordaat et Red Salad Bowl. Ce rapport est exprimé en pourcent. Des plantes âgées de 14 jours, ont été exposées à différentes concentrations de  $\text{CdCl}_2$  durant les 8 derniers jours de culture. Les prélèvements ont été effectués plante par plante. Les valeurs sont des moyennes de 8 répétitions. Les barres d'erreur correspondent aux erreurs standards.



**Figure 4.7.** Effet des différentes concentrations de cadmium sur le rapport entre masse sèche et masse fraîche relatif des parties aériennes et des racines pour les variétés de laitue Paris Island Cos, Kordaat et Red Salad Bowl. Ce rapport est ici exprimé en pourcentage du même rapport calculé pour les plantes témoins, c'est-à-dire non soumises à un traitement par le cadmium. Les plantes âgées de 14 jours ont été exposées à différentes concentrations de  $\text{CdCl}_2$  durant les 8 derniers jours de culture. Les prélèvements ont été effectués plante par plante. Les valeurs sont des moyennes de 8 répétitions.

La détermination des poids de matière fraîche et de matière sèche au niveau des feuilles et des racines des trois variétés de laitue étudiées montre que la biomasse décroît significativement au fur et à mesure que la concentration du cadmium augmente dans le milieu (Figure 4.2 ; Figure 4.3 ; Figure 4.4 ; Figure 4.5). Comme cela a été détaillé dans la synthèse bibliographique, cet effet du cadmium sur la croissance peut être lié à la perturbation de l'équilibre de certaines hormones de croissance (Hasenstein *et al.*, 1988), à la perturbation de l'homéostasie des éléments minéraux essentiels (Das *et al.*, 1997), ainsi qu'à des perturbations de la machinerie photosynthétique (Mobin et Khan, 2007 ; Ebbs et Uchil, 2008).

Il est toutefois important de noter que le cadmium n'affecte pas la production de la biomasse des 3 variétés de laitue avec la même sévérité. En effet, nos résultats montrent que la biomasse de la variété Kordaat est plus affectée que celles des variétés Paris Island Cos et Red Salad Bowl notamment à 15 $\mu$ M de CdCl<sub>2</sub>.

En plus de ces effets sur la production de la biomasse, le cadmium cause aussi une diminution de la teneur en eau surtout dans les parties aériennes (Figure 4.6 ; Figure 4.7). La comparaison des taux de déshydratation des trois variétés, en réponse à des concentrations croissantes de cadmium dans le milieu, nous a permis de distinguer un comportement différent pour chacune de ces variétés. En effet, la variété Kordaat présente une forte déshydratation par comparaison aux deux variétés Paris Island Cos et Red Salad Bowl. Comme cela a été mentionné dans la synthèse bibliographique, la déshydratation chez nos variétés de laitue pourrait s'expliquer par un changement dans les processus d'absorption, de transport et de transpiration (Barcelo *et al.*, 1986 ; Vassilev *et al.*, 1997), incluant l'ouverture des cellules stomatique (Fediuc *et al.*, 2005), et la diminution du nombre et de la taille des vaisseaux du xylème (Lamoreaux et Chaney, 1977).

Notre étude a permis de mieux décrire le comportement des trois variétés de laitue étudiées en termes d'effet du cadmium sur la production de la biomasse. D'après ces résultats il semble que la variété qui tolère moins la présence du cadmium dans le milieu est la variété Kordaat. D'autres facteurs, tels que l'altération de l'homéostasie en éléments minéraux essentiels à la croissance de la plante, peuvent contribuer à la baisse de la production de la biomasse des plantes, suite à un traitement par le cadmium. Il est donc important de déterminer la capacité de chacune de ces variétés à accumuler ces éléments, en réponse à différentes concentrations de cadmium dans le milieu.

### 3. Effet du cadmium sur la nutrition minérale

#### 3.1. Introduction

Chez les plantes, la présence du cadmium dans le milieu de culture se manifeste par l'apparition de symptômes d'intoxication, accompagnés d'une inhibition de la croissance pondérale des plantes. Ces signes de carence et de retard de la croissance peuvent s'expliquer entre autres, par un déséquilibre de la nutrition minérale. En effet, le cadmium perturbe le statut hydrominéral des plantes en interférant surtout avec le prélèvement de certains éléments essentiels (zinc, calcium, potassium...), soit par substitution, soit par compétition au niveau des sites d'absorption membranaire (Benavides et *al.*, 2005 ; DalCorso et *al.*, 2008).

Dans le cadre de notre étude sur la laitue, nous avons analysé l'effet de traitements par des concentrations croissantes de cadmium dans le milieu de culture sur la capacité de trois variétés de laitue (Korlaat, Paris Island Cos et Red Salad Bowl) à accumuler certains éléments minéraux essentiels pour le fonctionnement des plantes. Après avoir déterminé la teneur en cadmium accumulé par ces différentes variétés de laitue, nous avons déterminé les teneurs en calcium, élément interférant avec le cadmium au niveau de l'absorption (Boulila Zoghلامي et *al.*, 2006), le potassium, connu pour être affecté par le traitement cadmium (Sandalio et *al.*, 2001 ; Guo et *al.*, 2007 ; Kim *al.*, 2003), ainsi qu'un autre métal lourd essentiel pour la plante, le zinc, connu par sa forte similitude chimique (Palmgren et *al.*, 2008) ainsi que par son co-transport avec le cadmium (Verret et *al.*, 2004).

#### 3.2. Protocole expérimental

Le schéma du protocole expérimental a déjà été présenté (Figure 4.1). Les plantules ont été cultivées en hydroponie. Au 14<sup>e</sup> jour de culture, des traitements par le cadmium ont été effectués (0, 15, 25, 35 et 50  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$ ). Les récoltes ont été faites le 22<sup>e</sup> jour du traitement, soit après 8 jours de traitement. Après dessiccation et extraction à l'acide sulfurique ( $\text{H}_2\text{SO}_4$  1N), la teneur en éléments minéraux ( $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Zn}^{2+}$ ) a été déterminée à l'aide d'un spectrophotomètre à absorption atomique (SpectrAA 220 Varian).

### 3.3. Résultats

#### 3.3.1. Analyse de l'accumulation de cadmium

Cultivées en présence de 15  $\mu\text{M}$  de cadmium, les trois variétés de laitue étudiées ont montré une différence déjà connue en termes de teneur en cadmium dans les parties aériennes. Lorsque la concentration de  $\text{CdCl}_2$  dans le milieu de culture était augmentée de 15 à 50  $\mu\text{M}$  la teneur en cadmium dans les feuilles augmente de façon linéaire. Pour les variétés Paris Island Cos et Red Salad Bowl, la teneur en cadmium dans les feuilles augmente d'environ un facteur 3 quand la concentration de cadmium dans le milieu de culture passe de 15 à 50  $\mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$ . En revanche, pour la variété Kordaat, la teneur en cadmium dans les feuilles augmente d'environ un facteur 2 (Figure 4.8).

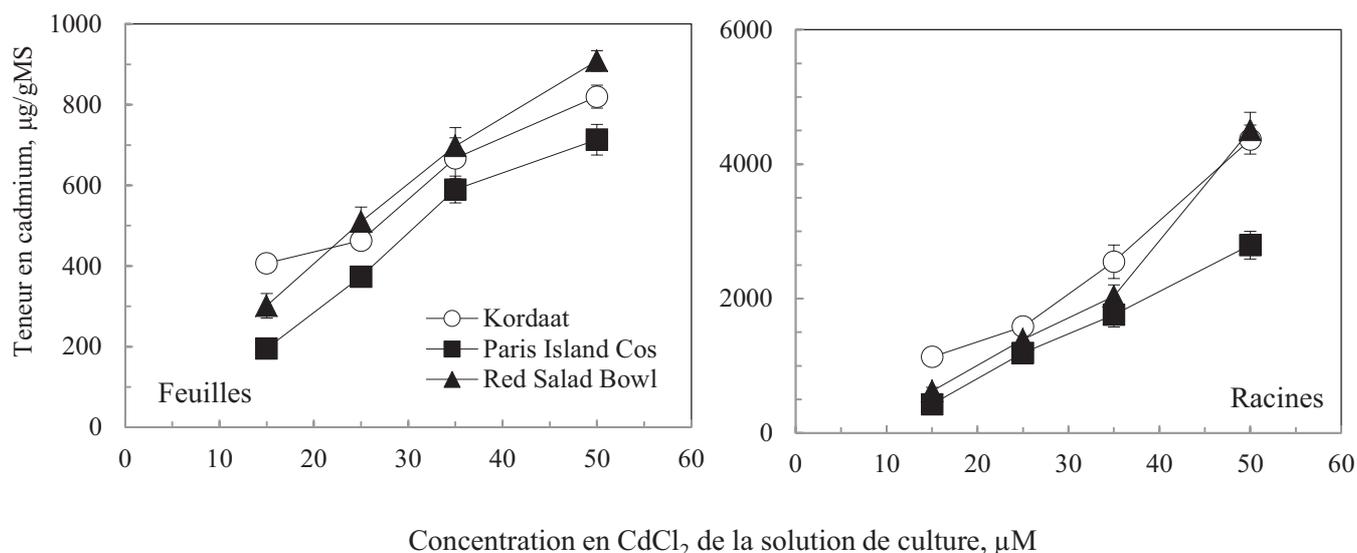
Les trois variétés présentent des comportements différents pour l'accumulation du cadmium dans les feuilles. La variété Paris Island Cos est la variété la moins accumulatrice de cadmium quelle que soit la concentration du cadmium dans le milieu de culture (Figure 4.8). Par contraste, les variétés Kordaat et Red Salad Bowl accumulent plus de cadmium.

Dans les racines, les trois variétés montrent une augmentation pratiquement linéaire des teneurs en cadmium (Figure 4.8). Quand la concentration de  $\text{CdCl}_2$  dans le milieu de culture passe de 15 à 50  $\mu\text{M}$ , l'augmentation est d'environ un facteur 4 pour la variété Kordaat, d'un facteur 6 pour la variété Paris Island Cos et d'un facteur 7 pour la variété Red Salad Bowl.

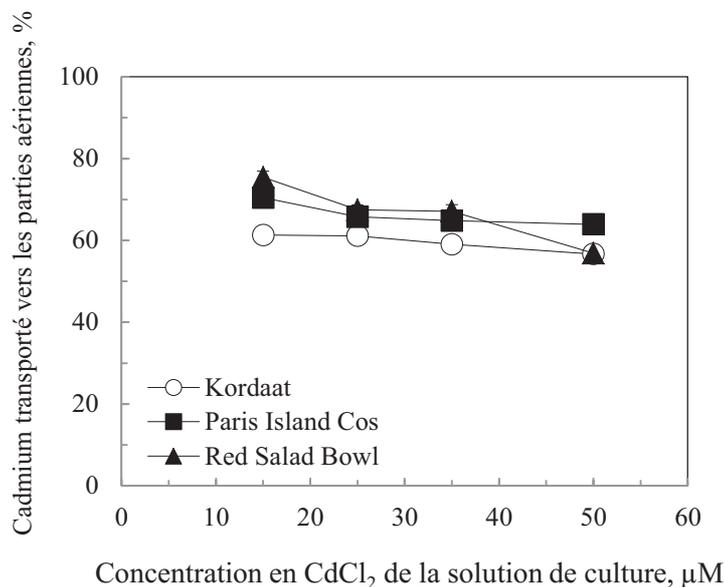
Les résultats obtenus concernant les mesures de teneurs en cadmium des racines sont similaires à ceux qui ont été décrits pour les teneurs foliaires. La variété Kordaat est la variété la plus accumulatrice de cadmium et la variété Paris Island Cos est la variété la moins accumulatrice de cadmium quelle que soit la concentration du cadmium dans le milieu de culture.

#### 3.3.2. Analyse de la translocation de cadmium des racines vers les parties aériennes

Nous avons analysé la translocation du cadmium des racines vers les parties aériennes chez les trois variétés de laitue, en réponse à l'accroissement des concentrations en cadmium dans le milieu (Figure 4.9).



**Figure 4.8.** Accumulation de cadmium dans les parties aériennes et les racines pour les variétés de laitue Paris Island Cos, Kordaat et Red Salad Bowl, en fonction de la concentration en CdCl<sub>2</sub> dans le milieu. Des plantes âgées de 14 jours ont été exposées à différentes concentrations de CdCl<sub>2</sub> durant les 8 derniers jours de culture. Les prélèvements ont été effectués plante par plante. Les valeurs sont des moyennes de 8 répétitions. Les barres d'erreur correspondent aux erreurs standards.



**Figure 4.9.** Variation de la capacité de translocation du cadmium des racines vers les parties aériennes pour les variétés Kordaat, Paris Island Cos et Red Salad Bowl en fonction de la concentration en CdCl<sub>2</sub> dans le milieu. La capacité de translocation de cadmium des racines vers les parties aériennes est évaluée d'après la quantité de cadmium qui se trouve dans les parties aériennes rapportée à la quantité totale de cadmium absorbé par la plante. Des plantes âgées de 14 jours ont été exposées à différentes concentrations de CdCl<sub>2</sub> durant les 8 derniers jours de culture. Les prélèvements ont été effectués plante par plante. Les valeurs sont des moyennes de 8 répétitions. Les barres d'erreur correspondent aux erreurs standards.

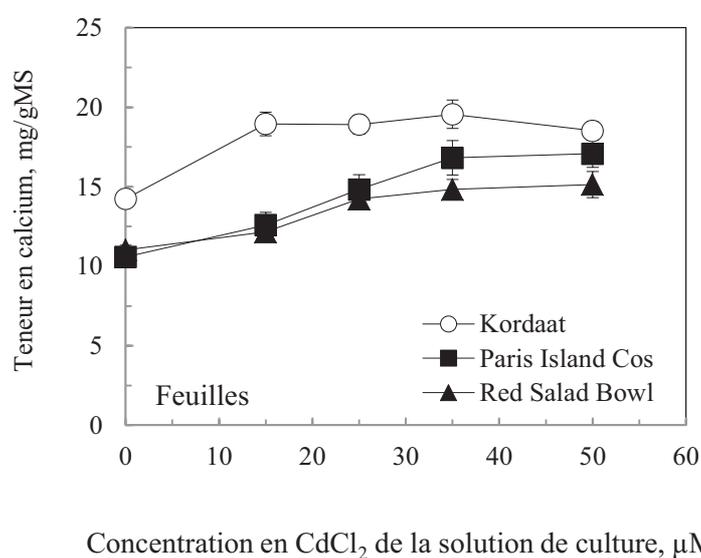
La translocation de cadmium des racines vers les parties aériennes est évaluée en exprimant la quantité de cadmium qui se trouve dans les parties aériennes par rapport à la quantité totale de cadmium absorbé par la plante. Quelle que soit la concentration du cadmium dans le milieu de culture, la variété Kordaat présente la translocation de cadmium des racines vers la partie aérienne la plus faible: en présence de 15 $\mu$ M de CdCl<sub>2</sub> dans le milieu, 61% du cadmium absorbé par les plantes est présent dans les parties aériennes. Par contraste, la variété Red Salad Bowl présente la translocation du cadmium des racines vers les parties aériennes la plus élevée: 75% du cadmium absorbé par les plantes se trouve localisé dans les parties aériennes lorsque les plantes sont cultivées sur un milieu contenant 15  $\mu$ mole par litre de CdCl<sub>2</sub>. Néanmoins, une diminution de la proportion du cadmium présent dans les parties aériennes est observée chez Red Salad Bowl lorsque la concentration de CdCl<sub>2</sub> dans le milieu de culture augmente de 15 à 50  $\mu$ M: lorsque les plantes de la variété Red Salad Bowl étaient cultivées sur un milieu contenant 50  $\mu$ mole par litre de CdCl<sub>2</sub>, la proportion de cadmium présent dans les parties aériennes n'était plus que de 60%, identique à celle observée dans les plantes de la variété Kordaat. La variété Paris Island Cos montre un comportement intermédiaire entre les deux autres variétés. En présence de 15 $\mu$ M de CdCl<sub>2</sub> dans le milieu, 70% du cadmium est présent dans les parties aériennes (Figure 4.9). Cette valeur reste relativement stable quelle que soit la concentration en cadmium dans le milieu de culture.

### 3.3.3. Analyse de l'accumulation du calcium

Plusieurs études ont montré un effet de synergie entre le cadmium et le calcium. De même, un effet protecteur du calcium vis-à-vis du cadmium a été à plusieurs reprises documenté (voir chapitre I: synthèse bibliographique). Il nous a paru donc intéressant d'analyser l'effet du cadmium sur l'accumulation du calcium dans le cadre de la caractérisation physiologique de nos lignées extrêmes pour les caractères d'accumulation de cadmium et de translocation du cadmium des racines vers les parties aériennes.

Les mesures des teneurs en calcium n'ont été effectuées que pour les parties aériennes. En effet, les racines ont été rincées dans une solution de CaCl<sub>2</sub> lors de la récolte, et ce, pour éliminer le cadmium non absorbé par la plante.

La figure 4.10 représente la variation des teneurs en calcium dans les feuilles des trois variétés analysées en fonction des concentrations de cadmium dans le milieu.



**Figure 4.10.** Accumulation de calcium dans les parties aériennes pour les variétés de laitue Paris Island Cos, Kordaat et Red Salad Bowl, en fonction de la concentration en CdCl<sub>2</sub> dans le milieu. Des plantes âgées de 14 jours ont été exposées à différentes concentrations de CdCl<sub>2</sub> durant les 8 derniers jours de culture. Les prélèvements ont été effectués plante par plante. Les valeurs sont des moyennes de 8 répétitions. Les barres d'erreur correspondent aux erreurs standards.

La teneur en calcium dans les feuilles de la variété Kordaat augmente de 33% lorsque la concentration de  $\text{CdCl}_2$  dans le milieu de culture passe de 0 à 15  $\mu\text{M}$  puis elle demeure stable. Par contre, pour les variétés Paris Island Cos et Red Salad Bowl, les teneurs en calcium dans les feuilles augmentent d'une manière quasi linéaire avec l'augmentation de la concentration en cadmium dans le milieu.

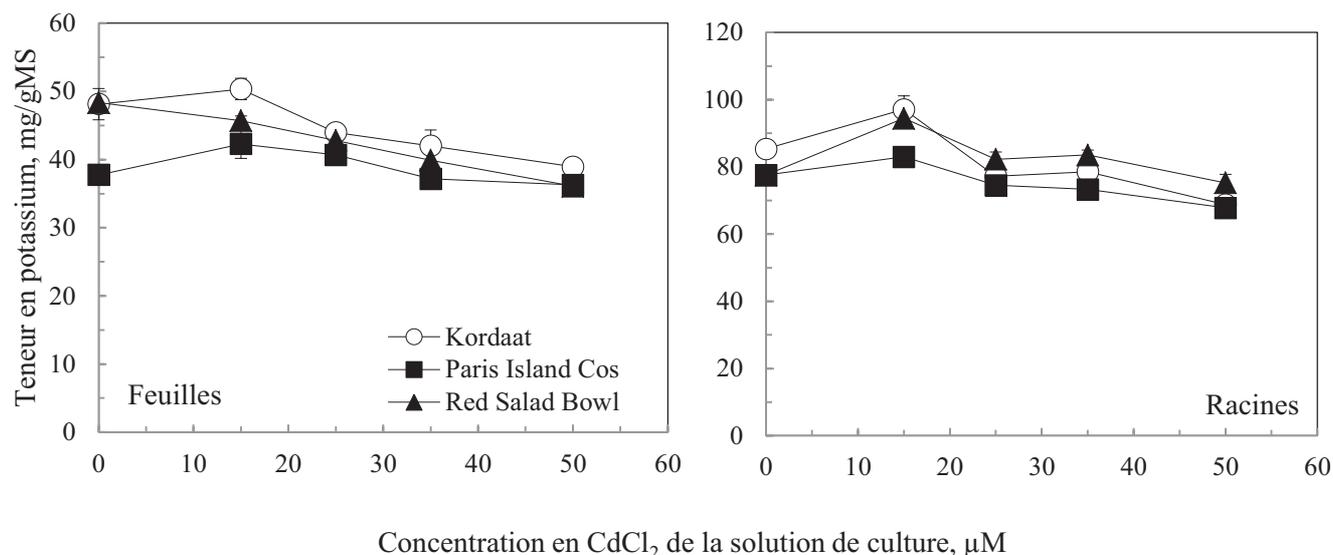
La variété Kordaat est la variété la plus accumulatrice de calcium, au niveau foliaire, quelle que soit la concentration du cadmium dans le milieu de culture y compris dans les plantes témoins non soumises à un traitement par le cadmium (Figure 4.10). Par contraste, les variétés Paris Island Cos et Red Salad Bowl accumulent moins de calcium. La variabilité maximale d'accumulation de calcium entre les 3 variétés est aperçue à 15  $\mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$ .

#### **3.3.4. Analyse de l'accumulation et de la translocation de potassium**

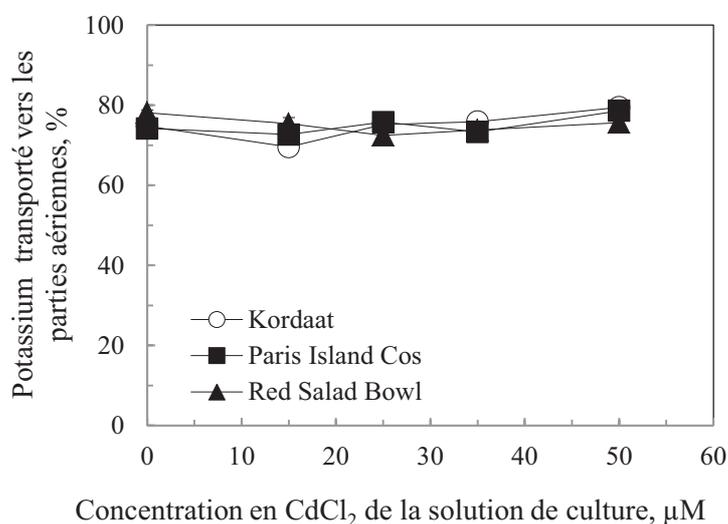
Des perturbations de la nutrition potassique en présence de cadmium ont été rapportées dans plusieurs études (voir chapitre I : synthèse bibliographique). Il nous a paru donc intéressant d'analyser l'effet du cadmium sur l'accumulation du potassium dans le cadre de la caractérisation physiologique des lignées extrêmes du point de vue de l'accumulation de cadmium et de la translocation de cadmium des racines vers les parties aériennes.

Les variations des teneurs en potassium dans les feuilles et les racines des plantes des trois variétés de laitue soumises aux différentes concentrations de cadmium sont représentées sur la figure 4.11.

Pour les deux variétés Kordaat et Paris Island Cos les teneurs foliaires en potassium augmentent légèrement lorsque la concentration de  $\text{CdCl}_2$  dans le milieu passe de 0 à 15  $\mu\text{M}$ , puis elles diminuent globalement au fur et à mesure que la concentration de cadmium augmente encore dans le milieu. En revanche, pour la variété Red Salad Bowl la teneur en potassium dans les feuilles diminue de façon linéaire lorsque la concentration de cadmium augmente dans le milieu de culture.



**Figure 4.11.** Accumulation de potassium dans les parties aériennes et les racines pour les variétés de laitue Paris Island Cos, Kordaat et Red Salad Bowl, en fonction de la concentration en CdCl<sub>2</sub> dans le milieu. Des plantes âgées de 14 jours ont été exposées à différentes concentrations de CdCl<sub>2</sub> durant les 8 derniers jours de culture. Les prélèvements ont été effectués plante par plante. Les valeurs sont des moyennes de 8 répétitions. Les barres d'erreur correspondent aux erreurs standards.



**Figure 4.12.** Variation de la capacité de translocation du potassium des racines vers les parties aériennes pour les variétés de laitue Kordaat, Paris Island Cos et Red Salad Bowl en fonction de la concentration en CdCl<sub>2</sub> dans le milieu. La capacité de translocation de potassium des racines vers les parties aériennes est évaluée d'après la quantité de potassium qui se trouve dans les parties aériennes rapportée à la quantité totale de potassium absorbé par la plante. Des plantes âgées de 14 jours ont été exposées à différentes concentrations de CdCl<sub>2</sub> durant les 8 derniers jours de culture. Les prélèvements ont été effectués plante par plante. Les valeurs sont des moyennes de 8 répétitions. Les barres d'erreur correspondent aux erreurs standards.

À 50  $\mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$  dans le milieu, on enregistre une réduction des teneurs en potassium dans les feuilles de 19%, 4% et 25% pour les variétés Kordaat, Paris Island Cos et Red Salad Bowl, respectivement.

Dans les racines et en absence de cadmium dans le milieu de culture, les teneurs en potassium sont relativement similaires pour les trois variétés. Ces teneurs augmentent légèrement lorsque les plantes des trois variétés sont exposées à 15  $\mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$ . Puis elles diminuent globalement au fur et à mesure que la concentration de cadmium augmente dans le milieu. À 50  $\mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$  dans le milieu, on note une diminution de la teneur en potassium de 12 % chez la variété Paris Island Cos, de 19 % chez la variété Kordaat, et de seulement 3 % chez la variété Red Salad Bowl.

Les trois variétés de laitue montrent un comportement différent pour l'accumulation du potassium aux niveaux foliaire et racinaire. En effet, la variété Paris Island Cos est légèrement moins accumulatrice de potassium, par comparaison aux deux autres variétés, quelle que soit la concentration du cadmium dans le milieu de culture.

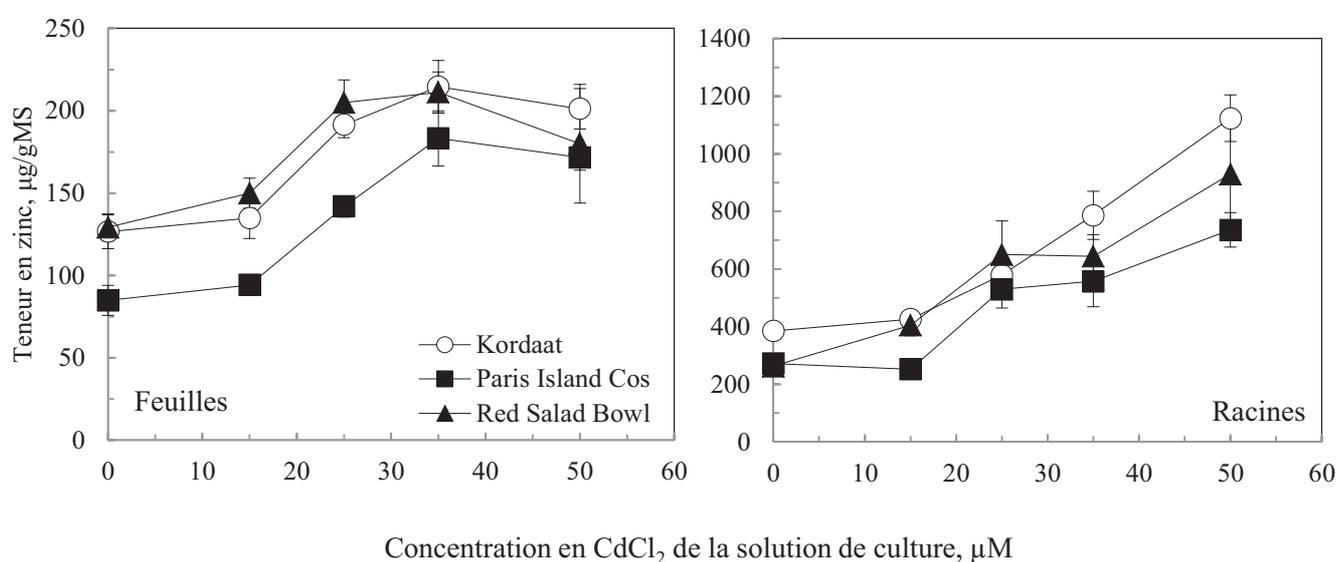
Si on s'intéresse maintenant à la translocation du potassium des racines vers la partie aérienne, on constate que quelle que soit la concentration de cadmium dans le milieu de culture, les trois variétés de laitue montrent peu d'évolution de ce caractère et peu de variabilité entre elles (Figure 4.12).

### 3.3.5. Analyse de l'accumulation de zinc

Vue la grande similitude qui existe entre les cations  $\text{Cd}^{2+}$  et  $\text{Zn}^{2+}$  du point de vue chimique, ces deux derniers peuvent être transportés par les mêmes protéines et ils peuvent interférer aux niveaux de leurs cibles cellulaires. Nous avons donc analysé l'évolution de la teneur en zinc dans les feuilles et les racines pour les trois variétés de laitue considérées en réponse à des concentrations croissantes de cadmium dans le milieu.

Au niveau des feuilles, la teneur en zinc augmente d'un facteur 2 suite à l'augmentation de la concentration de  $\text{CdCl}_2$  de 0 à 35  $\mu\text{M}$  dans le milieu de culture (Figure 4.13). Cette observation peut être faite quelle que soit la variété considérée. À partir de ce seuil, la teneur en zinc se stabilise ou diminue lorsque la concentration en cadmium dans le milieu de culture continue à augmenter.

La variété Paris Island Cos, qui se caractérise par une faible accumulation de cadmium, accumule également moins de zinc que les deux autres variétés, lesquelles présentent des comportements relativement similaires entre elles.



**Figure 4.13.** Accumulation de zinc dans les parties aériennes et les racines pour les variétés de laitue Paris Island Cos, Kordaat et Red Salad Bowl, en fonction de la concentration en CdCl<sub>2</sub> dans le milieu. Des plantes âgées de 14 jours ont été exposées à différentes concentrations de CdCl<sub>2</sub> durant les 8 derniers jours de culture. Les prélèvements ont été effectués plante par plante. Les valeurs sont des moyennes de 8 répétitions. Les barres d'erreur correspondent aux erreurs standards.

Cette caractéristique de la variété Paris Island Cos s'observe aussi dans les conditions témoin pour lesquelles il n'y a pas de cadmium dans le milieu de culture.

Au niveau des racines (Figure 4.13), la teneur en zinc augmente parallèlement avec l'augmentation de la concentration de cadmium dans le milieu, et ce pour les trois variétés de laitue étudiées. À 50  $\mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$ , l'augmentation de la teneur racinaire en zinc, par comparaison aux plantes témoins, est moins marquée chez Paris Island Cos (+170%) que chez Kordaat (+190%) et Red Salad Bowl (+250%).

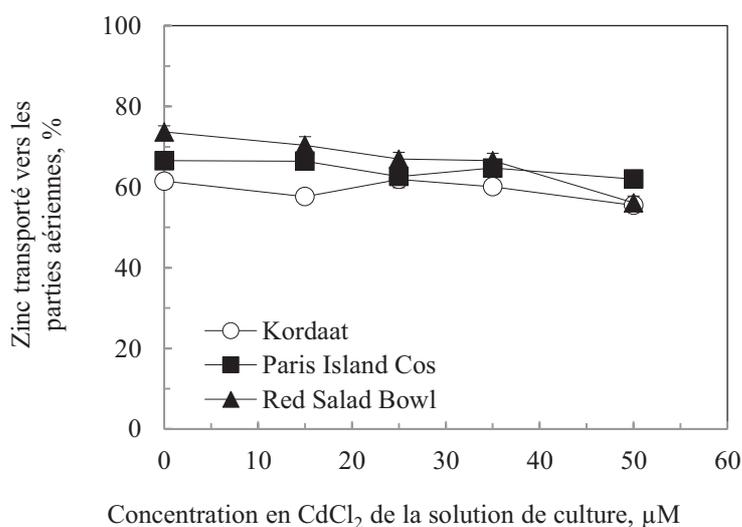
Comme cela a été observé pour les parties aériennes, la variété Paris Island Cos se caractérise par une faible accumulation de zinc dans les racines par comparaison aux deux autres variétés.

### 3.3.6. Analyse de la translocation de zinc des racines vers les parties aériennes

La figure 4.14 représente les variations de la translocation du zinc des racines vers les parties aériennes pour les trois variétés de laitue étudiées, et cela, en présence de concentrations croissantes de cadmium dans le milieu. La variété Red Salad Bowl, qui montre la translocation de cadmium des racines vers les parties aériennes la plus élevée (Figure 4.9), présente également la translocation de zinc des racines vers les parties aériennes la plus élevée (Figure 4.14). Par contraste, la variété Kordaat montre la translocation de cadmium et de zinc la plus faible. Comme cela a été observé à propos de la translocation de cadmium (Figure 4.9), la translocation de zinc chez la variété Red Salad Bowl diminue progressivement quand la concentration de  $\text{CdCl}_2$  dans le milieu augmente de 0 à 50  $\mu\text{M}$  (Figure 4.14). La variété Paris Island Cos présente un comportement intermédiaire entre les deux variétés sauf à 50  $\mu\text{M}$ , où elle présente la translocation de zinc des racines vers les parties aériennes la plus élevée.

## 3.4. Discussion

Aucune fonction biologique n'est connue pour le cadmium (Pokorny et al., 2004). Cependant, cet élément est absorbé et accumulé par les plantes. L'accumulation du cadmium provoque une profonde perturbation de la croissance et du développement des plantes, ce qui se manifeste par des signes de toxicité (Clemens, 2006 ; DalCorso et al., 2008). Ces effets pourraient être liés, entre autres, à une altération de l'absorption et de la distribution des éléments minéraux indispensables pour le fonctionnement de la plante (DalCorso et al., 2008).



**Figure 4.14.** Variation de la capacité de translocation du zinc des racines vers les parties aériennes pour les variétés de laitue Kordaat, Paris Island Cos et Red Salad Bowl en fonction de la concentration en cadmium dans le milieu. La capacité de translocation de zinc des racines vers les parties aériennes est évaluée d'après la quantité de zinc qui se trouve dans les parties aériennes rapportée à la quantité totale de zinc absorbé par la plante. Des plantes âgées de 14 jours ont été exposées à différentes concentrations de CdCl<sub>2</sub> durant les 8 derniers jours de culture. Les prélèvements ont été effectués plante par plante. Les valeurs sont des moyennes de 8 répétitions. Les barres d'erreur correspondent aux erreurs standards.

Dans cette partie du travail, nous avons analysé les teneurs en cadmium, en calcium, en potassium et en zinc dans les feuilles et les racines de nos trois variétés de laitue exposées à différentes concentrations de cadmium. Nous avons également analysé la capacité de chacune de ces trois variétés à transférer ces éléments des racines vers les feuilles.

Nos résultats montrent que la teneur en cadmium chez les trois variétés de laitue étudiées est plus importante dans les racines que dans les parties aériennes. Comme cela a été mentionné, ce résultat est en accord avec les résultats obtenus chez la laitue par Costa et Morel (1994b). Du point de vue quantitatif, la quantité la plus élevée de cadmium a été enregistrée au niveau des parties aériennes. Il faut signaler que ces différences entre la teneur et la quantité de cadmium au niveau des différents organes de la laitue sont en relation avec les différences de biomasse des parties aériennes et racinaires de cette plante. En outre, nos résultats montrent que, quelle que soit la concentration de cadmium appliquée dans le milieu, la variété Paris Island Cos présente les teneurs en cadmium les plus faibles aussi bien dans les racines que dans les feuilles, par comparaison aux deux autres variétés Kordaat et Red Salad Bowl.

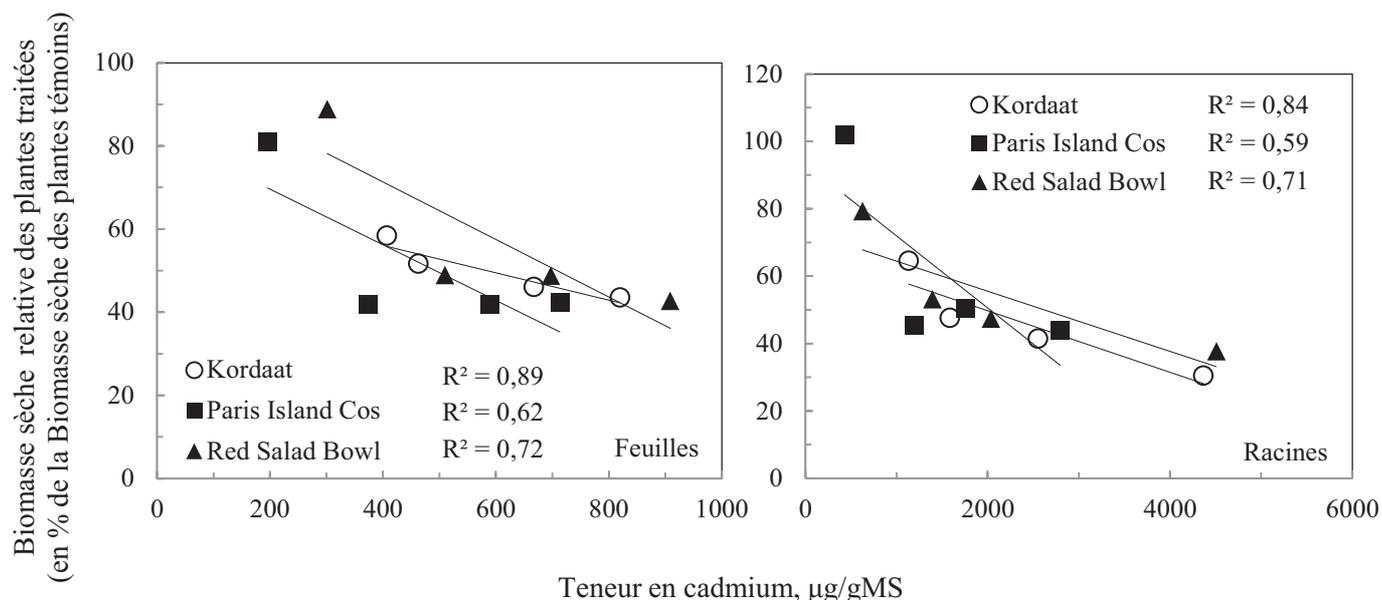
Le comportement de la variété Paris Island Cos pourrait s'expliquer par la mise en place d'un ou de plusieurs mécanismes permettant de limiter l'absorption par la racine, de réduire le transfert vers la partie aérienne, ou de favoriser l'efflux de cadmium en dehors du cytoplasme.

Comme cela a été détaillé dans la synthèse bibliographique, le transport du cadmium vers les feuilles se fait *via* la sève brute. Suite à l'absorption du cadmium par les racines, trois processus contrôlent le transport du cadmium des cellules racinaires vers le xylème: la séquestration des métaux à l'intérieur des cellules racinaires, le transport symplasmique vers la stèle et la charge du cadmium dans le xylème (Clemens et *al.*, 2002a). Ces phénomènes semblent être étroitement liés au processus de transpiration (Hardiman et Jacoby, 1984). La capacité de translocation du cadmium des racines vers la partie aérienne peut varier entre les variétés de la même espèce (Costa et Morel, 1994a ; Costa et Morel, 1994b). Ceci est en accord avec nos résultats, où nous n'avons pas observé de différence entre les trois variétés de laitue étudiées concernant la translocation du cadmium des racines vers les parties aériennes (Figure 4.9). En effet, certains transporteurs tel HMA4 peuvent transporter plusieurs cations différents ( $\text{Cd}^{2+}$  et  $\text{Zn}^{2+}$  dans le cas de HMA4) (Verret et *al.*, 2004 ; Hanikenne et *al.*, 2008).

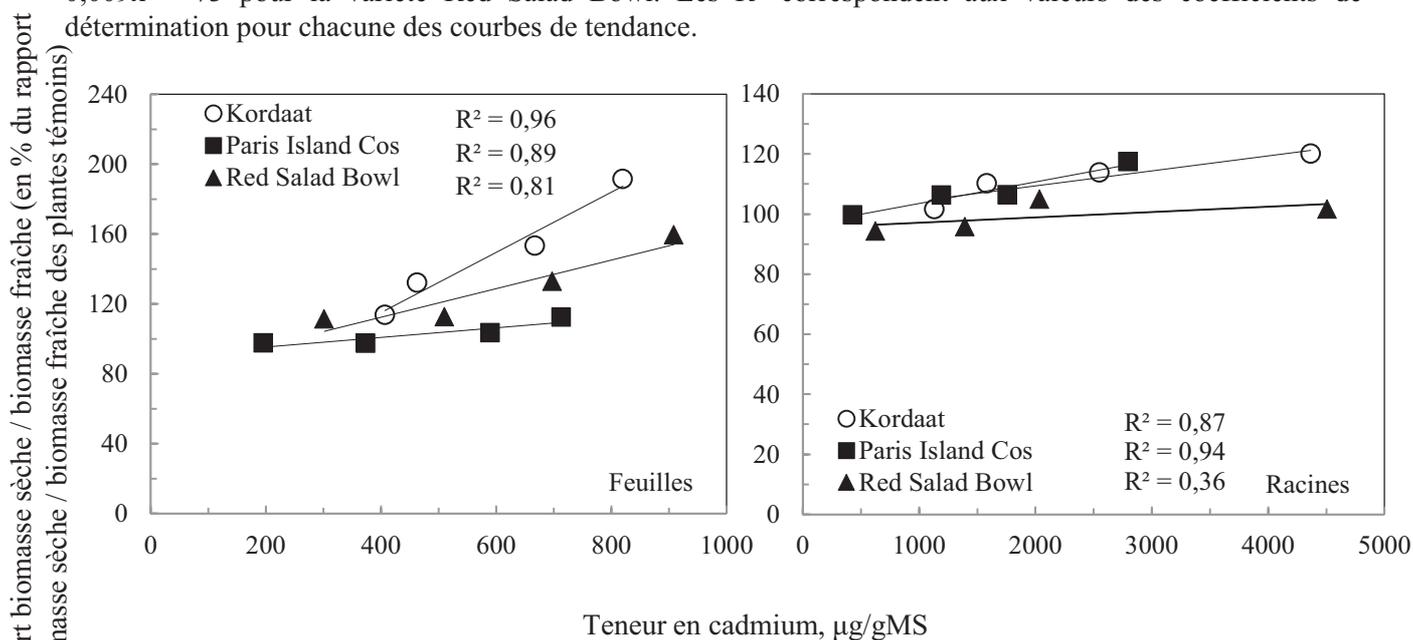
Ainsi, des mutations ou des variations de l'expression de tels transporteurs selon les variétés considérées peuvent être à la base des différences au niveau de la translocation chez ces variétés. Nous savons aussi que les phytochélatines (PC) peuvent jouer un rôle important dans le transport à longue distance du cadmium (Clemens., 2006; Mendoza-Cózatl et al., 2008). En effet, chez la plante modèle *A. thaliana*, le complexe phytochélatines-cadmium (PCs-Cd) est trouvé dans le xylème mais aussi dans le phloème, indiquant que les phytochélatines jouent un rôle important dans le transport à longue distance du cadmium, des racines vers les parties aériennes de la plante et inversement (Chen et al., 2007 ; Gong et al., 2003 ; Mendoza-Cózatl et al., 2008). Une différence intervariétale du niveau de translocation de cadmium entre les variétés pourrait donc s'expliquer également par une plus ou moins forte présence de phytochélatines dans les tissus des plantes des différentes variétés.

Nos résultats indiquent aussi que l'augmentation de la concentration de cadmium dans le milieu extérieur provoque une variation de la quantité de cadmium transportée des racines vers les parties aériennes surtout chez la variété Red Salad Bowl. Des résultats similaires ont été obtenus chez le haricot (Hardiman et Jacoby, 1984). Les perturbations de la translocation du cadmium pourraient être dues à une compétition au niveau des transporteurs entre le cadmium et d'autres éléments minéraux présentant une similitude structurale avec lui.

Suite aux données que nous avons obtenues, la question se pose de savoir s'il y a un lien entre la tolérance au cadmium et l'accumulation de cadmium. L'analyse de l'effet du cadmium sur la production de la biomasse et sur le statut hydrique des trois variétés de laitue avait montré que Kordaat est la variété la plus sensible par comparaison aux deux autres variétés. Les données obtenues dans ce chapitre suggèrent que cette sensibilité pourrait être attribuée à une forte accumulation de cadmium. L'analyse comparée des teneurs racinaires et foliaires du cadmium avec les biomasses relatives des racines et des feuilles (Figure 4.15) montre en effet que pour les trois variétés on observe une forte corrélation entre teneur interne en cadmium et tolérance des plantes, et ce, en considérant un modèle de régression linéaire simple. Parmi les trois variétés étudiées, les corrélations les plus fortes ont été observées chez la variété Kordaat, et ce, aussi bien au niveau foliaire (coefficient de corrélation linéaire  $R = 0,93$  ; coefficient de détermination  $R^2 = 0,88$ ) qu'au niveau racinaire (coefficient de corrélation linéaire  $R = 0,91$  ; coefficient de détermination  $R^2 = 0,83$ ).



**Figure 4.15.** Relation entre teneur en cadmium et biomasse sèche relative des parties aériennes et des racines pour les variétés de laitue Paris Island Cos, Kordaat et Red Salad Bowl. La biomasse sèche relative est calculée à partir des masses de matière sèche et elle est exprimée en pourcentage de la biomasse sèche des plantes témoins. Des plantes âgées de 14 jours ont été exposées à différentes concentrations de CdCl<sub>2</sub> durant les 8 derniers jours de culture. Les prélèvements ont été effectués plante par plante. Les valeurs sont des moyennes de 8 répétitions. Les courbes de tendance correspondent à des régressions du type linéaire. Pour les feuilles, les équations des courbes sont  $y = -0,03x + 69$  pour la variété Kordaat,  $y = -0,07x + 83$  pour la variété Paris Island Cos et  $y = -0,07x + 99$  pour la variété Red Salad Bowl. Pour les racines, les équations des courbes sont  $y = -0,009x + 68$  pour la variété Kordaat,  $y = -0,02x + 93$  pour la variété Paris Island Cos et  $y = -0,009x + 73$  pour la variété Red Salad Bowl. Les R<sup>2</sup> correspondent aux valeurs des coefficients de détermination pour chacune des courbes de tendance.



**Figure 4.16.** Relation entre teneur en cadmium et rapport entre masse sèche et masse fraîche des parties aériennes et des racines pour les variétés de laitue Paris Island Cos, Kordaat et Red Salad Bowl. Le rapport masse sèche/masse fraîche est exprimé en pourcentage du même rapport déterminé chez les plantes témoins. Des plantes âgées de 14 jours ont été exposées à différentes concentrations de CdCl<sub>2</sub> durant les 8 derniers jours de culture. Les prélèvements ont été effectués plante par plante. Les valeurs sont des moyennes de 8 répétitions. Les courbes de tendance correspondent à des régressions du type linéaire. Pour les feuilles, les équations des courbes sont  $y = 0,17x + 46$  pour la variété Kordaat,  $y = 0,03x + 90$  pour la variété Paris Island Cos et  $y = 0,08x + 79$  pour la variété Red Salad Bowl. Pour les racines, les équations des courbes sont  $y = -0,009x + 68$  pour la variété Kordaat,  $y = 0,005x + 99$  pour la variété Paris Island Cos et  $y = 0,002x + 95$  pour la variété Red Salad Bowl. Les R<sup>2</sup> correspondent aux valeurs des coefficients de détermination pour chacune des courbes de tendance.

Ceci veut dire que dans les racines, le modèle linéaire liant teneur en cadmium et biomasse relative explique 88% de la variation observée, alors que dans les feuilles, ce modèle explique 83% de la variation observée. Rappelons cependant que l'existence de cette corrélation ne signifie en aucun cas qu'il y a une dépendance génétique entre les deux caractères (voir chapitre III).

Si on s'intéresse maintenant au rapport MS/MF et à la teneur en cadmium des parties aériennes et des racines des plantes traitées des trois variétés de laitue (Figure 4.16), on observe une très forte corrélation entre la teneur interne en cadmium et le statut hydrique de la plante. Au niveau foliaire, et en considérant un modèle de régression linéaire simple, la corrélation la plus forte a été observée chez la variété la plus sensible, Kordaat (coefficient de corrélation linéaire  $R = 0,97$  ; coefficient de détermination  $R^2 = 0,94$ ), ce qui suggère que la faible hydratation des parties aériennes chez cette variété pourrait être liée entre autres à une forte accumulation du cadmium.

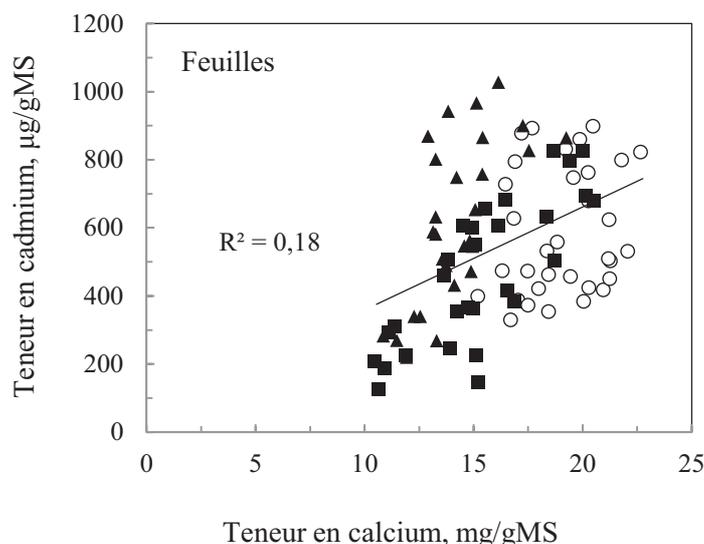
Dans le cadre de notre étude, nous avons analysé l'effet de traitements par des concentrations croissantes de cadmium dans le milieu de culture sur la capacité de trois variétés de laitue (Kordaat, Paris Island Cos et Red Salad Bowl) à accumuler certains éléments minéraux essentiels pour le fonctionnement des plantes qui sont le calcium, le potassium et le zinc.

Au niveau foliaire, les évaluations des teneurs en ions  $Ca^{2+}$  et  $Zn^{2+}$  en réponse à l'augmentation de la concentration de cadmium dans le milieu de culture s'avèrent similaires pour ces deux ions chez les trois variétés de laitue. Deux phases peuvent être observées: à des faibles concentrations de cadmium dans le milieu les teneurs en  $Ca^{2+}$  et en  $Zn^{2+}$  augmentent. Puis, quand la concentration en cadmium augmente encore dans le milieu de culture (à partir de  $35 \mu M$  de  $CdCl_2$ ) les teneurs en  $Ca^{2+}$  et en  $Zn^{2+}$  se stabilisent ou bien diminuent. Au niveau racinaire, l'augmentation des concentrations de cadmium dans le milieu de culture provoque une augmentation continue des teneurs en zinc.

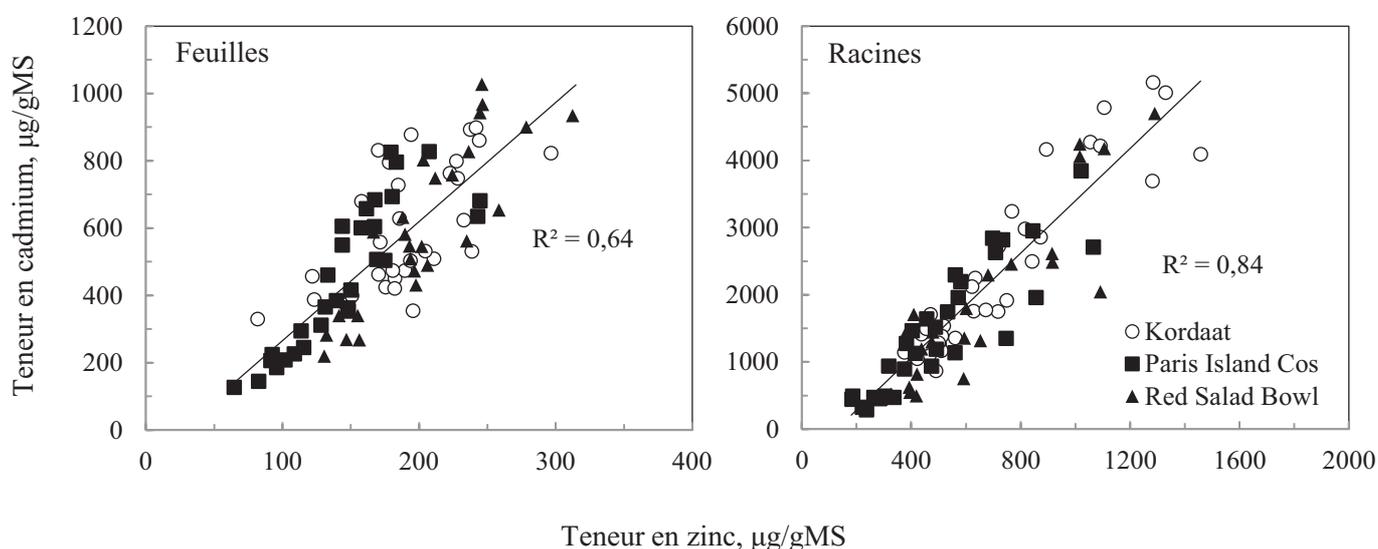
Plusieurs études ont montré que le cadmium induit une augmentation des teneurs en calcium chez les plantes (Greger et al., 1991 ; Larbi et al., 2002 ; Ghnaya et al., 2005). Cette réaction des plantes pourrait être expliquée par le rôle protecteur joué par les ions  $Ca^{2+}$  aux niveaux des structures cellulaires ou du métabolisme (Boulila Zoghalmi et al., 2006). Cependant, pour ce qui est de la laitue, l'analyse de la

corrélation entre teneur en cadmium et teneur en calcium au niveau foliaire montre une corrélation positive très faible (Figure 4.17).

Nos analyses ont montré que l'absorption du zinc par les plantes de laitue était augmentée en réponse à la présence de cadmium dans le milieu de culture. Cette observation a pu être faite pour les 3 variétés de laitue étudiées. L'induction de l'absorption du zinc en réponse au cadmium a été déjà décrite chez différentes espèces végétales, telle que la tomate (Turner, 1973) ou bien le maïs (Girling et Peterson, 1981) et même chez la laitue (Turner, 1973; Thys et al., 1991). Nous avons en outre observé une corrélation positive importante entre teneur en zinc et teneur en cadmium chez les trois variétés de laitue, aussi bien au niveau foliaire (coefficient de corrélation linéaire  $R = 0,8$  ; coefficient de détermination  $R^2 = 0,64$ ) qu'au niveau racinaire (coefficient de corrélation linéaire  $R = 0,91$  ; coefficient de détermination  $R^2 = 0,84$ ) (Figure 4.18). Ces résultats permettent de penser que le transport du cadmium dans la plante et celui du zinc sont deux phénomènes très liés. Une hypothèse peut être élaborée pour expliquer cette induction de l'absorption du zinc en réponse à l'augmentation de la concentration en cadmium dans le milieu de culture ainsi que la corrélation observée entre l'accumulation des deux métaux: il se pourrait que dans nos conditions, des transporteurs de zinc non spécifiques, qui peuvent également accepter  $Cd^{2+}$  comme substrat, soient surexprimés. De ce point de vue, la concentration en fer dans la solution de culture peut être d'une grande importance. En effet, Thys et al. (1991) ont montré qu'une induction de l'absorption du zinc en réponse au cadmium n'est visible que dans des conditions de déficience ferrique. De même, Cohen et al., (1998) ont montré que les plantules de pois montrent un influx racinaire de cadmium sept fois plus élevé dans des conditions de déficience ferrique. Chez *A. thaliana*, la protéine IRT1 joue un rôle important dans le transport du fer à haute affinité (Korshunova et al., 1999; Connolly et al., 2002) mais la surexpression d'*IRT1* améliore aussi l'absorption des ions métalliques tels que  $Zn^{2+}$  et  $Cd^{2+}$ . IRT1 n'est pas le seul transporteur qui est impliqué dans le transport du zinc et de cadmium. À titre d'exemple, le transporteur tonoplastique NRAMP4 joue aussi un rôle dans la régulation des contenus en zinc et en cadmium dans les cellules végétales (Thomine et al., 2000, Oomen et al., 2009). Ces deux transporteurs, IRT1 et NRAMP4, sont régulés positivement dans des conditions de déficience ferrique (Connolly et al., 2002; Thomine et al., 2000).



**Figure 4.17.** Relation entre les valeurs individuelles des teneurs en cadmium et en calcium dans les feuilles pour les trois variétés de laitue (Kordaat, Paris Island Cos et Red Salad bowl). Des plantes âgées de 14 jours ont été exposées durant les 8 derniers jours de culture à l'une ou l'autre des concentrations de  $\text{CdCl}_2$  suivantes: 15, 25, 35 ou 50  $\mu\text{M}$ . Les prélèvements ont été effectués plante par plante. Chaque point représente la mesure effectuée pour une plante. Les courbes de tendance correspondent à des régressions du type linéaire. L'équation de la courbe est la suivante:  $y = 0,03x + 64$ . La valeur  $R^2$  correspond au coefficient de détermination. Des corrélations similaires ont été obtenues en étudiant les variétés une par une.

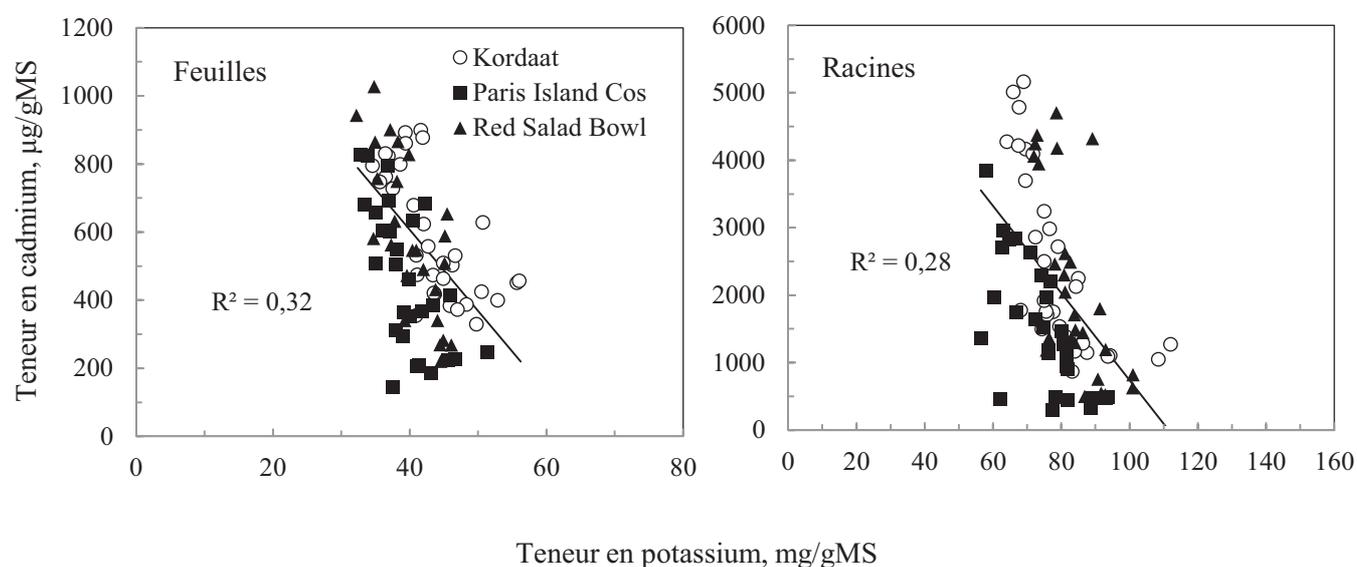


**Figure 4.18.** Relation entre les valeurs individuelles des teneurs en cadmium et en zinc dans les feuilles et les racines pour les trois variétés de laitue (Kordaat, Paris Island Cos et Red Salad bowl). Des plantes âgées de 14 jours ont été exposées durant les 8 derniers jours de culture à l'une ou l'autre des concentrations de  $\text{CdCl}_2$  suivantes: 15, 25, 35 ou 50  $\mu\text{M}$ . Les prélèvements ont été effectués plante par plante. Chaque point représente la mesure effectuée pour une plante. Les courbes de tendance correspondent à des régressions du type linéaire. Les équations des courbes sont  $y = 3,6x - 88$  pour les feuilles et  $y = 3,9x - 529$  pour les racines. Les  $R^2$  correspondent aux valeurs des coefficients de détermination pour chacune des courbes de tendance. Des corrélations similaires ont été obtenues en étudiant les variétés une par une.

Dans ce contexte, la corrélation que nous avons observée entre le cadmium et du zinc pourrait être la conséquence du fait que la présence de cadmium déclenche directement ou indirectement un signal de carence en fer, ou en tous les cas une surexpression de systèmes de transport à la fois du zinc et du cadmium comme IRT1.

En ce qui concerne le potassium, les résultats obtenus montrent globalement un effet dépressif du cadmium sur la teneur en potassium chez les trois variétés. Des perturbations de la nutrition potassique en présence de cadmium ont déjà été évoquées dans plusieurs études. Par exemple, une diminution dramatique des concentrations de potassium a été observée en présence de cadmium chez le lupin blanc (Zornoza et *al.*, 2002), le pois (Sandalio et *al.*, 2001), l'orge (Guo et *al.*, 2007) et le pin sylvestre (Kim *al.*, 2003). Cette diminution peut être expliquée par la fixation du cadmium sur les molécules d'ATP ce qui réduit la disponibilité de l'énergie nécessaire au fonctionnement des systèmes de transport membranaire de potassium (Asp et *al.*, 1994; Astolfi et *al.*, 2005). Cette diminution peut également être attribuée à une diminution du nombre et du diamètre des vaisseaux de xylème en présence de cadmium (Barcelo et *al.*, 1988). Cependant, l'analyse de la corrélation entre teneur en cadmium et teneur en potassium montre une corrélation négative très faible (Figure 4.19).

En conclusion, notre analyse comparée des teneurs racinaires et foliaires en cadmium avec les biomasses relatives des racines et des feuilles a montré une forte corrélation entre teneur interne en cadmium et tolérance des plantes et ce, chez les trois variétés de laitue étudiées. Cette étude a permis de montrer que le cadmium perturbe l'accumulation de trois minéraux essentiels (calcium, potassium et zinc) et ce d'une manière assez similaire chez les 3 variétés de laitue étudiées. Néanmoins, quelques différences entre le comportement des variétés analysées pour l'accumulation des éléments dans leurs tissus peuvent être soulignées. En effet, la variété Kordaat, semble être la plus accumulatrice de cadmium et la plus affectée par le cadmium, ce qui permet d'émettre l'hypothèse que la forte sensibilité au cadmium chez cette variété pourrait être liée entre autres à une forte accumulation du cadmium.



**Figure 4.19.** Relation entre les valeurs individuelles des teneurs en cadmium et en potassium dans les feuilles et les racines pour les trois variétés de laitue (Kordaat, Paris Island Cos et Red Salad bowl). Des plantes âgées de 14 jours ont été exposées durant les 8 derniers jours de culture à l'une ou l'autre des concentrations de  $\text{CdCl}_2$  suivantes: 15, 25, 35 ou 50  $\mu\text{M}$ . Les prélèvements ont été effectués plante par plante. Chaque point représente la mesure effectuée pour une plante. Les courbes de tendance correspondent à des régressions du type linéaire. Les équations des courbes sont  $y = -0,02x + 1559$  pour les feuilles et  $y = -0,07x + 7184$  pour les racines. Les  $R^2$  correspondent aux valeurs des coefficients de détermination pour chacune des courbes de tendance. Des corrélations similaires ont été obtenues en étudiant les variétés une par une.

De même, quelle que soit la concentration du cadmium dans le milieu, la variété Paris Island Cos est la variété qui accumule le moins de cadmium, de zinc, de potassium, voire de calcium dans ses feuilles et ses racines par comparaison aux variétés Kordaat et Red Salad Bowl. Il n'est pas facile d'expliquer cette caractéristique de la variété Paris Island Cos. En effet, les ions  $Zn^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  et  $K^+$  sont absorbés par des voies très différentes et ils sont accumulés dans des compartiments subcellulaires différents. Peut-être faudrait-il s'intéresser à la capacité d'échange cationique des parois qui pourrait apporter une contribution relativement peu spécifique à l'accumulation de ces différents ions.

Enfin, notre étude a permis d'émettre l'hypothèse qu'il existe un ou plusieurs mécanisme(s) de transport associant très fortement cadmium et zinc et que ce(s) mécanisme(s) est induit en réponse à l'augmentation des concentrations de cadmium dans le milieu de culture.

#### **4. Effets du cadmium sur l'accumulation des anions majeurs**

##### **4.1. Introduction**

Afin de caractériser physiologiquement nos lignées extrêmes du point de vue de l'accumulation de cadmium et de la translocation de cadmium des racines vers les parties aériennes, et de trouver d'éventuelles explications sur l'origine de la variabilité intervariétale observée pour ces caractères, une autre expérience a été réalisée. Cette expérience a permis d'étudier l'effet d'un traitement par du cadmium ( $15 \mu M CdCl_2$ ) sur l'accumulation des anions majeurs (chlorure, nitrate, phosphate, sulfate, malate et citrate) chez nos trois variétés de laitue (Paris Island Cos, Kordaat et Red Salad Bowl).

##### **4.2. Protocole expérimental**

Les plantes ont été cultivées en hydroponie (voir chapitre II: matériels et méthodes). Des plantes âgées de 14 jours ont été exposées à une seule concentration de cadmium ( $15 \mu M$  de  $CdCl_2$ ). Des plantes cultivées en absence de cadmium ont été utilisées comme témoin. La quantification des anions majeurs a été effectuée par HPIC (High-Performance Ionic Chromatography) après détermination de la masse de matière fraîche et extraction des anions dans de l'eau Milli-Q par incubation des tissus à  $70^\circ C$  durant 30 min (voir chapitre II: matériels et méthodes).

### 4.3. Résultats

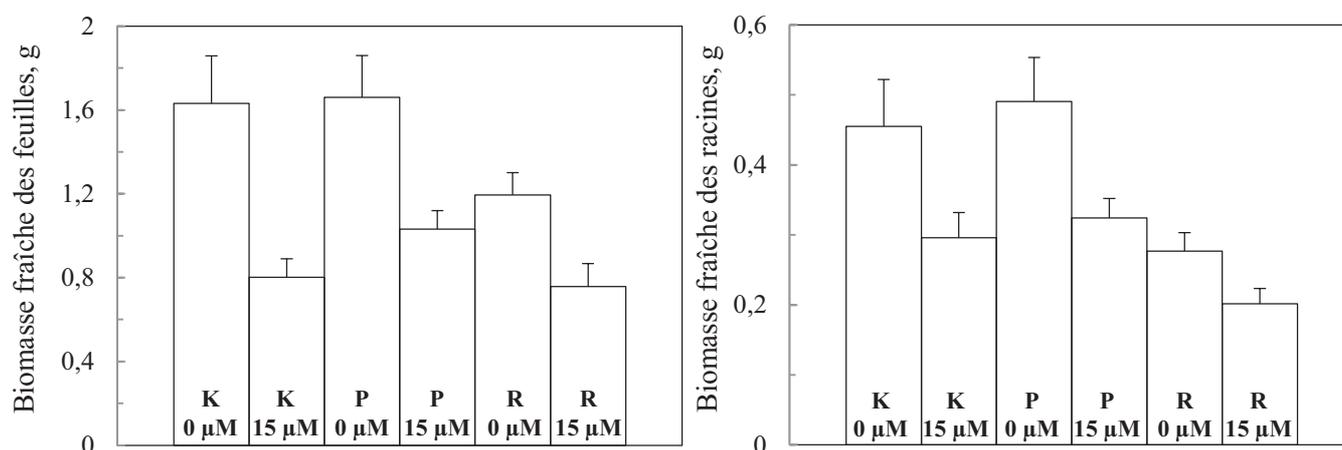
En présence de 15  $\mu\text{M}$  de cadmium, les plantes des trois variétés de laitue ont montré un comportement déjà identifié à savoir une diminution de la production de la biomasse. Cet effet dépressif du cadmium sur la production de la biomasse des plantes affecte aussi bien les racines que les parties aériennes, mais il a un effet légèrement plus marqué sur les parties aériennes que sur les racines (Figure 4.20).

Les teneurs en anions majeurs diffèrent considérablement entre les racines et les parties aériennes (Tableau 4.1). Ce phénomène s'observe déjà en absence de traitement par le cadmium. Par exemple, les teneurs en sulfate sont au moins deux fois plus élevées dans les racines que dans les parties aériennes. A l'inverse, les teneurs en chlorure, malate et citrate sont plus élevées dans les parties aériennes que dans les racines. Cette différence d'accumulation entre organes est d'au moins un facteur 2 pour le chlorure et le citrate, et d'au moins un facteur 4 pour le malate. Concernant les autres anions (nitrate et phosphate) l'accumulation est globalement similaire entre les racines et les parties aériennes (Tableau 4.1).

Dans les conditions contrôle, les trois variétés de laitue présentent des comportements pratiquement similaires pour l'accumulation des anions majeurs, sauf pour le sulfate et le chlorure au niveau racinaire (Tableau 4.1 ; Tableau 4.2).

L'application de 15  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  provoque de grands changements dans les teneurs en chlorure et en citrate, et des changements moins significatifs dans les teneurs en sulfate et en malate (Tableau 4.3). Les changements de teneur en chlorure étaient attendus puisque en l'absence de  $\text{CdCl}_2$  dans le milieu, seules des traces de chlorure (0,044  $\mu\text{M}$ ) étaient présentes dans le milieu de culture. L'ajout de 15  $\mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$  a donc apporté une augmentation de près d'un facteur 1000 de la concentration en chlorure dans le milieu.

En présence de 15  $\mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$  dans la solution de culture, la teneur en sulfate a augmenté dans les racines tandis que la teneur en malate a diminué dans les feuilles (Tableau 4.1), ces changements ont été observés pour toutes les variétés. Si on compare les trois variétés, le seul effet différentiel causé sur les teneurs en anions par la présence de cadmium dans le milieu de culture concerne la teneur en citrate (Tableau 4.3). Les plantes de la variété Kordaat n'ont montré aucun changement de leur teneur en citrate en réponse au traitement par le cadmium, tandis que les plantes de la variété Red Salad Bowl ont montré à la fois une diminution de la teneur en citrate dans les racines et une augmentation de la teneur en citrate dans les feuilles.



**Figure 4.20.** Biomasse fraîche (exprimées en g) des parties aériennes et des racines des plantes des variétés de laitue Paris Island Cos (P), Kordaat (K) et Red Salad Bowl (R) cultivées en absence (0  $\mu\text{M}$ ) ou en présence de 15  $\mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$  (15  $\mu\text{M}$ ). Les prélèvements ont été effectués, plante par plante, après 8 jours de traitement. Les valeurs sont des moyennes de 8 répétitions. Les barres d'erreur correspondent aux erreurs standards.

**Tableau 4.1.** Teneurs en anions majeurs (exprimées en  $\mu\text{mol} / \text{g}$  de masse fraîche) des parties aériennes (A) et des racines (B) des plantes des variétés de laitue Paris Island Cos, Kordaat et Red Salad Bowl cultivées en absence ou en présence de 15  $\mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$ . Les prélèvements ont été effectués, plante par plante, après 8 jours de traitement. Les valeurs sont des moyennes de 8 répétitions. Les valeurs qui suivent les valeurs d'accumulation correspondent aux erreurs standards. Les valeurs suivies par la même lettre, dans chaque ligne ne sont pas significativement différentes au seuil de 0,05 (comparaisons multiples des moyennes (Test de Tukey)).

#### A. Feuilles

	Kordaat		Paris Island Cos		Red Salad Bowl	
	$\text{CdCl}_2$ ( $\mu\text{M}$ )		$\text{CdCl}_2$ ( $\mu\text{M}$ )		$\text{CdCl}_2$ ( $\mu\text{M}$ )	
	0	15	0	15	0	15
Chlorure	1,1 $\pm$ 0,1 a	7,5 $\pm$ 0,2 b	1,9 $\pm$ 0,1 ca	10,3 $\pm$ 0,4 d	2,5 $\pm$ 0,1 c	14,1 $\pm$ 0,4 e
Nitrate	39,3 $\pm$ 3,9 a	30,2 $\pm$ 1,3 ab	24,9 $\pm$ 3,5 ab	22,5 $\pm$ 1,3 b	29,1 $\pm$ 2,3 ab	30,9 $\pm$ 2,2 a
Sulfate	2,1 $\pm$ 0,2 a	1,7 $\pm$ 0,05 a	1,8 $\pm$ 0,2 ab	1,4 $\pm$ 0,1 bc	1,0 $\pm$ 0,05 c	1,3 $\pm$ 0,1 bc
Phosphate	9,0 $\pm$ 0,9 ab	6,5 $\pm$ 0,3 b	11,2 $\pm$ 1,6 a	7,9 $\pm$ 0,7 ab	8,1 $\pm$ 0,6 ab	9,9 $\pm$ 0,5 ab
Malate	32,7 $\pm$ 2,6 ab	27,8 $\pm$ 0,7 a	38,3 $\pm$ 3,8 b	26,9 $\pm$ 1,7 a	30,4 $\pm$ 1,3 ab	29,3 $\pm$ 1,6 ab
Citrate	3,1 $\pm$ 0,1 a	2,9 $\pm$ 0,1 a	2,7 $\pm$ 0,2 a	4,5 $\pm$ 0,2 b	2,6 $\pm$ 0,1 a	4,2 $\pm$ 0,5 b

#### B. Racines

	Kordaat		Paris Island Cos		Red Salad Bowl	
	$\text{CdCl}_2$ ( $\mu\text{M}$ )		$\text{CdCl}_2$ ( $\mu\text{M}$ )		$\text{CdCl}_2$ ( $\mu\text{M}$ )	
	0	15	0	15	0	15
Chlorure	0,4 $\pm$ 0,02 a	2,6 $\pm$ 0,2 b	0,7 $\pm$ 0,1 a	2,6 $\pm$ 0,2 b	0,7 $\pm$ 0,03 a	2,4 $\pm$ 0,2 b
Nitrate	29,6 $\pm$ 2,2 a	28,3 $\pm$ 2,6 a	26,5 $\pm$ 1,6 a	27,3 $\pm$ 1,6 a	28,4 $\pm$ 2,0 a	23,0 $\pm$ 2,2 a
Sulfate	4,6 $\pm$ 0,2 a	6,3 $\pm$ 0,6 b	3,8 $\pm$ 0,4 a	4,7 $\pm$ 0,3 a	3,5 $\pm$ 0,3 a	4,8 $\pm$ 0,5 ab
Phosphate	11,1 $\pm$ 0,6 ab	12,1 $\pm$ 1,1 ab	11,7 $\pm$ 0,8 ab	13,1 $\pm$ 1,0 a	9,3 $\pm$ 0,6 b	8,1 $\pm$ 0,8 b
Malate	4,6 $\pm$ 0,2 a	4,7 $\pm$ 0,4 ab	7,1 $\pm$ 0,7 b	6,4 $\pm$ 0,5 b	4,2 $\pm$ 0,4 a	3,5 $\pm$ 0,4 a
Citrate	1,2 $\pm$ 0,1 ab	1,1 $\pm$ 0,1 ab	1,3 $\pm$ 0,2 ab	1,4 $\pm$ 0,1 a	1,0 $\pm$ 0,1 ab	0,7 $\pm$ 0,1 b

**Tableau 4.2.** Analyse ANOVA à un facteur des teneurs en anions majeurs des plantes de laitue des variétés Paris Island Cos, Kordaat et Red Salad Bowl cultivées en absence de cadmium. dl: degré de liberté, SC: somme des carrés, MQ: moyenne quadratique, F: F value, p: p value; NS: p>0,01, \*\*: p<0,01, \*\*\*: p<0,001.

	Chlorure					Nitrate				Malate			
	dl	SC	MQ	F	p	SC	MQ	F	p	SC	MQ	F	p
Variété	2	4,9	2,4	43	***	581	290	5,4	**	244	122	3,9	NS
Organe	1	16	16	288	***	94	94	1,7	NS	9008	9008	291	***
Variété * Organe	2	2,3	1,1	20	***	261	131	2,4	NS	47	23	0,76	NS
Erreur	38	2,2	0,06			2047	54			1176	31		
Totale	43	26				2970				10582			

	Sulfate					Phosphate				Citrate			
	dl	SC	MQ	F	p	SC	MQ	F	p	SC	MQ	F	p
Variété	2	7,8	3,9	9,2	***	56	28	4,2	NS	0,85	0,42	2,8	NS
Organe	1	58	58	135	***	16	16	2,4	NS	30	30	201	***
Variété * Organe	2	0,61	0,31	0,72	NS	4,4	2,2	0,33	NS	0,29	0,15	0,98	NS
Erreur	38	16	0,43			255	6,7			5,7	0,15		
Totale	43	82				332				37			

**Tableau 4.3.** Analyse ANOVA à un facteur des teneurs en anions majeurs des plantes de laitue des variétés Paris Island Cos, Kordaat et Red Salad Bowl cultivées en absence et en présence de cadmium. dl: degré de liberté, SC: somme des carrés, MQ: moyenne quadratique, F: F value, p: p value; NS:  $p > 0,01$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\*:  $p < 0,001$ .

	Chlorure					Nitrate					Malate			
	dl	SC	MQ	F	p	SC	MQ	F	p	SC	MQ	F	p	
Variété (V)	2	57	28	88	***	725	362	8,8	***	135	67	3,6	NS	
Organe (O)	1	477	477	1485	***	118	118	2,9	NS	14709	14709	783	***	
Traitement (T)	1	632	632	1966	***	151	151	3,7	NS	199	199	11	**	
V*O	2	54	27	84	***	382	191	4,6	NS	0,1	0,05	0,003	NS	
V*T	2	20	10	31	***	86	43	1	NS	109	55	2,9	NS	
O*T	1	260	260	809	***	8	8	0,2	NS	167	167	8,9	**	
V*O*T	2	28	14	43	***	197	98	2,4	NS	93	47	2,5	NS	
Erreur	80	26	0,3			3301	41			1503	19			
Totale	91	1432				4812				17375				

	Sulfate					Phosphate					Citrates			
	dl	SC	MQ	F	p	SC	MQ	F	p	SC	MQ	F	p	
Variété (V)	2	16,4	8,2	11,3	***	67	33	5,4	**	2,5	1,3	6,1	**	
Organe (O)	1	206	206	284	***	97	97	16	***	108	108	521	***	
Traitement (T)	1	7,3	7,3	10	**	4,7	4,7	0,8	NS	5,2	5,2	25	***	
V*O	2	3,3	1,6	2,3	NS	63	31	5	**	2	1	4,7	NS	
V*T	2	1,1	0,5	0,8	NS	5,8	2,9	0,5	NS	5,2	2,6	12	***	
O*T	1	13	13	18	***	17	17	2,8	NS	7,1	7,1	34	***	
V*O*T	2	1,2	0,6	0,8	NS	55	28	4,4	NS	4,1	2	9,8	***	
Erreur	80	58	0,7			497	6,2			16,6	0,2			
Totale	91	334				884				150				

Les plantes de la variété Paris Island Cos ont montré un phénotype intermédiaire: en réponse à un traitement par le cadmium, la teneur en citrate a été augmentée au niveau des feuilles et elle est restée stable au niveau racinaire.

#### 4.4. Discussion

Notre étude a permis de montrer un effet du cadmium sur l'accumulation des anions majeurs. Si on compare les comportements des 3 variétés de laitue, l'effet différentiel de plus marquant concerne le contenu en citrate (Tableau 4.3). Cette observation doit être reliée à la variabilité observée entre les variétés pour le caractère de translocation du cadmium des racines vers la partie aérienne. En effet, chez la variété Red Salad Bowl qui présente la capacité maximale de translocation du cadmium des racines vers la partie aérienne, l'ajout de 15  $\mu\text{moles}$  de  $\text{CdCl}_2$  par litre de milieu de culture induit à la fois une diminution de la teneur en citrate dans les racines et une augmentation de la teneur en citrate dans les feuilles. Par contraste, ce même ajout n'induit aucun changement de teneur en citrate chez la variété Kordaat qui présente la capacité minimale de translocation du cadmium des racines vers la partie aérienne. La variété Paris Island Cos, qui possède une capacité de translocation de cadmium des racines vers les parties aériennes intermédiaire, présente une augmentation de la teneur en citrate au niveau des feuilles et aucun changement au niveau racinaire.

Cette corrélation positive entre translocation de cadmium des racines vers la partie aérienne et la teneur relative en citrate entre les racines et les feuilles suggère que le citrate pourrait être impliqué dans le transport du cadmium. En effet, plusieurs études parlent d'un éventuel rôle de chélation des ions cadmium par le citrate (Lugon-Moulin *et al.*, 2004). En particulier, des complexes Cd-citrate ont été identifiés dans la sève xylémique de plantes de tomate traitées par le cadmium (Senden *et al.*, 1995).

### 5. Effet du calcium sur l'accumulation de cadmium

#### 5.1. Introduction

Chez la laitue, un effet protecteur du calcium vis-à-vis du cadmium a été documenté par He *et al.*, 2005b. Dans le cadre de la caractérisation physiologique des variétés de laitue présentant des comportements extrêmes du point de vue de l'accumulation de cadmium, une autre expérimentation a été réalisée avec pour objectifs (i) de mettre en évidence l'effet du calcium sur l'accumulation du cadmium, (ii) de voir si les éventuels effets du calcium sur les teneurs en cadmium étaient différentes selon la

variété de laitue considérées et (iii) de déterminer s'il existait une concentration de calcium dans le milieu qui permette d'augmenter la différence d'accumulation de cadmium observée chez les variétés de laitue.

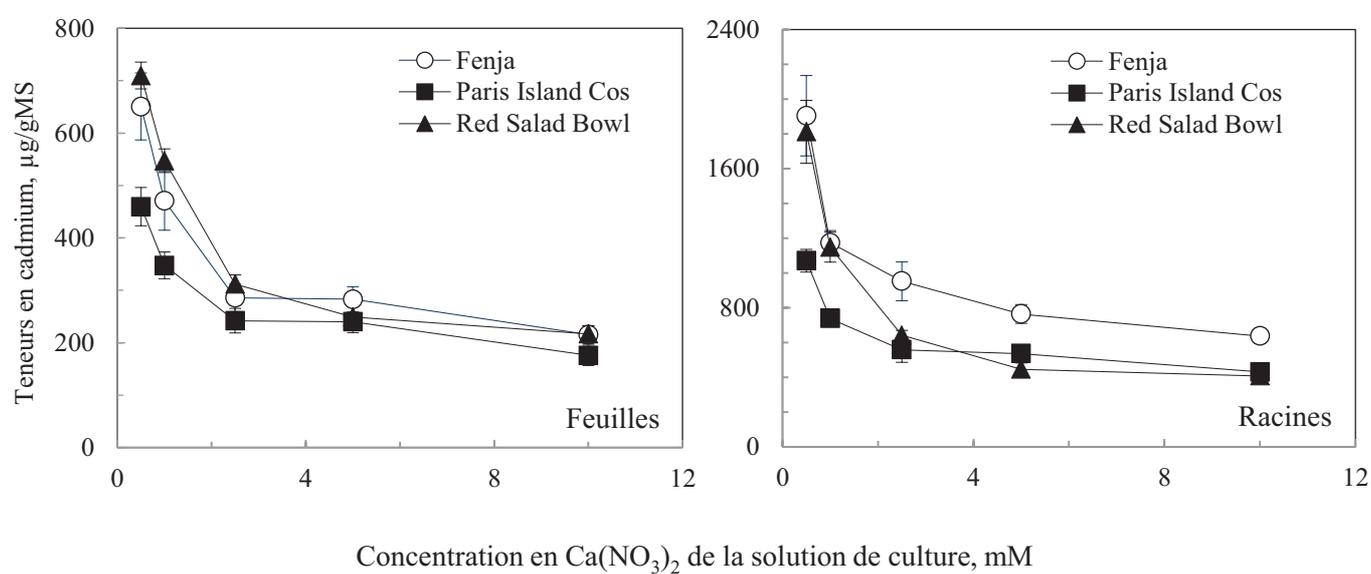
## 5.2. Protocole expérimental

Cette expérimentation a été faite sur trois variétés de laitue présentant des comportements extrêmes pour le caractère accumulation de cadmium, Fenja (qui présente le même comportement que la variété Kordaat (voir chapitre III (Figure 3.3)), Paris Island Cos et Red Salad Bowl. Les conditions de culture étaient semblables à celles qui ont été définies pour l'analyse des 18 génotypes, hormis le fait que le milieu a été supplémenté par la gamme de concentrations finales de nitrate de calcium suivante: 0,5; 1; 2,5; 5 et 10 mM. La concentration finale de  $\text{CdCl}_2$  dans la solution nutritive était de 15  $\mu\text{M}$ . Le cadmium a été dosé à l'aide d'un spectrophotomètre à absorption atomique après minéralisation des échantillons à l'acide sulfurique. À titre de rappel, la concentration finale de nitrate de calcium utilisée lors de l'analyse de la diversité phénotypique chez les 18 génotypes de laitue était de 2,5 mM (voir chapitre III).

## 5.3. Résultats

L'augmentation de la concentration de calcium dans le milieu s'accompagne d'une forte diminution des teneurs en cadmium, aussi bien dans les racines que dans les feuilles (Figure 4.21). En effet, en passant de 0,5 à 10 mM de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  dans le milieu de culture, on enregistre une baisse importante des teneurs foliaires en cadmium de 67%, 62% et 69% pour les variétés Fenja, Paris Island Cos et Red Salad Bowl, respectivement. Au niveau des racines, cette réduction est de 67%, 60% et 78% pour les variétés Fenja, Paris Island Cos et Red Salad Bowl, respectivement. Ce résultat illustre le fait que le calcium a un effet protecteur vis-à-vis du cadmium.

Comme lors de l'analyse phénotypique des 18 génotypes (voir chapitre III), on note une différence d'accumulation de cadmium chez les deux variétés extrêmes pour ce caractère (Fenja et Paris Island Cos) notamment dans les racines. Cette différence est observée dans toutes les conditions étudiées. Les résultats les plus discriminants entre ces deux variétés sont cependant obtenus pour des faibles concentrations de calcium dans le milieu (0,5 et 1mM  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ) (Figure 4.21).



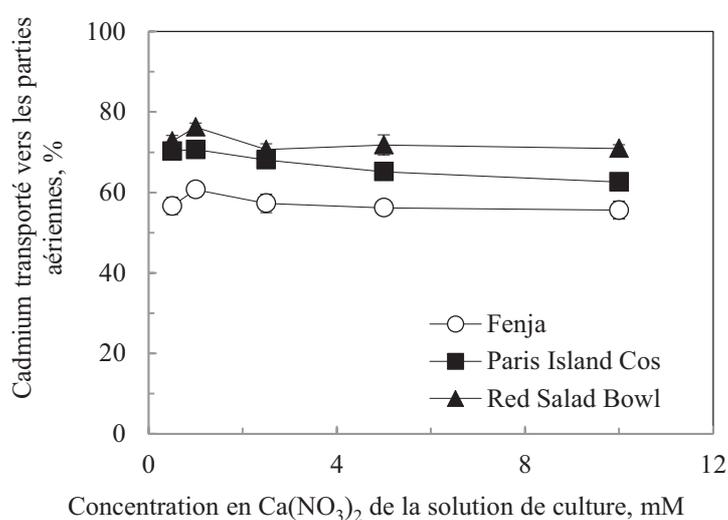
**Figure 4.21.** Accumulation de cadmium dans les parties aériennes et les racines en fonction de la concentration en  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  dans le milieu pour les variétés de laitue Paris Island Cos, Fenja et Red Salad Bowl. Des plantes âgées de 14 jours ont été exposées à une concentration de  $\text{CdCl}_2$  de  $15 \mu\text{M}$  durant les 8 derniers jours de culture. Les prélèvements ont été effectués plante par plante. Les valeurs sont des moyennes de 7 répétitions. Les barres d'erreur correspondent aux erreurs standards.

La figure 4.22 représente la variation de la capacité de translocation du cadmium des racines vers les parties aériennes pour les 3 variétés de laitue en fonction de la concentration en calcium dans le milieu. Quelle que soit la concentration du cadmium dans le milieu de culture, les trois variétés de laitue montrent des capacités de translocation de cadmium des racines vers la partie aérienne pratiquement stables. La figure 4.22 montre de ce fait un comportement déjà connu des trois variétés de laitue, à savoir, une capacité de translocation de cadmium élevée chez la variété Red Salad Bowl, une capacité de translocation de cadmium faible chez la variété Fenja et un comportement intermédiaire chez la variété Paris Island Cos.

#### 5.4. Discussion

Dans ce travail l'effet du calcium sur l'accumulation du cadmium a été étudié chez trois variétés de laitue présentant des comportements extrêmes en présence de cadmium. Cette expérimentation a montré que l'augmentation de la concentration de calcium dans le milieu s'accompagnait d'une forte diminution des teneurs en cadmium, aussi bien dans les racines que dans les feuilles. En effet, plusieurs études ont montré qu'une augmentation de calcium dans le milieu conduit à une diminution de l'absorption de cadmium (Jarvis *et al.*, 1976 ; Kim *et al.* 2002) suggérant une compétition entre  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Cd}^{2+}$  au niveau de la surface racinaire. Ceci permet de penser que l'absorption du cadmium se fait, d'une manière non spécifique, par des transporteurs ou des canaux calciques, ce qui va diminuer les teneurs en cadmium lorsque le calcium est en excès dans le milieu de culture.

Comme cela a été détaillé dans la synthèse bibliographique, l'idée que l'absorption de  $\text{Cd}^{2+}$  puisse être réalisée par l'intermédiaire de systèmes de transport calciques chez les plantes est survenue suite à des études de Perfus-Barbeoch *et al.* (2002) qui ont montré par électrophysiologie que les canaux calciques des cellules de garde sont perméables au  $\text{Cd}^{2+}$ . De même, Antosiewicz et Hennig (2004) suggèrent que LCT1, qui est un transporteur de  $\text{Ca}^{2+}$ , de  $\text{K}^+$  et de  $\text{Na}^+$  chez le blé, peut aussi transporter le  $\text{Cd}^{2+}$ . Ils ont montré que la surexpression du gène *LCT1* de blé chez des plantes de tabac induit une augmentation de la tolérance au cadmium ainsi qu'une faible diminution de l'accumulation de cadmium dans les racines.



**Figure 4.22.** Variation de la capacité de translocation du cadmium des racines vers les parties aériennes pour les variétés de laitue Fenja, Paris Island Cos et Red Salad Bowl en fonction de la concentration en  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  dans le milieu. La capacité de translocation de cadmium des racines vers les parties aériennes est évaluée d'après la quantité de cadmium qui se trouve dans les parties aériennes rapportée à la quantité totale de cadmium absorbé par la plante. Des plantes âgées de 14 jours ont été exposées à une concentration de  $\text{CdCl}_2$  de  $15 \mu\text{M}$  durant les 8 derniers jours de culture. Les prélèvements ont été effectués plante par plante. Les valeurs sont des moyennes de 7 répétitions. Les barres d'erreur correspondent aux erreurs standards.

D'autres études ont au contraire montré que LCT1, une fois surexprimé chez la levure, induit une hypersensibilité au cadmium. Cet effet a été attribué à une augmentation de l'absorption de  $Cd^{2+}$  assurée par LCT1 (Clemens, 1998). Cependant, aucun gène orthologue à *LCT1* n'a été identifié chez les dicotylédones et on ne peut peut-être pas généraliser les observations faites sur le blé.

Les trois variétés de laitue ont présenté des différences de teneurs en cadmium amplifiées à des faibles concentrations de calcium dans le milieu. Toutefois, à ces faibles concentrations de calcium la toxicité du cadmium est très forte à cause de l'insuffisance de protection habituellement assurée par le calcium. Il n'est donc pas envisageable de réduire la concentration en calcium dans le milieu de culture pour espérer augmenter les différences intervariétales de teneur en cadmium.

En conclusion, cette étude a permis de mettre en évidence un effet marquant de l'augmentation de la concentration de calcium dans le milieu sur l'accumulation du cadmium chez nos plantes de laitue, ce qui peut suggérer qu'au moins en partie l'absorption de  $Cd^{2+}$  se fait par l'intermédiaire de systèmes de transport calciques. Néanmoins, le comportement des 3 variétés de laitue était très similaire dans les conditions testées. Cette expérience n'a donc pas permis de mieux comprendre l'origine de la différence variétale existante entre les 3 variétés de laitue.

## **6. Effet du fer sur l'accumulation du cadmium**

### **6.1. Introduction**

Chez les plantes une forte corrélation a été mise en évidence entre l'accumulation du fer et celle du cadmium. Par exemple, Ramos et *al.* (2002) montrent un effet dépressif remarquable induit par la présence de cadmium dans le milieu de culture sur les teneurs foliaires en fer chez la laitue.

A titre exploratoire, nous avons eu pour objectif de mettre en évidence un éventuel effet réciproque du fer sur l'accumulation de cadmium, et de voir si les différences intervariétales d'accumulation de cadmium pouvaient être associées à un comportement différent de nos variétés de laitue vis-à-vis du fer. Cette expérience a aussi eu comme objectif secondaire de déterminer s'il existait une concentration de fer dans le milieu qui permette d'augmenter la différence d'accumulation de cadmium observée chez les variétés de laitue.

## 6.2. Protocole expérimental

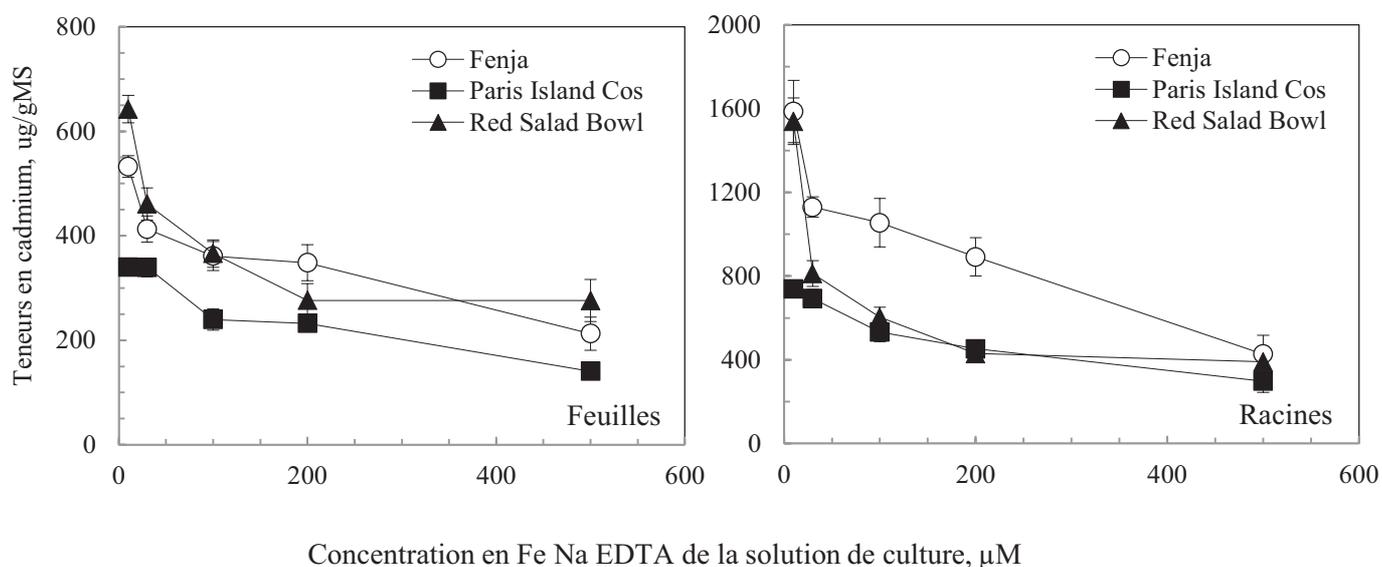
L'expérimentation a été faite sur des plantes des trois variétés de laitue Fenja (la variété présentant le même comportement que la variété Kordaat), Paris Island Cos et Red Salad Bowl. Les conditions de culture étaient semblables à celles qui ont été définies pour l'analyse des 18 génotypes, hormis le fait que le milieu a été supplémenté par la gamme de concentrations finales de FeNaEDTA suivante: 10; 30; 100; 200 et 500  $\mu\text{M}$ . À titre de comparaison, l'analyse des 18 génotypes a été réalisée avec un milieu de culture contenant 100  $\mu\text{M}$  de FeNaEDTA. La concentration finale de  $\text{CdCl}_2$  dans la solution nutritive était de 15  $\mu\text{M}$ . le cadmium a été dosé à l'aide d'un spectrophotomètre à absorption atomique après minéralisation des échantillons à l'acide sulfurique.

## 6.3. Résultats

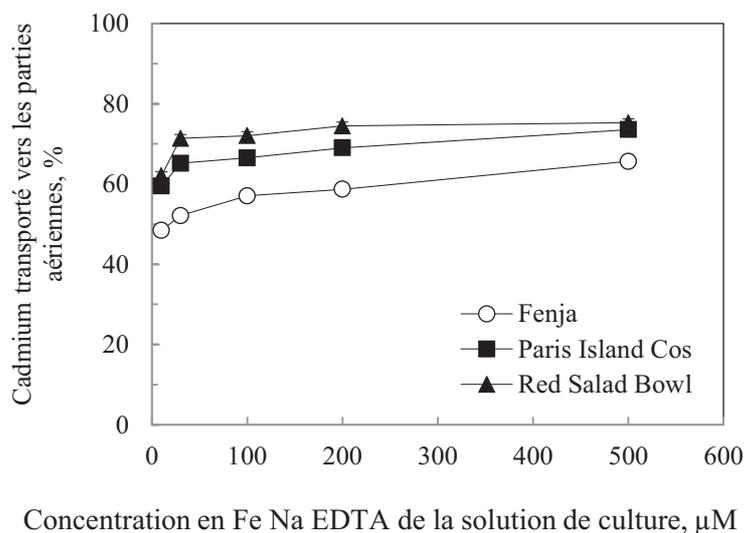
Comme pour le calcium, cette expérience a montré que l'augmentation de la concentration de fer dans le milieu s'accompagne d'une diminution des teneurs en cadmium, aussi bien dans les racines que dans les feuilles (Figure 4.23). En effet, en passant de 10 à 500  $\mu\text{M}$  de FeNaEDTA dans le milieu de culture, on enregistre une baisse importante des teneurs foliaires en fer de 60%, 59% et 57% pour les variétés Fenja, Paris Island Cos et Red Salad Bowl, respectivement. Au niveau des racines, cette réduction est de 73%, 60% et 75% pour les variétés Fenja, Paris Island Cos et Red Salad Bowl, respectivement. On constate donc que le fer exerce un effet protecteur vis-à-vis du cadmium.

Comme lors de l'analyse phénotypique des 18 génotypes, on note une différence d'accumulation de cadmium chez les deux variétés extrêmes pour le caractère accumulation de cadmium (Fenja et Paris Island Cos) notamment dans les racines. Les résultats les plus discriminants, entre ces deux variétés, sont obtenus pour la concentration de fer la plus faible dans le milieu de culture (10  $\mu\text{M}$  de FeNaEDTA) (Figure 4.23).

Le pourcentage de translocation de cadmium des racines vers les parties aériennes augmente avec l'augmentation de la concentration de fer dans le milieu, et ce, pour les trois variétés de laitue étudiées (Figure 4.24).



**Figure 4.23.** Accumulation de cadmium dans les parties aériennes et les racines en fonction de la concentration en Fe Na EDTA dans le milieu pour les variétés de laitue Paris Island Cos, Fenja et Red Salad Bowl. Des plantes âgées de 14 jours ont été exposées à une concentration de  $\text{CdCl}_2$  de  $15 \mu\text{M}$  durant les 8 derniers jours de culture. Les prélèvements ont été effectués plante par plante. Les valeurs sont des moyennes de 7 répétitions. Les barres d'erreur correspondent aux erreurs standards.



**Figure 4.24.** Variation de la capacité de translocation du cadmium des racines vers les parties aériennes pour les variétés de laitue Fenja, Paris Island Cos et Red Salad Bowl en fonction de la concentration en Fe Na EDTA dans le milieu. La capacité de translocation de cadmium des racines vers les parties aériennes est évaluée d'après la quantité de cadmium qui se trouve dans les parties aériennes rapportée à la quantité totale de cadmium absorbé par la plante. Des plantes âgées de 14 jours ont été exposées à une concentration de  $\text{CdCl}_2$  de  $15 \mu\text{M}$  durant les 8 derniers jours de culture. Les prélèvements ont été effectués plante par plante. Les valeurs sont des moyennes de 7 répétitions. Les barres d'erreur correspondent aux erreurs standards.

En effet, en passant de 10 à 500  $\mu\text{M}$  de FeNaEDTA dans le milieu de culture, on enregistre une augmentation de ce pourcentage de 36%, 24% et 21% pour les variétés Fenja, Paris Island Cos et Red Salad Bowl, respectivement. La figure 4.24 montre aussi un comportement déjà connu des trois variétés de laitue pour le caractère translocation de cadmium des racines vers les parties aériennes, à savoir que la variété Red Salad Bowl présente la capacité la plus élevée de translocation du cadmium des racines vers les parties aériennes. Par contraste la variété Fenja présente la plus faible translocation cadmium de ses racines vers ses parties aériennes (Figure 4.24).

#### 6.4. Discussion

Dans ce travail l'effet du fer sur l'accumulation du cadmium a été étudié chez trois variétés de laitue présentant des comportements extrêmes en présence de cadmium. La différence intervariétale d'accumulation de cadmium déjà commentée et discutée à plusieurs reprises a été amplifiée en présence de faibles concentrations de fer dans le milieu. En effet, c'est pour la concentration de fer dans le milieu de culture la plus faible que nous avons observé la différence la plus importante d'accumulation de cadmium. Toutefois, à ces faibles concentrations de fer les plantes souffraient d'une déficience ferrique sévère et ces conditions de cultures n'étaient donc pas favorables. Cette expérimentation a également montré que l'augmentation de la concentration de fer dans le milieu s'accompagnait d'une forte diminution des teneurs en cadmium, aussi bien dans les racines que dans les feuilles. Des compétitions ou synergies entre cadmium et fer ont déjà été mises en évidence. En effet, Sharma *et al.*, 2004 montrent qu'une augmentation de fer dans le milieu conduit à une diminution très forte de l'accumulation de cadmium chez l'orge aussi bien au niveau foliaire qu'au niveau racinaire. Comme pour le calcium, ceci permet de penser que l'absorption du cadmium peut se faire, d'une manière non spécifique, par des transporteurs de fer, ce qui va diminuer les teneurs en cadmium lorsque le fer est en excès dans le milieu de culture. Comme cela a déjà été mentionné, le principal candidat pour ce genre de transport est IRT1, un transporteur de la famille ZIP, qui représente la principale voie d'absorption du  $\text{Fe}^{2+}$  par les cellules racinaires d'*A. thaliana* (Vert *et al.*, 2002). Les premiers travaux sur la surexpression de *IRT1* chez la levure (*S. cerevisiae*) ont montré une contribution de cette protéine dans l'absorption de cadmium (Korshunova *et al.*, 1999). En outre, des plantes d'*A. thaliana* qui surexpriment *IRT1* accumulent plus de cadmium dans leurs tissus racinaires que les plantes témoins dans des

conditions de déficience ferrique qui induisent la surexpression de la protéine IRT1 (Connolly *et al.*, 2002). Ces expériences ont montré l'implication d'IRT1 dans l'influx de  $Cd^{2+}$  dans les cellules racinaires des plantes. Toutes ces études suggèrent que les systèmes d'absorption du  $Fe^{2+}$  peuvent permettre l'entrée de  $Cd^{2+}$  dans les cellules racinaires (Cohen *et al.*, 1998).

Notre étude a montré que la translocation de cadmium des racines vers les parties aériennes a augmenté avec l'augmentation de la concentration de fer dans le milieu, et ce pour les trois variétés de laitue étudiées. La faible translocation de cadmium observée en présence de faibles concentrations de fer dans le milieu et donc qui a lieu dans des conditions où l'accumulation de cadmium est la plus élevée pourrait correspondre à une compétition plus forte entre le fer et le cadmium au niveau des transporteurs de fer impliqués dans la charge de xylème ou bien à une stratégie de protection développée par la plante pour épargner les organes photosynthétiques des fortes accumulations de cadmium.

En conclusion, cette étude a permis de mettre en évidence un effet marquant de l'augmentation de la concentration de fer dans le milieu de culture sur l'accumulation du cadmium chez nos plantes de laitue. Ceci permet de penser que l'absorption de  $Cd^{2+}$  peut se faire d'une manière non spécifique via des transporteurs de fer, notamment un orthologue à *IRT1* chez la laitue. Cette étude a aussi mis en évidence un effet intéressant de l'augmentation de la concentration de fer dans le milieu de culture sur le pourcentage de cadmium transporté des racines vers les parties aériennes. Néanmoins, le comportement des 3 variétés de laitue était très similaire dans les conditions testées. Cette expérience n'a pas donc permis de mieux comprendre l'origine de la différence variétale existante entre les 3 variétés de laitue.

## **7. Mesure de l'influx, de l'efflux et de la translocation des racines vers les parties aériennes du cadmium marqué $^{109}Cd$**

### **7.1. Introduction**

Nous avons souhaité essayer d'identifier l'origine des différences de capacité à accumuler le cadmium et à transférer le cadmium des racines vers la partie aérienne chez les trois variétés extrêmes pour ces caractères, Kordaat, Paris Island Cos et Red Salad Bowl. Pour cela, nous avons entrepris des expériences de mesure d'influx,

d'efflux et de translocation des racines vers les parties aériennes en utilisant du cadmium marqué ( $^{109}\text{Cd}$ ).

## 7.2. Protocole expérimental

Le  $^{109}\text{Cd}$  est un radioélément très ionisant. C'est un émetteur de rayonnement gamma. Sa manipulation est extrêmement contrôlée et les expériences n'ont pu être conduites que dans les installations spécifiques dans l'enceinte du CEA de Cadarache. Je n'ai pas été autorisé à réaliser les expériences et c'est Dr. Catherine Sarrobert qui les a réalisées.

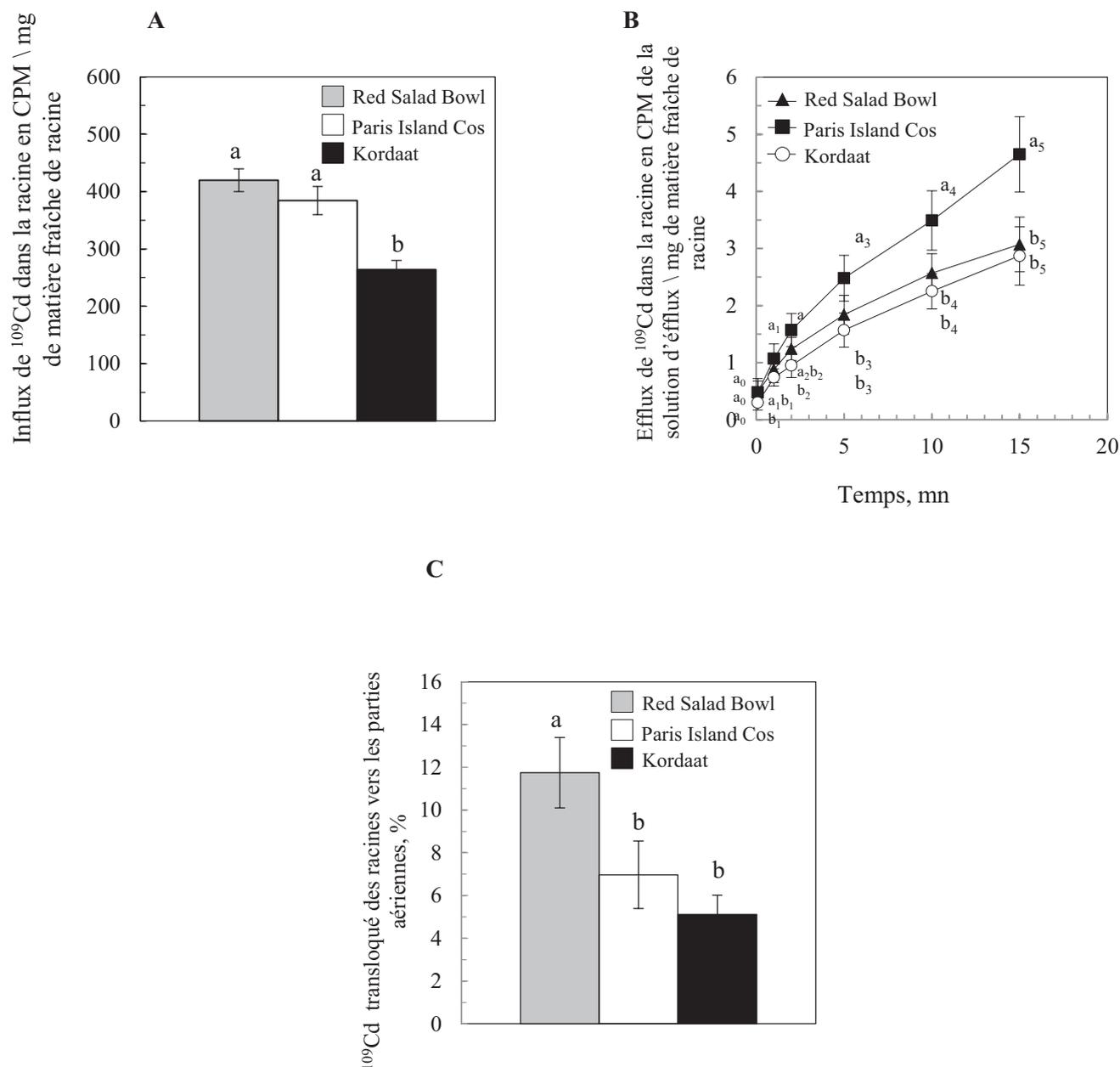
Le protocole expérimental a été déjà détaillé dans le chapitre II (matériels et méthodes).

## 7.3. Résultats

Dans une expérience préliminaire, la linéarité des influx racinaires de cadmium marqué durant les 10 premières minutes d'influx a été vérifiée pour les variétés de laitue étudiées. Cette expérience a permis de considérer des durées de 5 min pour faire les mesures d'influx.

Après 5 min de charge avec du cadmium radioactif, les plantes de laitue des variétés Red Salad Bowl et Paris Island Cos ont montré un influx une fois et demi plus important que les plantes de la variété Kordaat (Figure 4.25.A). En effet, pour les variétés Red Salad Bowl et Paris Island Cos les valeurs d'influx sont aux alentours de 400 CPM / mg de MF racinaire alors qu'elles sont aux alentours de 260 CPM / mg de MF racinaire pour la variété Kordaat.

La cinétique d'efflux de cadmium radioactif chez nos variétés extrêmes a montré que la variété Paris Island Cos se caractérise par un efflux plus important de cadmium marqué (Figure 4.25.B). En effet, les valeurs d'efflux de cette variété se distinguent significativement des valeurs des deux autres variétés dès le point 5 min de la courbe de cinétique d'efflux. Les différences d'efflux les plus marquantes ont été observées au point 15 min avec un efflux plus d'une fois et demie plus important chez Paris Island Cos que chez les deux autres variétés. En effet, après 15 min d'efflux, on enregistre des valeurs de 4,6 ; 3 et 2,8 CPM de la solution d'efflux / mg de MF racinaire pour les variétés Paris Island Cos, Red Salad Bowl et Kordaat, respectivement.



**Figure 4.25.** Mesure de l'influx (A), de l'efflux (B) et de la translocation des racines vers les parties aériennes (C) du cadmium marqué  $^{109}\text{Cd}$ . Les valeurs sont des moyennes de 25 répétitions pour l'influx et de 8 répétitions pour l'efflux et la translocation. Les barres d'erreur correspondent aux intervalles de confiance. Les valeurs marquées par la même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 0,05 (comparaisons multiples des moyennes (Test de Tukey)). Le protocole expérimental suivi est bien détaillé dans le chapitre matériels et méthodes.

**Tableau 4.4.** Tableau récapitulatif des mesures de l'influx, de l'efflux et de la translocation des racines vers les parties aériennes du cadmium marqué  $^{109}\text{Cd}$ .

Variété	Caractéristique de la variété	Influx	Efflux	Translocation
<b>Korlaat</b>	Forte accumulation de Cd Faible translocation de Cd	-	-	-
<b>Paris Island Cos</b>	Faible accumulation de Cd	+	+	-
<b>Red Salad Bowl</b>	Forte translocation de Cd	+	-	+

Concernant la translocation du cadmium marqué des racines vers les parties aériennes, nos résultats ont montré une translocation plus de deux fois plus importante chez la variété Red Salad Bowl que chez la variété Kordaat (Figure 4.25.C). La variété Paris Island Cos a présenté un comportement intermédiaire. En effet, on enregistre des proportions de  $^{109}\text{Cd}$  présent dans les parties aériennes de 12; 7 et 5% pour les variétés Red Salad Bowl, Paris Island Cos et Kordaat, respectivement. Le tableau 4.4 récapitule les résultats des mesures de l'influx, de l'efflux et de la translocation des racines vers les parties aériennes du cadmium marqué  $^{109}\text{Cd}$ .

#### 7.4. Discussion

Afin de caractériser physiologiquement nos lignées extrêmes et de montrer l'origine de leur variabilité, nous avons réalisé des mesures d'influx, d'efflux et de translocation des racines vers les parties aériennes en utilisant du cadmium marqué ( $^{109}\text{Cd}$ ).

Nos résultats ont montré un influx plus important chez les deux variétés Red Salad Bowl et Paris Island Cos par comparaison à la variété Kordaat. Ceci semble être en contradiction avec nos résultats d'analyse de diversité phénotypique qui montre une accumulation plus importante chez Kordaat par comparaison à celles des autres variétés de laitue. Néanmoins, il ne faut noter que le taux d'accumulation de n'importe quel élément dans la plante est le bilan de plusieurs phénomènes notamment l'absorption, l'exclusion, le transport, la compartimentation.

Nos mesures ont aussi montré une translocation de cadmium marqué des racines vers les parties aériennes deux fois plus importante chez la variété Red Salad Bowl que chez la variété Kordaat. La variété Paris Island Cos présente un comportement intermédiaire. Ce résultat est en accord avec nos résultats d'analyse de diversité phénotypique. On peut supposer que la faible translocation de cadmium chez Kordaat soit causée par une moindre capacité de charge cet élément dans le xylème. Comme on l'a déjà cité auparavant, le principal candidat pour ce genre de transport est un éventuel " orthologue fonctionnel " à *HMA4* d'*A. thaliana* chez la laitue. *HMA4* d'*A. thaliana* est un transporteur de cations bivalents tels que Cd et Zn. Verret *et al.* (2004) montrent clairement qu'*AtHMA4* joue un rôle important dans la translocation du cadmium des racines vers les feuilles chez *A. thaliana*. Récemment, Hanikenne *et al.* (2008) ont attribué l'hyperaccumulation des métaux observée chez *A. halleri* à la

présence de trois copies du gène *HMA4*, contre une seule copie chez *A. thaliana*, ainsi qu'au très fort niveau d'expression de ces gènes chez *A. halleri*.

Les résultats de ces mesures ont montré que la variété Paris Island Cos se caractérise par un efflux de cadmium marqué plus important par comparaison aux deux autres variétés. Ce résultat est en accord avec nos résultats d'analyse de diversité phénotypique qui ont montré que cette variété présente l'accumulation de cadmium la plus faible par comparaison à tous les autres génotypes. En effet, le comportement de la variété Paris Island Cos pourrait s'expliquer par plusieurs hypothèses notamment par la mise en place d'un ou de plusieurs mécanismes permettant de limiter l'absorption par la racine, de réduire le transfert vers la partie aérienne, et de favoriser l'efflux de cadmium en dehors du cytoplasme (Clemens 2006 ; Kim *et al.*, 2007). D'après nos résultats, il semble que le déterminant majeur responsable de la limitation d'accumulation de cadmium chez cette variété est sa grande capacité d'efflux de cadmium des racines vers le milieu de culture. Comme Paris Island Cos se caractérise par une capacité d'influx de cadmium importante, il sera nécessaire d'évaluer l'importance relative de l'influx par rapport à l'efflux avant de conclure définitivement. En ce qui concerne l'efflux de cadmium, le principal candidat chez la laitue serait un éventuel " orthologue fonctionnel " au gène *PDR8* d'*A. thaliana*. Kim *et al.* (2007) suggèrent en effet que *AtPDR8*, un transporteur de la famille ABC localisé au niveau de la membrane plasmique, pourrait jouer un rôle important dans l'efflux du cadmium. La surexpression du gène *PDR8* chez *A. thaliana* induit une forte diminution des teneurs en cadmium aussi bien au niveau foliaire qu'au niveau racinaire. La mutation *pdr8* entraîne à l'inverse une augmentation de l'accumulation de cadmium dans les feuilles comme dans les racines.

Pour compléter ces analyses physiologiques et afin de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans l'accumulation du cadmium chez la laitue, nous avons élaboré deux approches complémentaires (une approche génétique et une approche moléculaire) qui sont présentées dans les chapitres suivants. Dans le cadre de notre thématique, ces deux approches sont complètement « inédites » chez la laitue.



## Chapitre V

Étude des déterminismes génétiques de la tolérance au cadmium, de l'accumulation de cadmium et de la translocation du cadmium des racines vers les parties aériennes



## **Chapitre V: Étude des déterminismes génétiques de la tolérance au cadmium, de l'accumulation de cadmium et de la translocation du cadmium des racines vers les parties aériennes**

### **1. Introduction**

L'objectif général de notre travail est de comprendre les mécanismes contrôlant l'accumulation de cadmium chez la laitue et d'identifier les déterminants génétiques de ces mécanismes afin d'être en mesure d'obtenir des variétés accumulant moins de cadmium dans leurs tissus. Cet objectif a été abordé suivant différentes étapes.

Tout d'abord un criblage phénotypique de la capacité d'accumulation de cadmium et de la tolérance au cadmium a été réalisé sur 18 géotypes de laitue représentant la diversité génétique de l'espèce *L. sativa* (voir chapitre III). Les résultats de ce criblage phénotypique nous ont permis d'identifier deux variétés de laitue présentant des comportements extrêmes du point de vue de la tolérance au cadmium qui sont les variétés Delsay (tolérante) et Roxette (sensible). Ces résultats nous ont également permis d'identifier des géotypes extrêmes pour le caractère d'accumulation de cadmium, la variété Paris Island Cos étant la variété la moins accumulatrice de cadmium et la variété Kordaat étant la variété la plus accumulatrice de cadmium. Enfin, un comportement intéressant a également été identifié en ce qui concerne la capacité de translocation de cadmium des racines vers les parties aériennes: la variété Red Salad Bowl présente la capacité de translocation de cadmium la plus élevée alors que la variété Kordaat présente la capacité de translocation la moins élevée.

À la suite du criblage phénotypique, les géotypes présentant des performances extrêmes du point de vue de la tolérance au cadmium, de l'accumulation de cadmium et de la translocation du cadmium des racines vers les parties aériennes ont été utilisés pour développer une approche génétique visant à préciser le déterminisme, simple ou complexe, de ces caractères. Pour cela des croisements ont été réalisés entre les lignées les plus extrêmes. Ces croisements ont été réalisés par Dr. Brigitte Maisonneuve (INRA-Avignon). À la suite de ces croisements, les plantes F1 ont été analysées et leur comportement vis-à-vis du cadmium a été comparé à celui de leurs parents. En ce qui concerne les caractères d'accumulation de cadmium et de

translocation du cadmium des racines vers les parties aériennes, l'analyse des plantes F1 a été complétée par une analyse des populations F2. Une tentative de cartographie des gènes impliqués dans le caractère d'accumulation de cadmium a été réalisée en collaboration avec Pr. R. Michelmore (UC Davis).

## **2. Analyse des plantes F1**

Les plantes hybrides issues de nos croisements ont été analysées (Tableau 5.1): les hybrides entre Roxette et Delsay pour le caractère tolérance au cadmium, les hybrides entre Kordaat et Paris Island Cos pour le caractère d'accumulation de cadmium et les hybrides entre Kordaat et Red Salad Bowl pour le caractère de translocation du cadmium des racines vers les parties aériennes. Dans un deuxième temps, et afin de vérifier que les caractères étudiés ne sont pas liés au sexe, les plantes hybrides F1 issues des croisements réciproques ont été analysées.

### **2.1. Protocole expérimental**

Les plantes ont été cultivées en hydroponie (voir chapitre II: matériels et méthodes). Des plantes âgées de 14 jours ont été exposées à une concentration de cadmium ( $15\mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$ ) pendant 8 jours. Pour chacun des croisements, la culture des plantes des variétés parentales et des hybrides a été faite dans la même bassine, à raison de 8 répétitions pour chacun des génotypes. Pour l'étude de la tolérance au cadmium, une seconde série de plantes a été cultivée dans une bassine contenant une solution nutritive de base sans cadmium. Cette culture servait de témoin, car les mesures de tolérance au cadmium sont faites en comparant la biomasse de plantes soumises au cadmium à celle de plantes cultivées en condition normale. Pour toutes les expériences, les racines ont été rincées dans  $0,5\text{ mM}$  de  $\text{CaCl}_2$  froid durant la récolte, comme cela est décrit dans le chapitre « matériels et méthodes ».

L'effet du cadmium sur la production de la biomasse des feuilles et des racines a été déterminé après dessiccation des échantillons et mesure du poids de leurs matières sèches. Après dessiccation et extraction à l'acide sulfurique, la teneur en  $\text{Cd}^{2+}$  a été déterminée à l'aide d'un spectrophotomètre à absorption atomique.

**Tableau 5.1.** Liste des croisements effectués entre les variétés présentant un comportement extrême vis-à-vis du cadmium

<b>Croisements</b>	<b>Parent femelle</b>	<b>Parent mâle</b>	<b>Le caractère étudié</b>
1	Roxette	Delsay	Tolérance au cadmium
2	Kordaat	Paris Island Cos	Accumulation de cadmium
3	Kordaat	Red Salad Bowl	Translocation de cadmium
<b>Croisements réciproques</b>	<b>Parent femelle</b>	<b>Parent mâle</b>	<b>Le caractère étudié</b>
1'	Delsay	Roxette	Tolérance au cadmium
2'	Paris Island Cos	Kordaat	Accumulation de cadmium
3'	Red Salad Bowl	Kordaat	Translocation de cadmium

## 2.2. Résultats

### 2.2.1. Aspect morphologique des plantes hybrides F1

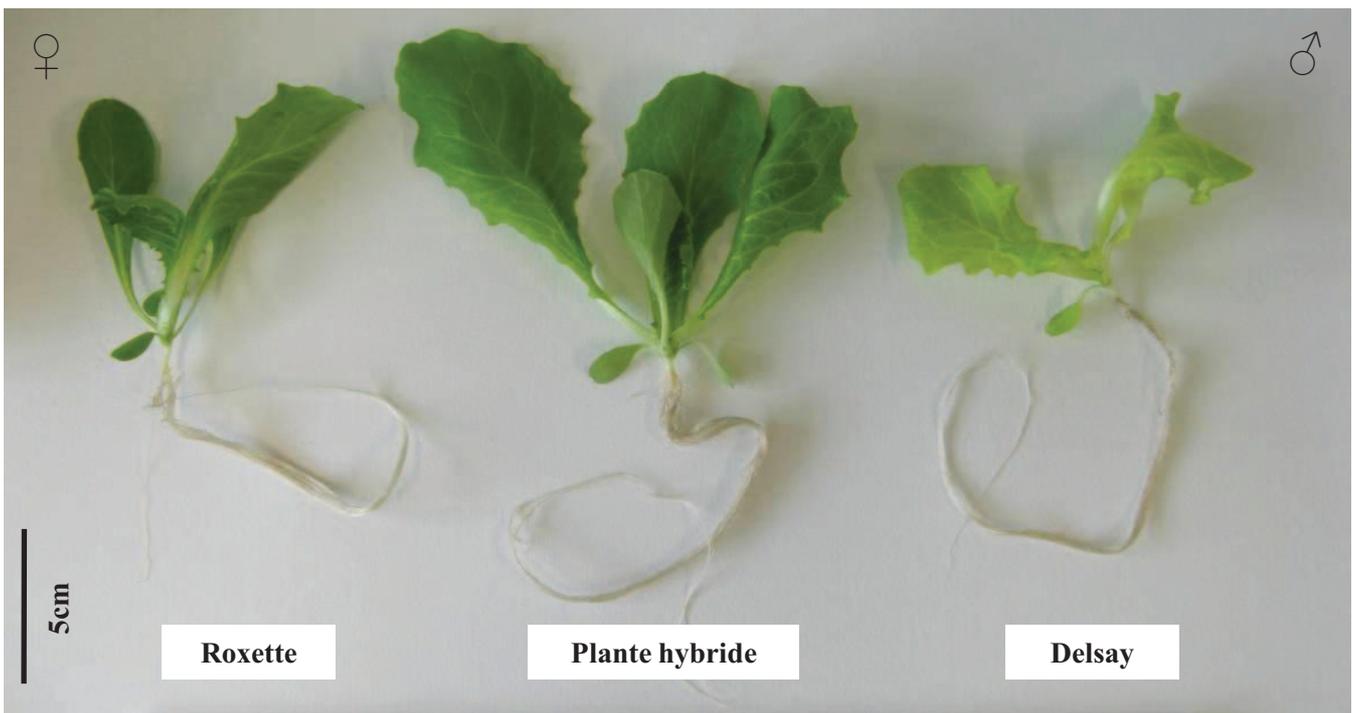
La production des plantes hybrides chez la laitue est une opération très délicate. À l'issue de cette opération il y a toujours un risque que les graines obtenues soient le résultat d'une autofécondation et non pas le résultat du croisement. En conséquence, il est nécessaire de vérifier que les plantes obtenues sont bien des plantes hybrides.

Afin de vérifier l'état hybride des plantes F1, leur morphologie a été étudiée. L'état hybride a été vérifié soit par la présence de caractères phénotypiques codés par des gènes dominants des parents mâles (si ces caractères mâles sont absents, cela indique que la femelle s'est autofécondée), soit par la forte vigueur des plantes hybrides due à l'état hétérozygote de ces plantes.

Les photos 5.1, 5.2, 5.3, 5.4, 5.5 et 5.6 représentent l'aspect morphologique des plantes de laitue parentales, ainsi que des plantes hybrides issues des différents croisements étudiés, au 22<sup>e</sup> jour de culture. Pour les 6 croisements analysés, la majorité des plantes hybrides a montré une forte vigueur par comparaison aux plantes des lignées parentales. Cette forte vigueur est due à l'état hétérozygote des plantes. Les figures 5.1, 5.2, 5.3 et 5.4 représentent les masses sèches racinaires en fonction des masses sèches foliaires pour chacune des plantes des trois croisements analysés. Ces figures montrent clairement la vigueur des plantes hybrides en comparant avec les deux parents femelle et mâle et ce, pour tous les croisements étudiés.

Mise à part cette vigueur, les plantes hybrides issues du croisement Kordaat x Red Salad Bowl se distinguent par des caractères phénotypiques qui permettent de les différencier facilement de leur parent femelle, à savoir, le bord lobé des feuilles et la présence d'anthocyane sur les feuilles qui rappellent le phénotype parental mâle (Photos 5.3 et 5.7). Ces 2 caractères dominants, qui sont présents chez le parent mâle Red Salad Bowl, mais absents chez le parent femelle Kordaat, ont été détectés chez toutes les plantes hybrides entre Kordaat et Red Salad Bowl analysées.

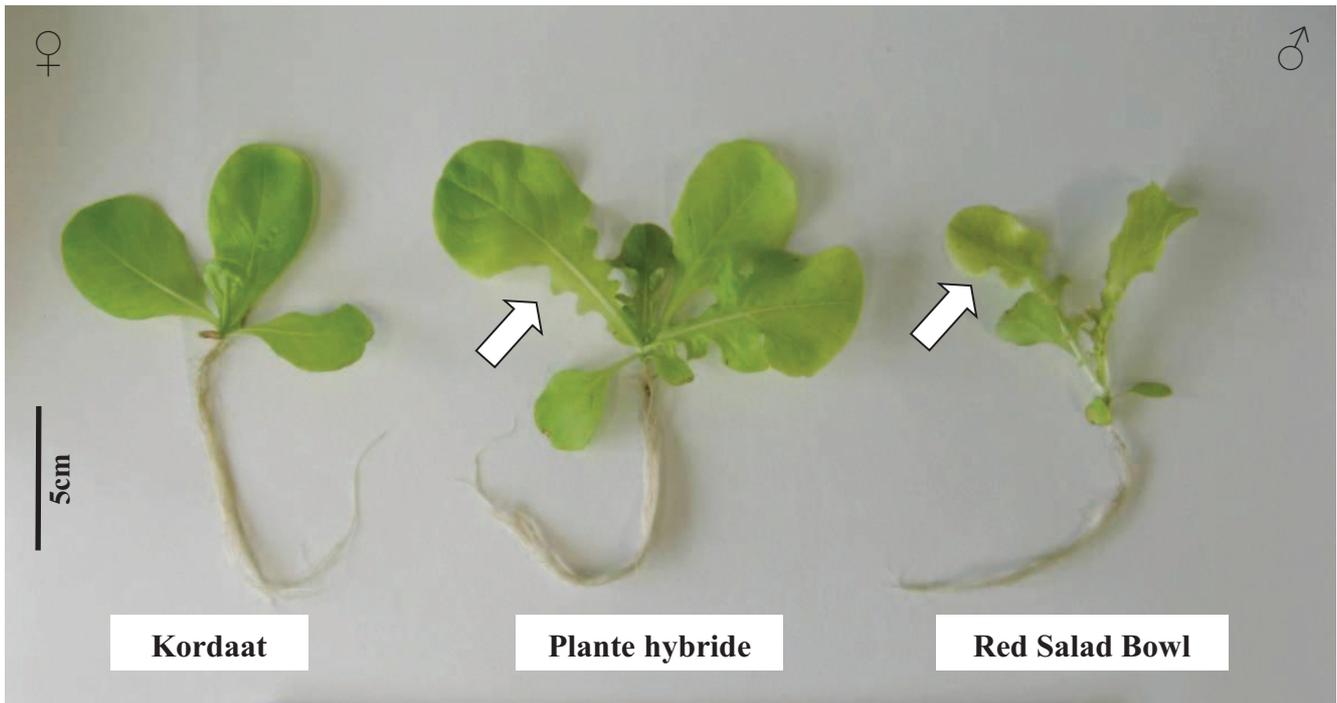
Ce contrôle de l'état hybride des plantes analysées a permis de détecter les caractères phénotypiques recherchés chez la quasi-totalité des plantes hybrides analysées ce qui permet de s'assurer de la fiabilité de notre analyse des plantes F1.



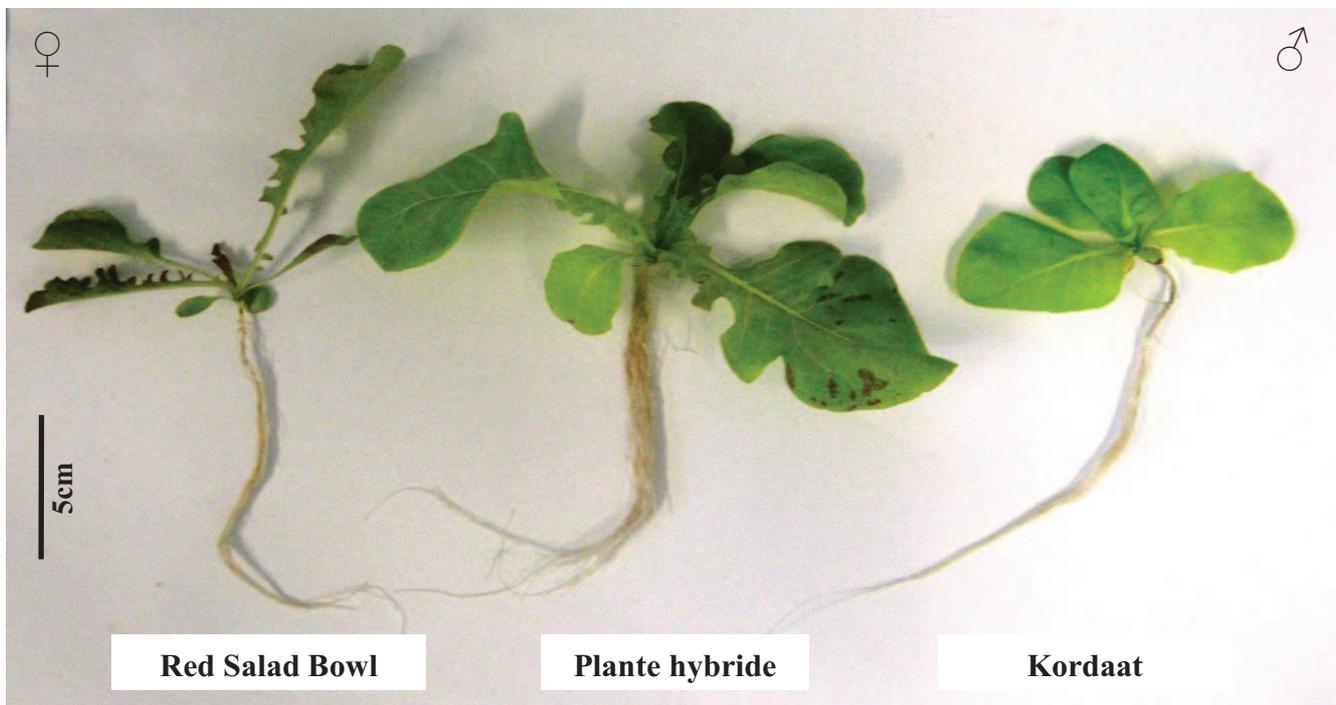
**Photo 5.1. Croisement Roxette ♀ x Delsay ♂ :** Aspect morphologique de plantes de laitue des deux variétés Roxette et Delsay ainsi que d'une plante hybride entre Roxette et Delsay au 22<sup>e</sup> jour de culture en absence de cadmium. La photo montre la forte vigueur due à l'état hétérozygote de l'hybride.



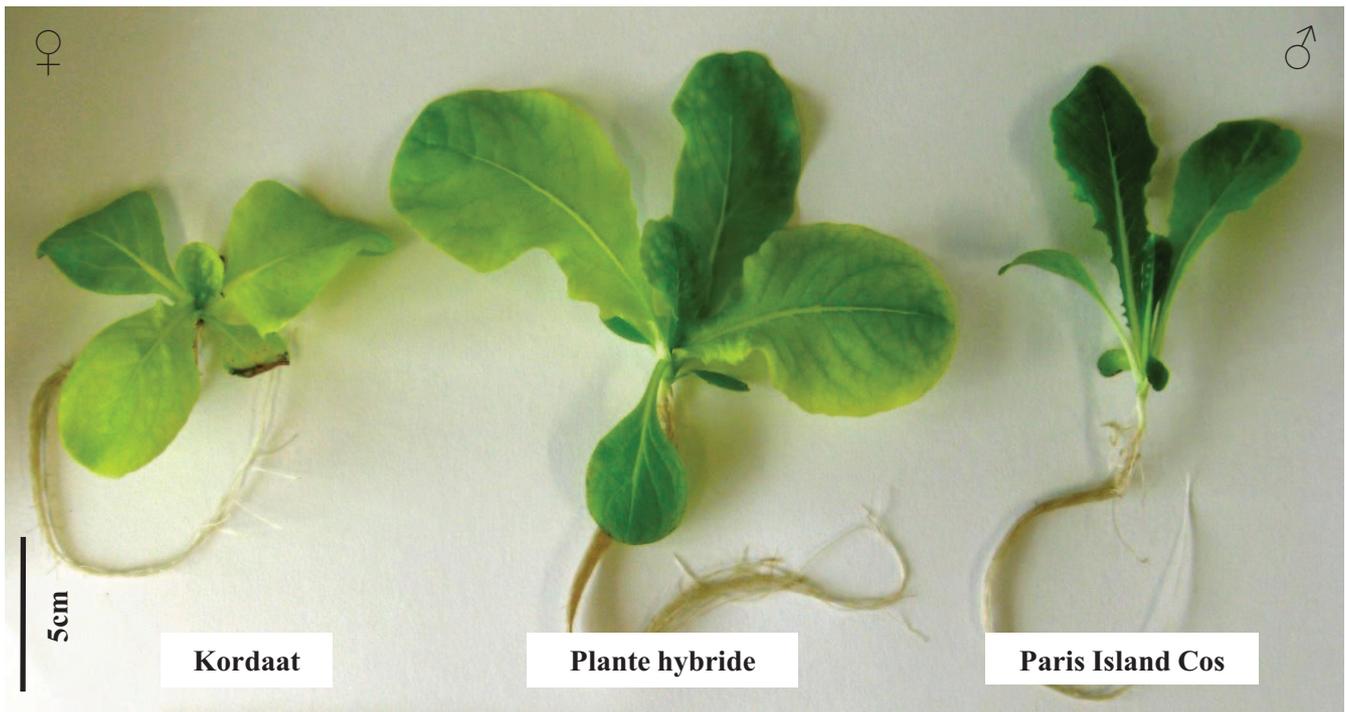
**Photo 5.2. Croisement Delsay ♀ x Roxette ♂ :** Aspect morphologique de plantes de laitue des deux variétés Delsay et Roxette ainsi que d'une plante hybride entre Delsay et Roxette au 22<sup>e</sup> jour de culture en absence de cadmium. La photo montre la forte vigueur due à l'état hétérozygote de l'hybride.



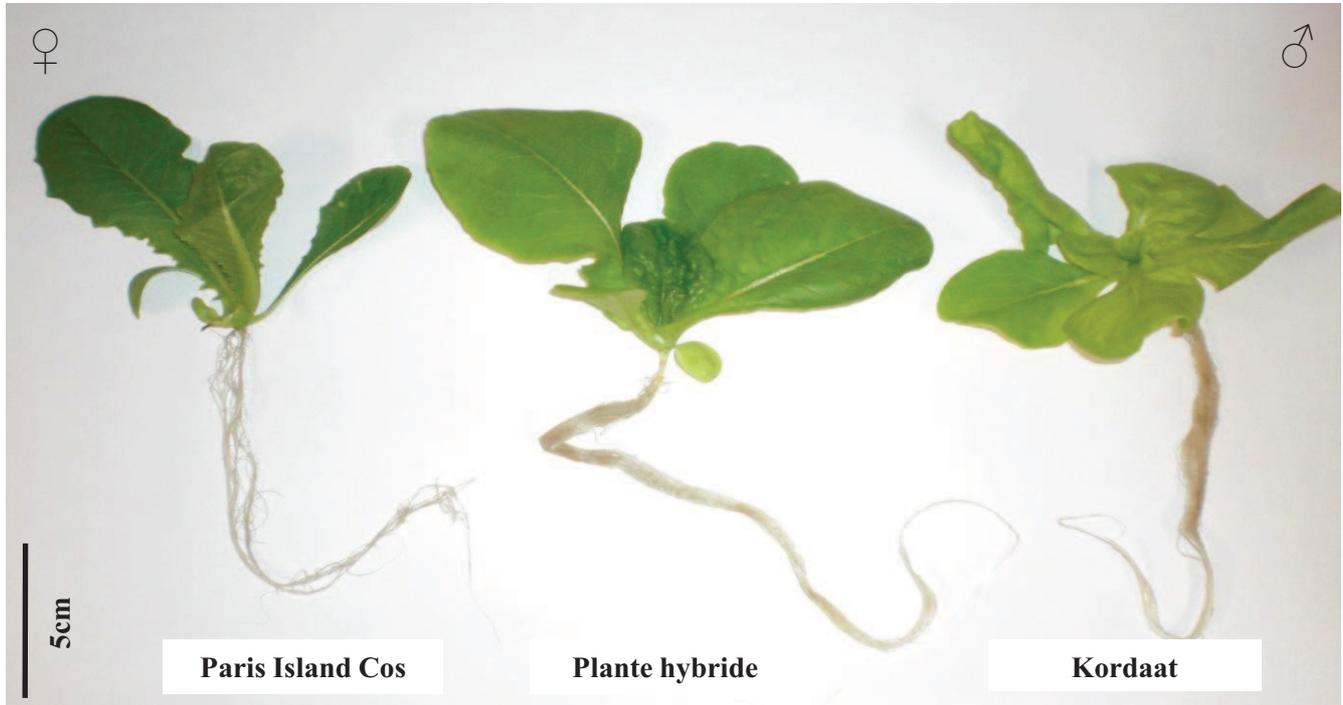
**Photo 5.3. Croisement Kordaat ♀ x Red Salad Bowl ♂ :** Aspect morphologique de plantes de laitue des deux variétés Kordaat et Red Salad Bowl ainsi que d'une plante hybride entre Kordaat et Red Salad Bowl au 22<sup>e</sup> jour de la culture. La photo montre la forme ondulatoire des feuilles de la plante hybride qui rappelle le phénotype parental mâle (flèche blanche) ainsi que la forte vigueur due à l'état hétérozygote de l'hybride.



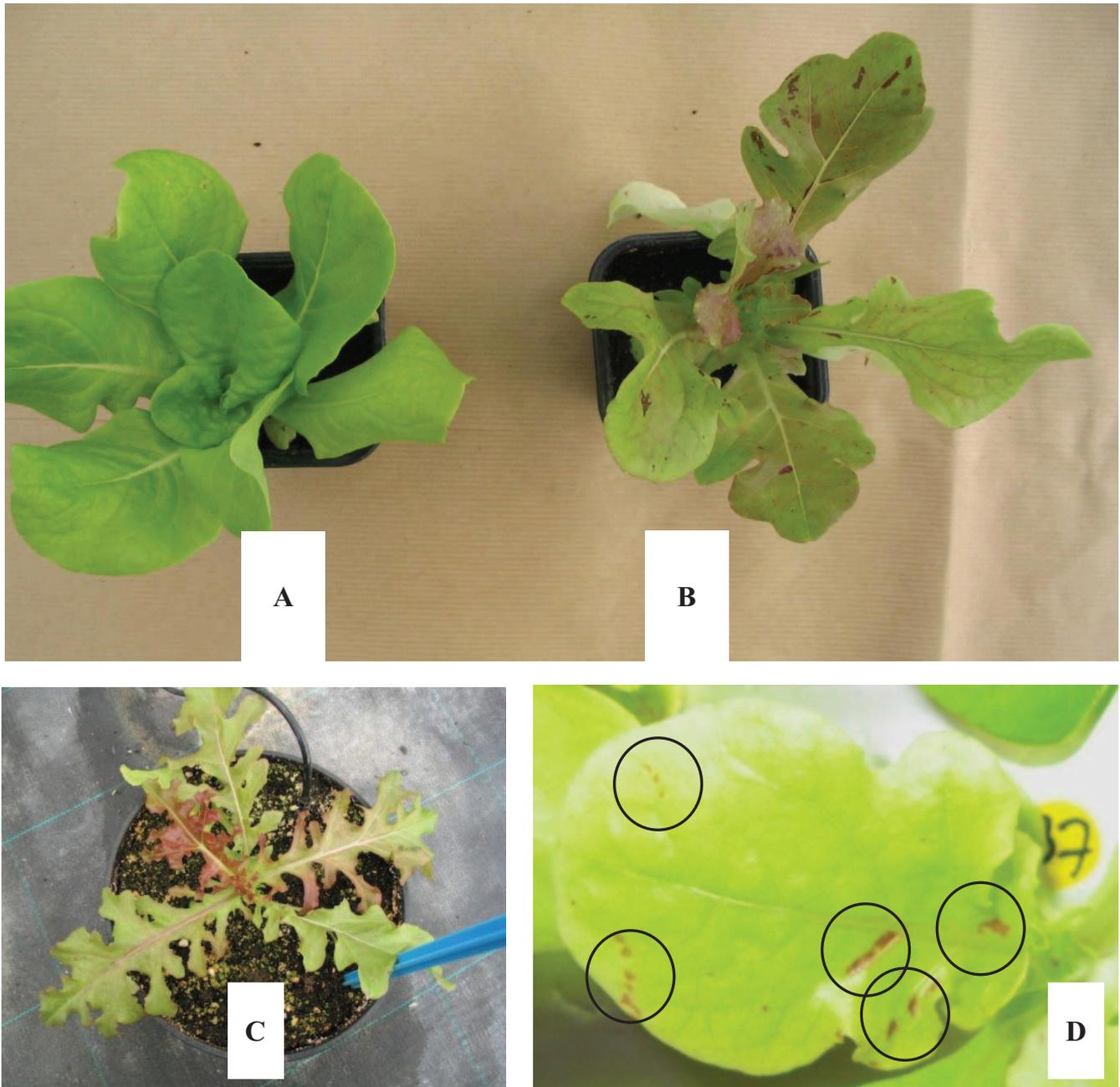
**Photo 5.4. Croisement Red Salad Bowl ♀ x Kordaat ♂ :** Aspect morphologique de plantes de laitue des deux variétés Red Salad Bowl et Kordaat ainsi que d'une plante hybride entre Red Salad Bowl et Kordaat au 22<sup>e</sup> jour de la culture. La photo montre la forte vigueur due à l'état hétérozygote de l'hybride.



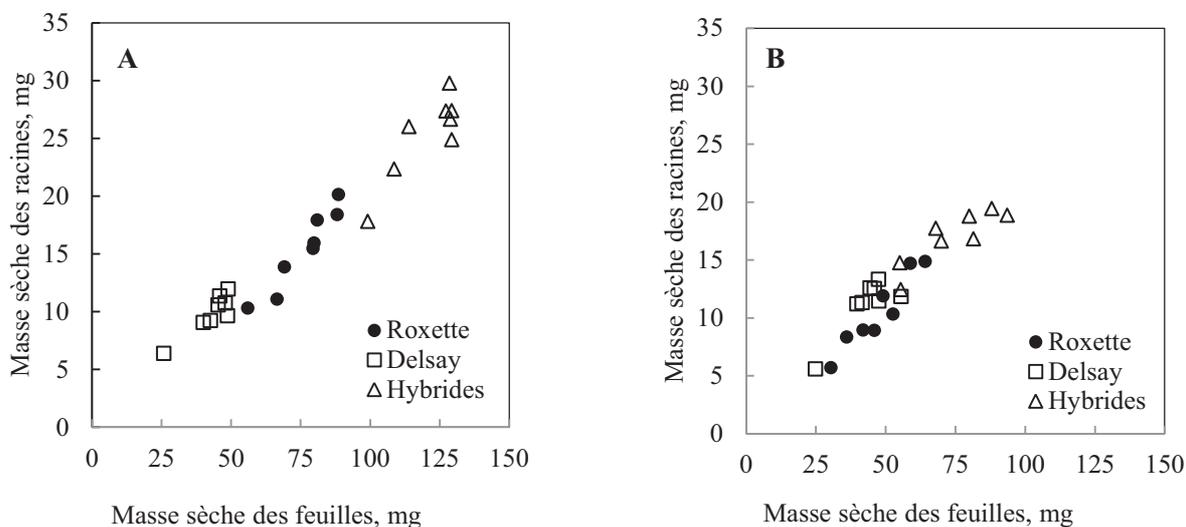
**Photo 5.5. Croisement Kordaat ♀ x Paris Island Cos ♂ :** Aspect morphologique de plantes de laitue des deux variétés Kordaat et Paris Island Cos ainsi que d'une plante hybride entre Kordaat et Paris Island Cos au 22<sup>e</sup> jour de culture en présence de cadmium. La photo montre la forte vigueur due à l'état hétérozygote de l'hybride.



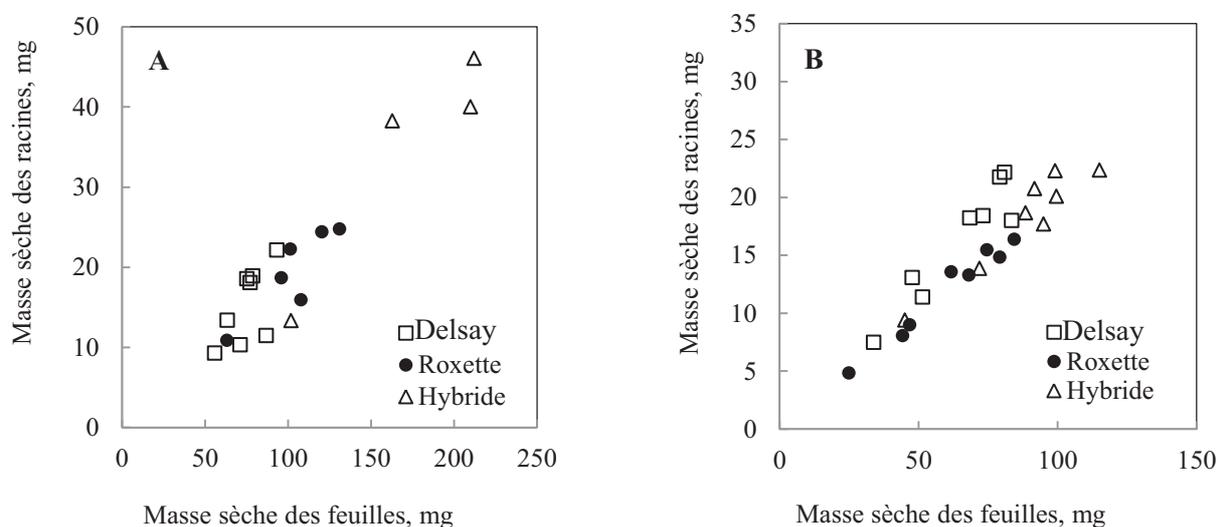
**Photo 5.6. Croisement Paris Island Cos ♀ x Kordaat ♂ :** Aspect morphologique de plantes de laitue des deux variétés Paris Island Cos et Kordaat ainsi que d'une plante hybride entre Paris Island Cos et Kordaat au 22<sup>e</sup> jour de culture en présence de cadmium. La photo montre la forte vigueur due à l'état hétérozygote de l'hybride.



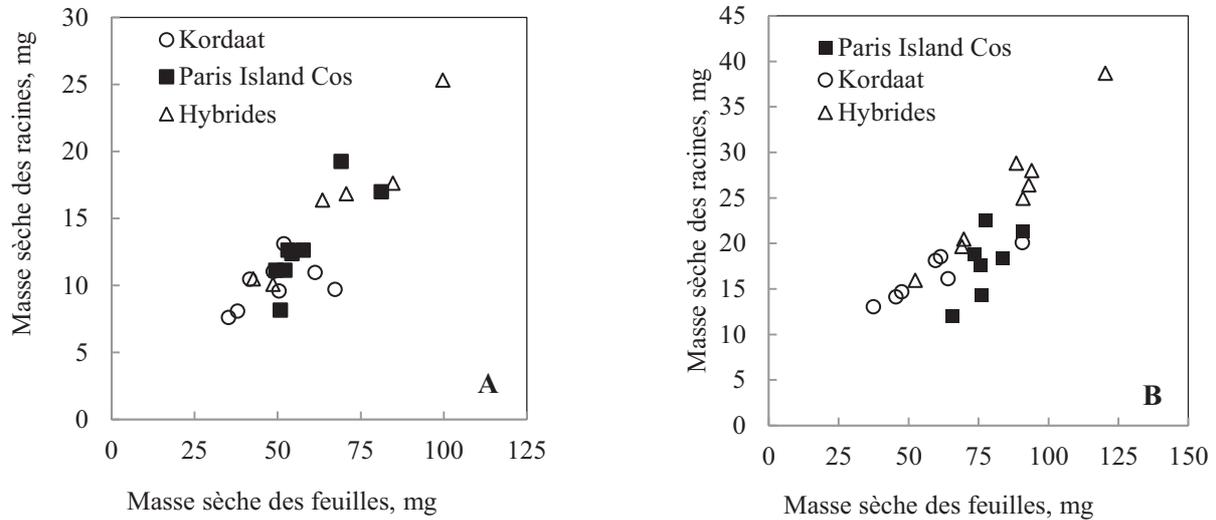
**Photo 5.7. Croisement Kordaat ♀ x Red Salad Bowl ♂:** Aspect morphologique de plantes de laitue des deux variétés Kordaat (A) et Red Salad Bowl (C) ainsi que d'une plante hybride issue de leur croisement et qui présente des macules d'anthocyanes transmis par le parent mâle (B). Aspect morphologique d'une feuille de plante de laitue hybride, issue du croisement entre Kordaat x Red Salad Bowl présentant des macules d'anthocyanes (D).



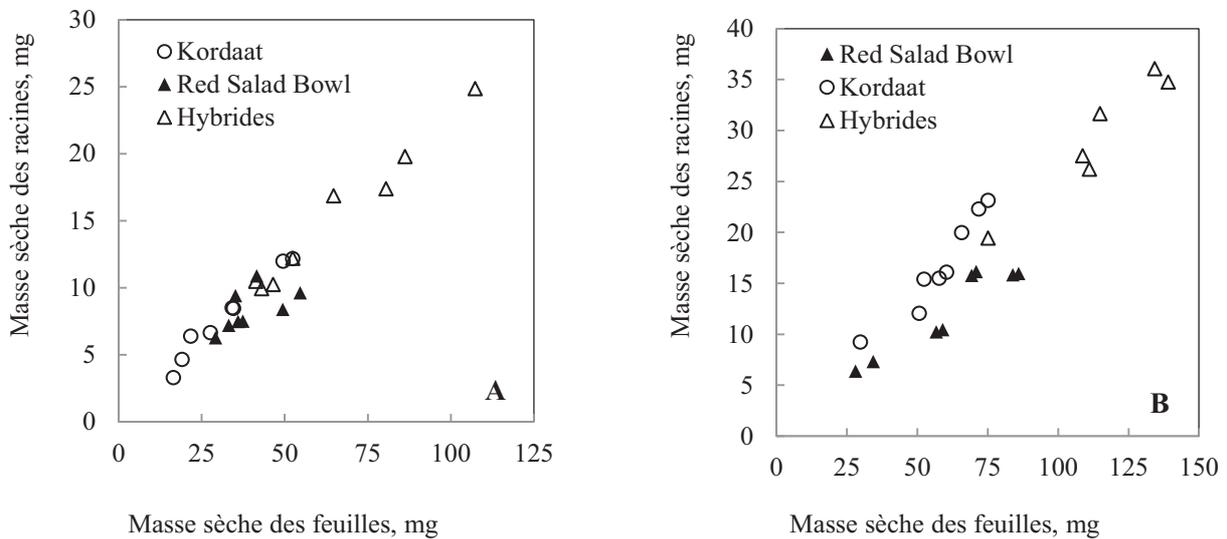
**Figure 5.1. Croisement Roxette ♀ x Delsay ♂:** Relation entre la masse sèche des racines et la masse sèche des feuilles de plantes de laitue des deux variétés Roxette et Delsay ainsi que des plantes hybrides entre Roxette et Delsay au 22<sup>e</sup> jour de culture en absence (A) ainsi qu'en présence (B) de 15µM de cadmium durant les 8 derniers jours de culture. Chaque point représente une plante individuelle. Les prélèvements ont été effectués plante par plante.



**Figure 5.2. Croisement Delsay ♀ x Roxette ♂:** Relation entre la masse sèche des racines et la masse sèche des feuilles de plantes de laitue des deux variétés Delsay et Roxette ainsi que des plantes hybrides entre Delsay et Roxette au 22<sup>e</sup> jour de culture en absence (A) ainsi qu'en présence (B) de 15µM de cadmium durant les 8 derniers jours de culture. Chaque point représente une plante individuelle. Les prélèvements ont été effectués plante par plante.



**Figure 5.3. Croisement Kordaat ♀ x Paris Island Cos ♂ (A) et croisement Paris Island Cos ♀ x Kordaat ♂ (B):** Relation entre la masse sèche des racines et la masse sèche des feuilles de plantes de laitue des deux variétés parentales ainsi que des plantes hybrides au 22<sup>e</sup> jour de culture en présence de 15µM de cadmium durant les 8 derniers jours de culture. Chaque point représente une plante individuelle. Les prélèvements ont été effectués plante par plante.



**Figure 5.4. Croisement Kordaat ♀ x Red Salad Bowl ♂ (A) et croisement Red Salad Bowl ♀ x Kordaat ♂ (B):** Relation entre la masse sèche des racines et la masse sèche des feuilles de plantes de laitue des deux variétés parentales ainsi que des plantes hybrides au 22<sup>e</sup> jour de culture en présence de 15µM de cadmium durant les 8 derniers jours de culture. Chaque point représente une plante individuelle. Les prélèvements ont été effectués plante par plante.

### 2.2.2. La tolérance au cadmium

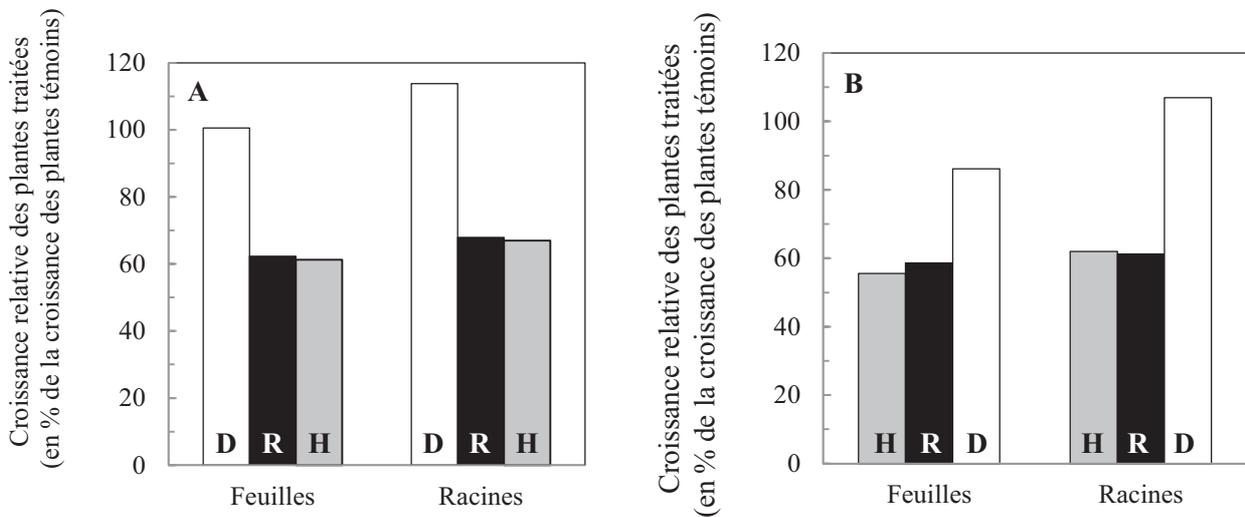
Les plantes hybrides dont les parents présentent les performances extrêmes du point de vue de la tolérance au cadmium (Roxette et Delsay), ont été comparées à leurs parents pour ce caractère.

Les résultats de cette analyse nous montrent que les plantes hybrides se comportent exactement de la même manière que le parent Roxette pour le caractère de tolérance au cadmium (Figure 5.5). Ces résultats ont été obtenus aussi bien pour le croisement Roxette x Delsay que pour le croisement réciproque Delsay x Roxette. Dans les 2 cas, la biomasse relative des plantes traitées, exprimée en pourcentage de la biomasse des plantes témoins, était d'environ 60% pour la variété Roxette et les hybrides, et ce, aussi bien au niveau foliaire qu'au niveau racinaire. Par contraste, ce pourcentage était de l'ordre de 90-100% pour les feuilles et de 100-110% pour les racines des plantes de la variété tolérante Delsay. Ces résultats indiquent que la tolérance au cadmium serait un caractère récessif non lié au sexe.

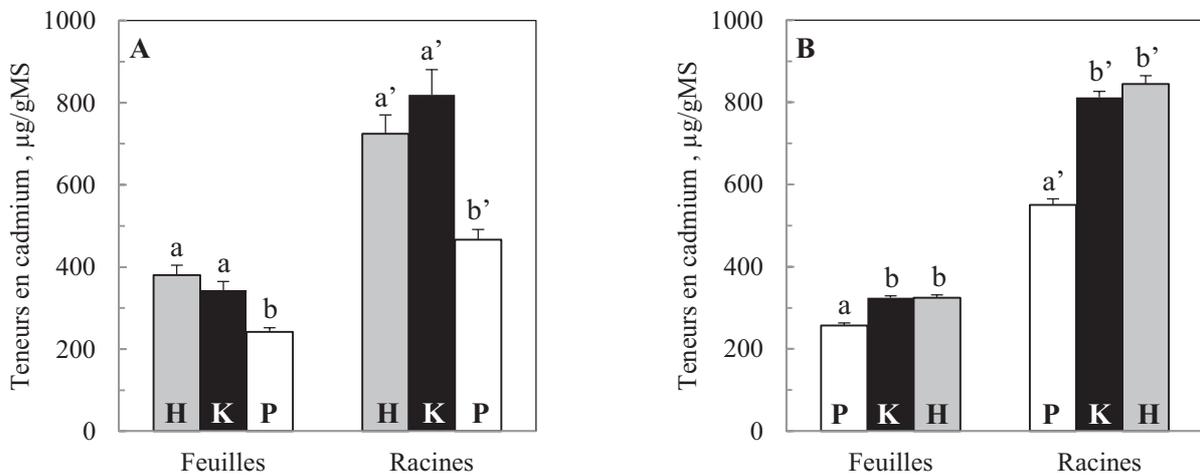
### 2.2.3. L'accumulation de cadmium

Les plantes hybrides issues des croisements effectués entre les génotypes présentant les performances extrêmes du point de vue de l'accumulation de cadmium (Kordaat et Paris Island Cos) ont été analysées pour comparer leurs comportements vis-à-vis de cadmium avec celui de leurs parents.

Les résultats de cette analyse montrent que les plantes hybrides se comportent d'une manière très similaire à celle du parent Kordaat pour le caractère d'accumulation de cadmium (Figure 5.6). En effet, il n'existe pas de différence significative entre les teneurs en cadmium de la variété Kordaat et celles des plantes hybrides aussi bien au niveau foliaire qu'au niveau racinaire. Or ces teneurs se distinguent d'une manière significative de celles de la variété Paris Island Cos. Ce résultat a été obtenu aussi bien pour le croisement Kordaat x Paris Island Cos que pour le croisement réciproque Paris Island Cos x Kordaat (Figure 5.6). Ces résultats indiquent que la capacité de maintenir une faible teneur en cadmium dans les tissus est un caractère récessif non lié au sexe.



**Figure 5.5. Analyse génétique du caractère de tolérance au cadmium:** Croissance relative des feuilles et des racines des deux variétés Roxette (R) et Delsay (D) ainsi que des plantes hybrides (H) issues des croisements Roxette ♀ x Delsay ♂ (A) et Delsay ♀ x Roxette ♂ (B) cultivées en présence de cadmium. La croissance relative des plantes traitées est exprimée en pourcentage de la croissance des plantes cultivées en absence de cadmium. Des plantes âgées de 14 jours ont été exposées à une concentration de 15  $\mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$  durant 8 jours supplémentaires de culture. Les prélèvements ont été effectués plante par plante. Les valeurs sont des moyennes de 8 répétitions.



**Figure 5.6. Analyse génétique du caractère d'accumulation du cadmium:** Teneurs en cadmium dans les racines et les feuilles des deux variétés Kordaat (K) et Paris Island Cos (P) ainsi que de plantes hybrides (H) issues des croisements Kordaat ♀ x Paris Island Cos ♂ (A) et Paris Island Cos ♀ x Kordaat ♂ (B), cultivées en présence de cadmium. Des plantes âgées de 14 jours ont été exposées à une concentration de 15  $\mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$  durant 8 jours supplémentaires de culture. Les prélèvements ont été effectués plante par plante. Les barres d'erreur correspondent aux erreurs standards. Les valeurs sont des moyennes de 8 répétitions, Les valeurs marquées par la même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 0,05 (comparaisons multiples des moyennes (Test de Tukey).

#### 2.2.4. La translocation du cadmium des racines vers les parties aériennes

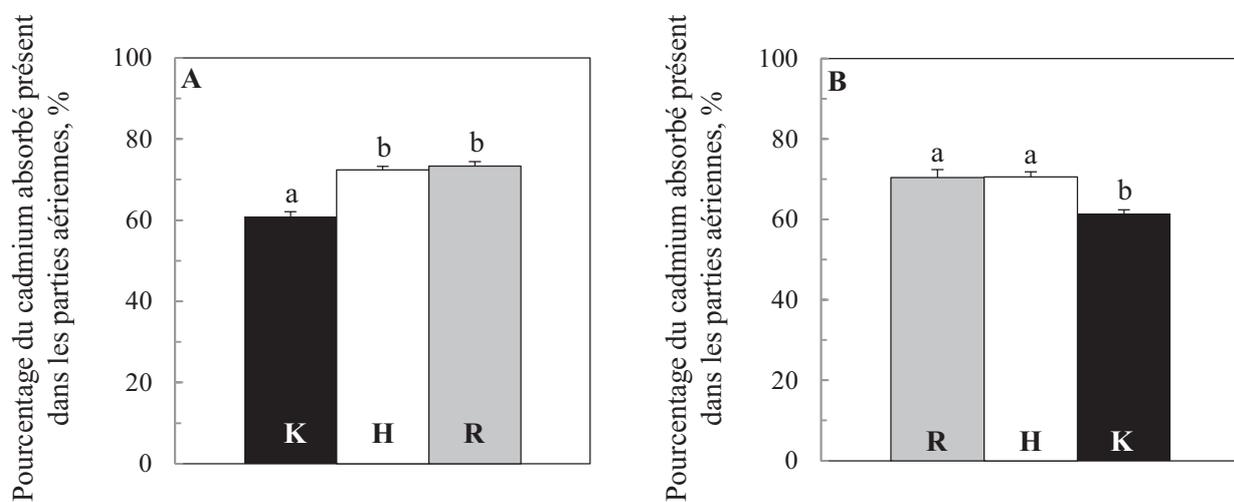
Les plantes hybrides issues des croisements effectués entre les géotypes présentant les performances extrêmes du point de vue de la translocation du cadmium des racines vers les parties aériennes (Kordaat et Red Salad Bowl) ont été analysées pour comparer leurs comportements vis-à-vis du cadmium avec celui de leurs parents.

Les résultats de cette analyse montrent que les plantes hybrides se comportent exactement de la même manière que le parent Red Salad Bowl pour le caractère de la translocation du cadmium des racines vers les parties aériennes (Figure 5.7). En effet, la quantité de cadmium transportée vers les parties aériennes est aux alentours de 70% pour la variété Red Salad Bowl ainsi que pour les hybrides alors qu'elle est voisine de 60% pour la variété Kordaat. Ce résultat a été obtenu aussi bien pour le croisement Kordaat x Red Salad Bowl ainsi que pour le croisement réciproque Red Salad Bowl x Kordaat (Figure 5.7). Ces résultats indiquent que la capacité à limiter la translocation de cadmium des racines vers les parties aériennes est un caractère récessif non lié au sexe.

### 3. Analyse des plantes F2

Afin de préciser le déterminisme, simple ou complexe, des caractères étudiés, l'analyse des plantes F1 a été complétée par une analyse des populations F2 issues des plantes F1 par autofécondation.

Pour étudier le déterminisme du caractère de tolérance au cadmium, un problème s'est posé pour l'analyse des populations F2. En effet, la variable utilisée pour estimer la tolérance au cadmium d'un géotype donné est calculée en comparant la biomasse des plantes cultivées en présence de cadmium à celle mesurée en absence de cadmium. Il est donc impossible d'évaluer dans ces conditions la tolérance au cadmium d'une plante unique donnée, et il est donc impossible d'étudier comment le caractère de tolérance au cadmium ségrège dans une population F2 en utilisant notre dispositif expérimental habituel. Nous avons alors essayé de mettre en place un nouveau système d'évaluation de la tolérance au cadmium exploitant la culture *in vitro*. L'idée était de faire pousser dans un premier temps les plantes en absence de cadmium, afin d'évaluer la croissance en condition contrôle, avant de transférer ces plantes sur un milieu contenant du cadmium pour évaluer alors la croissance en présence de cadmium. Cependant, les résultats préliminaires n'ayant pas été concluants et cette tentative a été abandonnée.



**Figure 5.7. Analyse génétique du caractère de translocation du cadmium des racines vers les parties aériennes:** Fraction du cadmium total absorbé présent dans les parties aériennes chez les deux variétés Kordaat (K) et Red Salad Bowl (R) ainsi que des plantes hybrides (H) issues des croisements Kordaat ♀ x Red Salad Bowl ♂ (A) et Red Salad Bowl ♀ x Kordaat ♂ (B) cultivées en présence de cadmium. Des plantes âgées de 14 jours ont été exposées à une concentration de 15  $\mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$  durant 8 jours supplémentaires de culture. Les prélèvements ont été effectués plante par plante. Les barres d'erreur correspondent aux erreurs standards. Les valeurs marquées par la même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil 0,05 (comparaisons multiples des moyennes (Test de Tukey)).

L'analyse des plantes F2 pour le caractère tolérance au cadmium n'a donc pas pu être réalisée. Cette analyse n'a été réalisée que pour les caractères d'accumulation de cadmium et de translocation du cadmium des racines vers les parties aériennes. Une cartographie des gènes impliqués dans le caractère d'accumulation de cadmium a aussi été tentée en collaboration avec Pr. R. Michelmore (UC Davis).

## **3.2. Accumulation de cadmium**

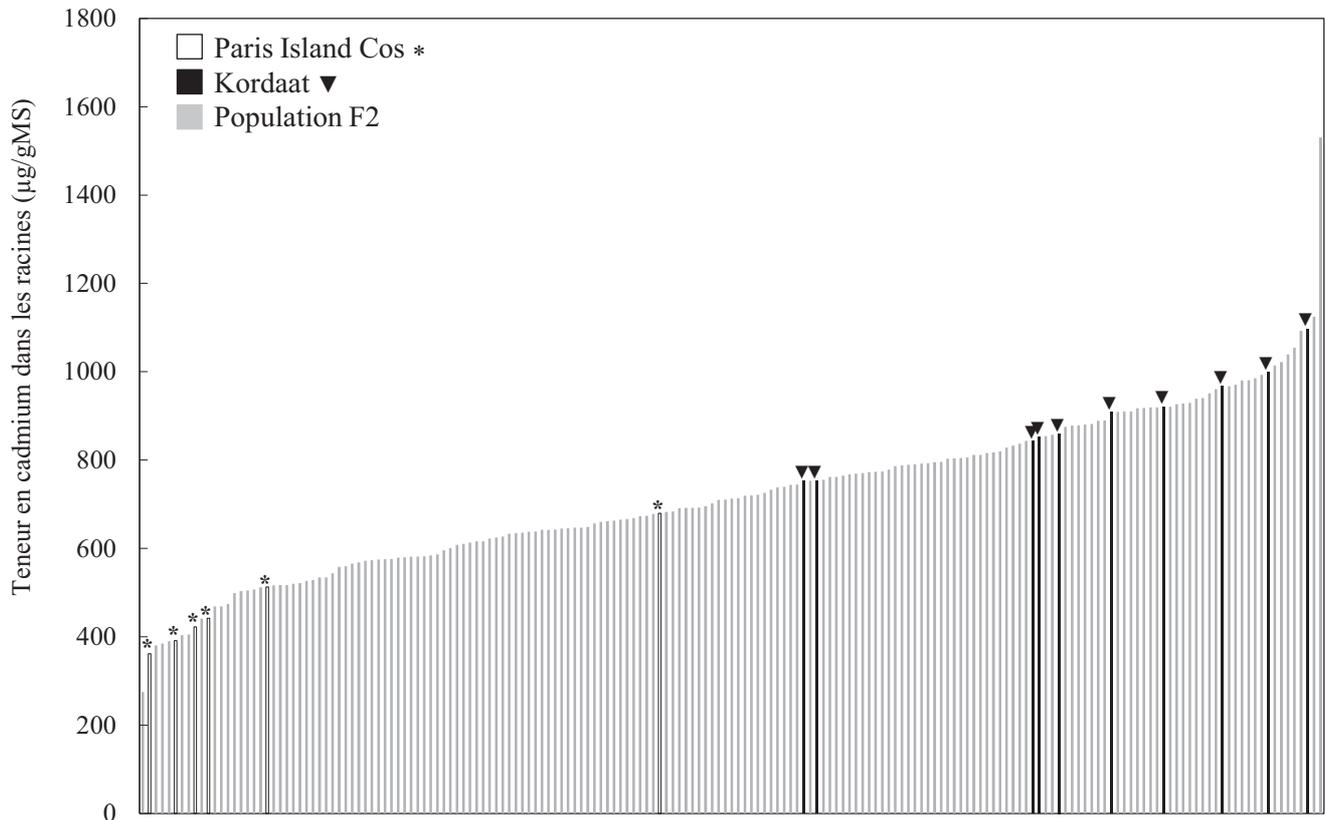
### **3.2.1. Phénotypage de la population F2**

#### **3.2.1.1. Protocole expérimental**

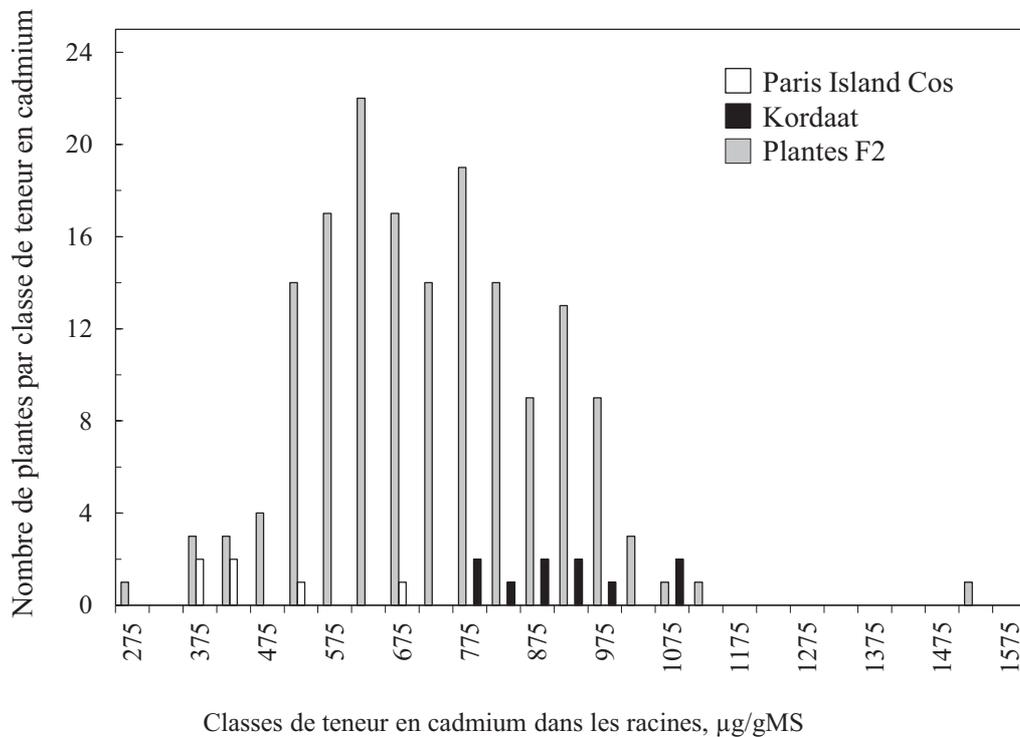
Les plantes parentales (Kordaat et Paris Island Cos) ainsi que les plantes de la ségrégation F2 ont été analysées dans les mêmes conditions que celles utilisées pour l'analyse des plantes F1, à raison de 6 individus pour la variété Paris Island Cos, de 10 individus pour la variété Kordaat et de 165 individus pour la population F2. Les racines de toutes les plantes ont été récupérées pour des mesures d'accumulation de cadmium et les parties aériennes des plantes F2 ont été récupérées pour extraire de l'ADN qui a été utilisé pour la cartographie.

#### **3.2.1.2. Résultats**

Les résultats du phénotypage de la population F2 pour le caractère d'accumulation racinaire de cadmium montrent une grande variabilité dans le comportement des plantes (Figure 5.8). Cette variabilité se perçoit lors de l'analyse des teneurs en cadmium dans les racines des plantes de génotype parental. Les 6 plantes de génotype Paris Island Cos présentent des teneurs racinaires en cadmium comprises entre 360 et 680  $\mu\text{g/g}$  MS et les 10 plantes de génotype Kordaat présentent des teneurs racinaires en cadmium comprises entre 760 et 1090  $\mu\text{g/g}$  MS. Nous avons alors déterminé le nombre de plantes par classe de teneur en cadmium accumulé dans les racines, afin de comparer la répartition phénotypique des plantes F2 par rapport à chacune des deux variétés parentales (Figure 5.9). Les résultats montrent une « superposition » de la courbe des individus F2 avec celles de deux parents (Paris Island Cos et Kordaat). Les 165 individus de la population F2 (à deux exceptions près que nous interprétons principalement comme des erreurs de mesure) présentent des teneurs racinaires comprises entre les valeurs extrêmes que l'on observe pour les parents. On ne met donc pas en évidence de phénomènes de transgression (Figure 5.8).



**Figure 5.8.** Teneur en cadmium dans les racines de plante des deux variétés Kordaat (▼) et Paris Island Cos (\*) ainsi que de la population hybride F2. Des plantes âgées de 14 jours ont été exposées à une concentration de 15 µM de CdCl<sub>2</sub> durant 8 jours supplémentaires de culture. Les prélèvements ont été effectués plante par plante. Chaque histogramme représente la mesure effectuée sur une plante.



**Figure 5.9.** Nombre de plantes par classe de teneur en cadmium dans les racines de plantes des deux variétés Kordaat et Paris Island Cos ainsi que de la population hybride F2. Des plantes âgées de 14 jours ont été exposées à une concentration de 15 µM de CdCl<sub>2</sub> durant 8 jours supplémentaires de culture. Les teneurs en cadmium dans les racines sont classées par intervalle de 50 µg/gMS. Les prélèvements ont été effectués plante par plante.

Le nombre de plantes par classe de teneur montre ainsi que la distribution phénotypique n'est pas bimodale. Ceci suggère qu'on n'est pas en présence d'un caractère simple (monohybridisme), et que l'accumulation du cadmium est vraisemblablement contrôlée par plus qu'un seul locus. Ces résultats indiquent aussi qu'à chacun des locus considérés les allèles contribuant à une accumulation élevée de cadmium sont portés par le parent Kordaat, et les allèles contribuant à une faible accumulation de cadmium sont portés par le parent Paris Island Cos. Cependant, la forte variabilité interindividuelle que nous avons observée au cours de l'analyse des parents du croisement amène à rester prudent dans les conclusions.

### **3.2.2. Cartographie des gènes impliqués dans l'accumulation de cadmium**

Suite à cette étude, un essai de cartographie des locus contrôlant l'accumulation de cadmium a été tenté en collaboration avec Pr. R. Michelmore (UC Davis).

Après plusieurs expériences préliminaires qui ont eu pour but de trouver le protocole idéal pour extraire d'ADN en quantité suffisante et qualité optimale, nous avons extrait de l'ADN des 165 plantes F2. La qualité de l'ADN extrait a été vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose et par PCR en utilisant deux amorces spécifiques du gène  $\gamma$ -GCS ( $\gamma$ -glutamylcystéine synthase) de la laitue (voir chapitre VI) (amorces L $\gamma$ -GCS Forward et L $\gamma$ -GCS Reverse (voir annexes tableau I)). La quantité d'ADN extrait a été estimée par dosage au spectrophotomètre et par électrophorèse sur gel d'agarose. Les échantillons ont ensuite été envoyés au Pr. R. Michelmore pour la réalisation de la cartographie.

Après réalisation de la cartographie, aucun QTL (Quantitative Trait Loci) contrôlant le caractère d'accumulation de cadmium dans les racines de laitue n'a pas pu être identifié. Ceci pourrait être expliqué de plusieurs manières, ce qui va être développé ultérieurement dans la discussion de ce chapitre.

## **3.3. Translocation du cadmium et du zinc des racines vers les parties aériennes**

### **3.3.1. Introduction**

Afin de préciser le déterminisme, simple ou complexe, du caractère de translocation du cadmium des racines vers les parties aériennes, les lignées parentales (Kordaat et Red Salad Bowl) ainsi que la population F2 ont été analysées.

D'après notre étude physiologique (voir chapitre IV), une variabilité intervariétale similaire a été mise en évidence pour la translocation des deux éléments cadmium et zinc. En effet, selon cette étude la variété Red Salad Bowl, qui montre la plus grande capacité à transloquer le cadmium des racines vers les parties aériennes, présente également la plus grande capacité de translocation de zinc des racines vers les parties aériennes. Par contraste, la variété Kordaat montre la capacité de translocation la plus faible pour le cadmium et le zinc. Pour cela, les teneurs en zinc ont été déterminées chez les plantes parentales (Kordaat et Red Salad Bowl) ainsi que chez les plantes de la population F2 afin de préciser aussi le déterminisme du caractère de translocation du zinc des racines vers les parties aériennes.

Ce caractère n'a pas été étudié lors de toutes les analyses précédentes, car c'est au milieu de ma thèse qu'on a jugé utile de s'intéresser à ce caractère, et ce, suite aux résultats intéressants obtenus lors de l'étude physiologique et qui montrent l'association déjà décrite entre la translocation du cadmium des racines vers les parties aériennes et celle du zinc (voir chapitre IV).

### **3.3.2. Protocole expérimental**

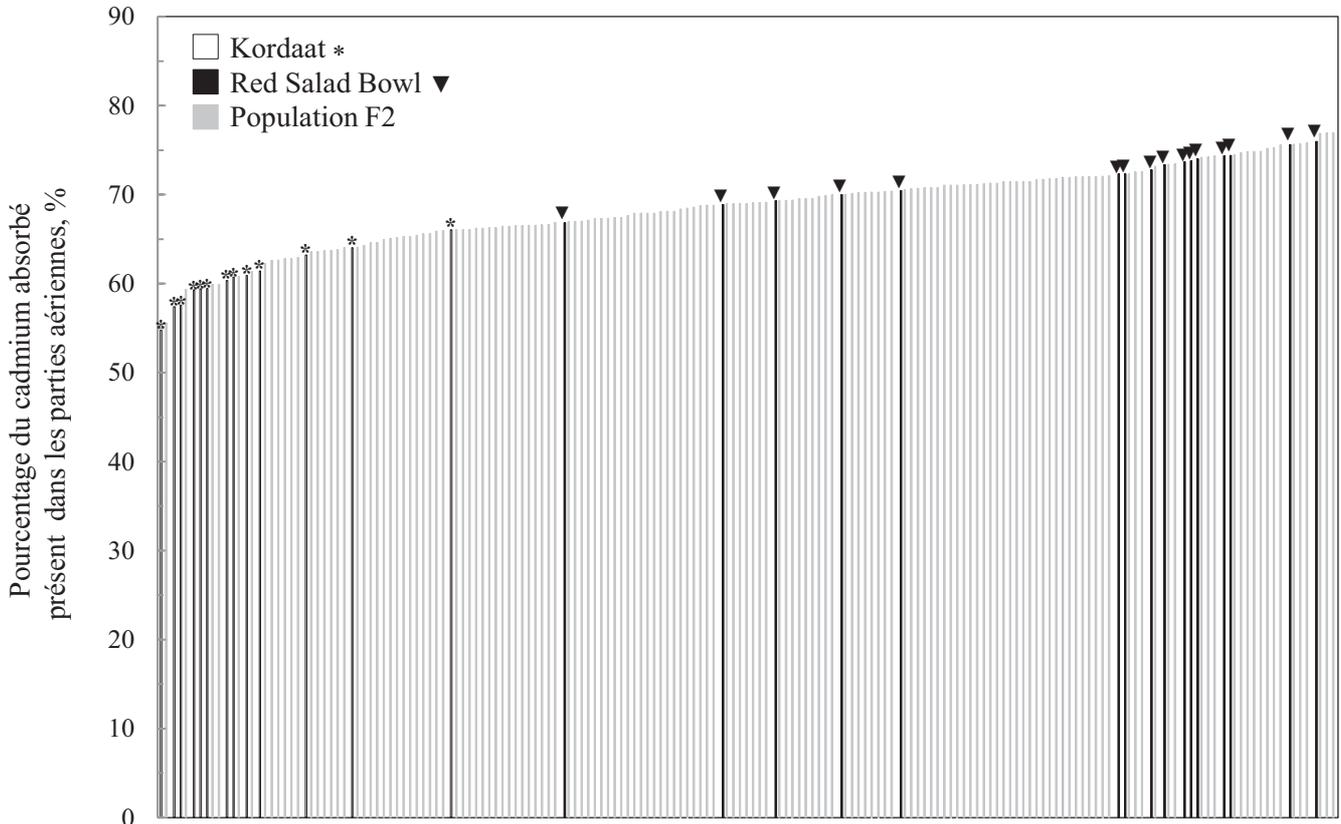
Afin de préciser le déterminisme du caractère de translocation du cadmium des racines vers les parties aériennes les plantes des génotypes parentaux Kordaat et Red Salad Bowl et les plantes de la population F2 ont été analysées dans les conditions décrites précédemment, à raison de 13 individus pour la variété Kordaat, de 16 individus pour la variété Red Salad Bowl et de 150 individus pour la population F2. La proportion du cadmium absorbé qui est présent dans les parties aériennes a été calculée après détermination des masses et des teneurs comme cela est décrit dans le chapitre II.

Pour préciser le déterminisme du caractère de translocation du zinc des racines vers les parties aériennes les teneurs en zinc ont été déterminées pour les mêmes échantillons.

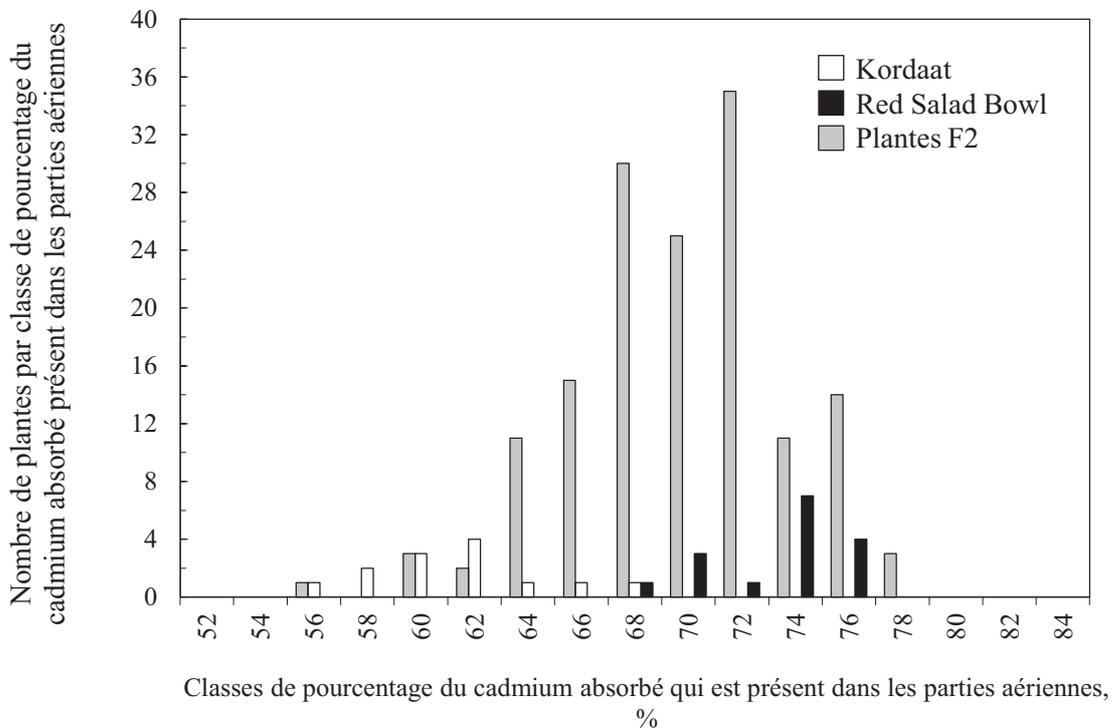
### **3.3.3. Résultats**

#### **3.3.3.1. Translocation du cadmium des racines vers les parties aériennes**

Les résultats du phénotypage de la population F2 pour le caractère de translocation du cadmium des racines vers les parties aériennes montrent une grande variabilité dans le comportement des plantes (Figure 5.10).



**Figure 5.10.** Pourcentage du cadmium absorbé par la plante et présent dans les parties aériennes pour les variétés Kordaat (\*) et Red Salad Bowl (▼) ainsi que pour les 150 plantes hybride F2. Des plantes âgées de 14 jours ont été exposées à une concentration de 15  $\mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$  durant les 8 dernières jours de culture. Les prélèvements ont été effectués plante par plante. Chaque histogramme représente la mesure effectuée sur une plante.



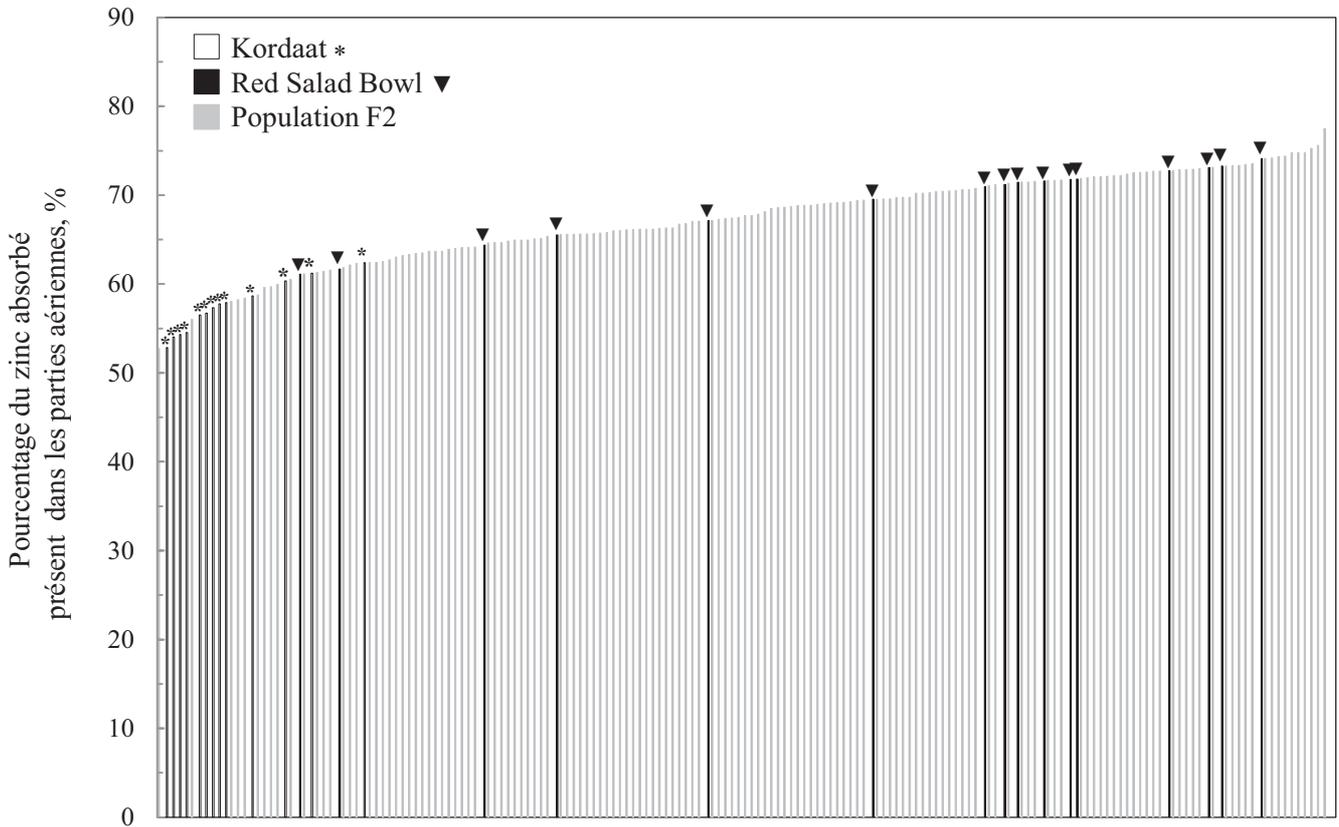
**Figure 5.11.** Nombre de plantes par classe de pourcentage du cadmium absorbé qui est présent dans les parties aériennes des variétés Kordaat et Red Salad Bowl ainsi que des 150 plantes hybride F2. Des plantes âgées de 14 jours ont été exposées à une concentration de 15  $\mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$  durant 8 jours supplémentaires de culture. Les pourcentage du cadmium absorbé qui est présent dans les parties aériennes sont classés par intervalle de 2 %. Les prélèvements ont été effectués plante par plante.

Les plantes de génotype Kordaat présentent des pourcentages de cadmium absorbé qui se trouve dans les parties aériennes comprises entre 53 et 62 % et les plantes de génotype Red Salad Bowl présentent des pourcentages de cadmium absorbé qui se trouve dans les parties aériennes comprises entre 61 et 74 %.

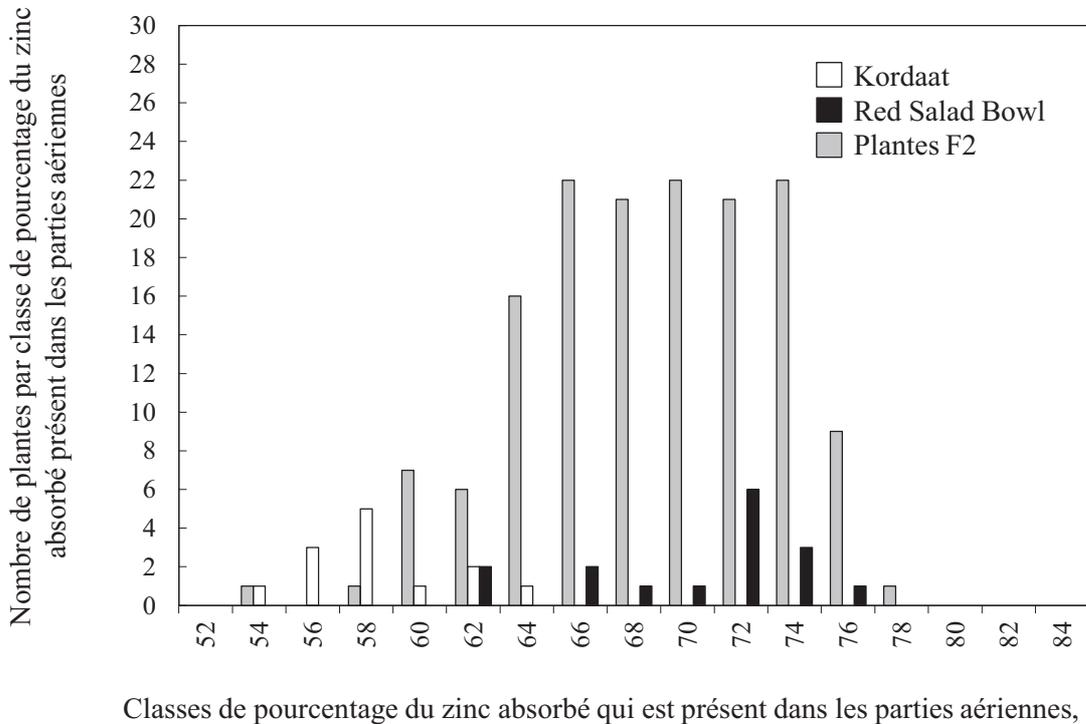
Nous avons alors déterminé le nombre de plantes par classe de pourcentage de cadmium alloué aux parties aériennes, afin de comparer la répartition phénotypique des plantes F2 à celle de chacune des deux variétés parentales (Figure 5.11). À trois exceptions près, les 150 individus F2 présentent des translocations de cadmium des racines vers les parties aériennes comprises entre celles que l'on observe pour les parents. Donc comme pour le caractère accumulation de cadmium, on ne met pas en évidence de phénomène de transgression. Les résultats montrent une « superposition » de la courbe des individus F2 avec celles des deux parents (Kordaat et Red Salad Bowl) ; avec une distribution qui n'est pas bimodale (Figure 5.11). Donc comme pour le caractère accumulation de cadmium, il ne semble pas que l'on soit en présence d'un caractère simple. Le caractère translocation du cadmium des racines vers les parties aériennes semble donc être contrôlé par plus qu'un seul locus. Cependant, comme cela a été mentionné précédemment, la forte variabilité interindividuelle observée au cours de l'analyse des parents amène à rester prudent.

### **3.3.3.2. Translocation du zinc des racines vers les parties aériennes**

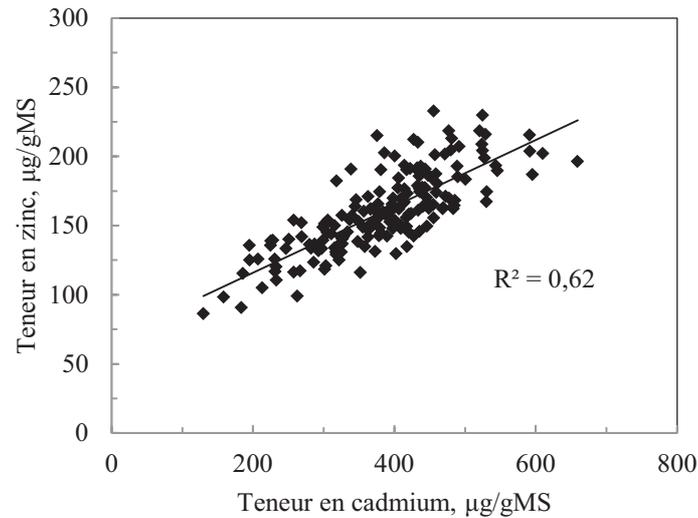
Les résultats du phénotypage de la population F2 pour le caractère de translocation du zinc des racines vers les parties aériennes rappellent beaucoup celles du cadmium (Figures 5.12 et 5.13). Ce résultat n'est pas surprenant, car la forte corrélation entre l'accumulation du cadmium et celle du zinc observée dans le chapitre IV est à nouveau observée dans cette population en ségrégation (Figures 5.14 et 5.15). Comme lors de l'étude de la translocation du cadmium, on observe une variabilité interindividuelle importante et une absence de phénomène de transgression. Par ailleurs, les résultats suggèrent qu'on n'est pas en présence d'un caractère simple et que le caractère de translocation du zinc des racines vers les parties aériennes est vraisemblablement contrôlé par plus qu'un seul locus.



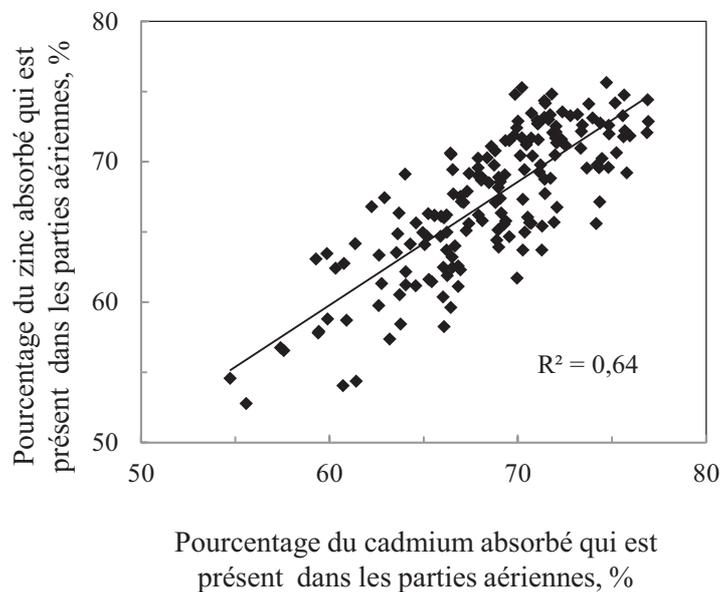
**Figure 5.12.** Pourcentage du zinc absorbé par la plante et présent dans les parties aériennes pour les variétés Kordaat (\*) et Red Salad Bowl (▼) ainsi que pour les 150 plantes hybride F2. Des plantes âgées de 14 jours ont été exposées à une concentration de 15  $\mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$  durant 8 jours supplémentaires de culture. Les prélèvements ont été effectués plante par plante. Chaque histogramme représente la mesure effectuée sur une plante.



**Figure 5.13.** Nombre de plantes par classe de pourcentage du zinc absorbé qui est présent dans les parties aériennes des variétés Kordaat et Red Salad Bowl ainsi que des 150 plantes hybride F2. Des plantes âgées de 14 jours ont été exposées à une concentration de 15  $\mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$  durant 8 jours supplémentaires de culture. Les pourcentage du zinc absorbé qui est présent dans les parties aériennes sont classés par intervalle de 2 %. Les prélèvements ont été effectués plante par plante.



**Figure 5.14.** Relation entre les valeurs individuelles des teneurs en cadmium et en zinc dans les parties aériennes de la totalité des plantes analysées lors de l'étude génétique de la translocation de cadmium et du zinc des racines vers les parties aériennes. Des plantes âgées de 14 jours ont été exposées à une concentration de  $15 \mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$  durant 8 jours supplémentaires de culture. Les prélèvements ont été effectués plante par plante. Pour mémoire le milieu contient  $15\mu\text{M}$  de  $\text{ZnSO}_4$ . L'équation de la corrélation est la suivante:  $y = 0,24x + 68$ .



**Figure 5.15.** Relation entre le pourcentage du zinc absorbé qui est présent dans les parties aériennes et le pourcentage du cadmium absorbé qui est présent dans les parties aériennes des plantes analysées lors de l'étude génétique de la translocation de cadmium et du zinc des racines vers les parties aériennes. Des plantes âgées de 14 jours ont été exposées à une concentration de  $15 \mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$  durant 8 jours supplémentaires de culture. Les prélèvements ont été effectués plante par plante. Pour mémoire le milieu contient  $15\mu\text{M}$  de  $\text{ZnSO}_4$ . L'équation de la corrélation est la suivante:  $y = 0,88x + 7,05$ .

#### 4. Discussion

Vu les ressources génomiques très limitées chez la laitue et la difficulté de la production des plantes hybrides, seulement quelques études dans le monde ont tenté d'initier une approche génétique ou bien une approche de cartographie chez cette espèce (Johnson et *al.*, 2000 ; Robbins et *al.*, 1994). Pour la thématique des métaux lourds en générale notre étude est la première dans le monde qui a tenté un tel travail chez la laitue.

L'objectif général de notre travail est de comprendre les mécanismes contrôlant les caractères de tolérance au cadmium, d'accumulation de cadmium et de translocation du cadmium des racines vers les parties aériennes chez la laitue. Pour cela, nous avons souhaité caractériser le déterminisme génétique qui contrôle ces trois caractères. Nos génotypes présentant des performances extrêmes pour ces caractères ont été utilisés comme point de départ pour cette approche génétique.

Dans les trois situations étudiées, l'analyse des plantes hybrides F1 a montré que ces plantes se comportaient de manière identique ou très voisine de celle de l'un de leurs parents. Plus précisément, nos résultats ont montré qu'on est en présence d'une dominance forte, voire absolue, des caractères qui assurent la sensibilité au cadmium, la forte accumulation du cadmium et la forte translocation du cadmium des racines vers les parties aériennes. L'analyse des croisements réciproques ayant donné le même résultat, le déterminisme des caractères étudiés n'est pas lié au sexe (c'est-à-dire qu'il n'est pas dépendant de gènes appartenant aux génomes chloroplastique ou mitochondrial de la laitue).

Dans une deuxième étape, l'analyse des plantes F2 pour les caractères d'accumulation de cadmium et de translocation du cadmium des racines vers les parties aériennes a montré que la distribution phénotypique n'était pas bimodale quel que soit le caractère considéré, indiquant que ces caractères ne présentent pas des cas typiques de monohybridisme ( $\frac{3}{4}$ ,  $\frac{1}{4}$ ). Nos résultats semblent donc privilégier l'hypothèse selon laquelle les caractères d'accumulation de cadmium et de translocation du cadmium des racines vers les parties aériennes sont contrôlés par plusieurs gènes à dominance absolue chez la laitue. Des résultats similaires ont été obtenus sur la plante modèle « hyperaccumulatrice » de cadmium *T. caerulescens* (Deniau et *al.*, 2006) ainsi que chez le riz (Tezuka et *al.*, 2010). Chez *T. caerulescens* une étude réalisée sur 129 individus constituant une population F2 a permis d'identifier la présence de 2 QTLs (donc d'au moins deux gènes) pour le caractère d'accumulation de cadmium dans les

racines. Chez le riz, 3 QTLs associés au caractère d'accumulation foliaire de cadmium ont été identifiés, d'où l'implication d'au moins 3 gènes dans ce caractère. Cependant, s'il y avait plusieurs déterminants contrôlant l'accumulation de cadmium ou la translocation de cadmium des racines vers les parties aériennes chez la laitue, les résultats que nous avons obtenus lors de l'analyse des plantes F1 indiquent d'une part que ces différents déterminants présenteraient tous une dominance absolue et d'autre part que les allèles favorables seraient tous présents dans la même lignée. Cette observation serait vraie pour les deux caractères étudiés. Même si on ne peut évidemment pas exclure qu'une telle situation puisse se rencontrer, la probabilité d'occurrence paraît cependant faible et on peut proposer une autre hypothèse pour interpréter les résultats que nous avons obtenus pour ces plantes F2. Nous avons en effet observé que les témoins analysés en même temps que la population F2 présentaient une grande variabilité phénotypique interindividuelle. Il se pourrait donc que l'analyse de nos deux populations F2 soit perturbée par la précision insuffisante du phénotypage et que cela entraîne notre incapacité à visualiser l'aspect bimodal de la distribution des phénotypes.

En ce qui concerne l'analyse du caractère d'accumulation de cadmium, un essai d'identification de locus potentiellement impliqués dans le contrôle de ce caractère (QTLs) a été réalisé. Normalement les QTLs sont détectés par analyse de co-ségrégation en établissant un lien statistique entre génotype et phénotype dans de grandes populations d'hybrides de seconde génération (F2). Comme on l'a déjà cité, plusieurs études ont permis l'identification de QTLs impliqué dans l'accumulation du cadmium (Deniau et *al.*, 2006 ; Tezuka et *al.*, 2010). Nous n'avons pas pu identifier de QTL pour le caractère d'accumulation de cadmium dans les racines de laitue. Ceci pourrait être expliqué de plusieurs manières. Une première hypothèse serait que le nombre de locus impliqués dans ce caractère est très important avec une implication très faible de chaque locus dans l'accumulation du cadmium. Une deuxième hypothèse serait que la précision de la mesure phénotypique est insuffisante, si bien qu'il y a trop de bruit de fond qui perturbe la détermination de région QTL. Et enfin, une dernière hypothèse serait que la variabilité phénotypique entre nos deux variétés extrêmes (Kordaat et Paris Island Cos) est trop faible pour pouvoir identifier des QTL. La première hypothèse doit être rejetée. Comme cela a déjà été développé ci-dessus, il est très improbable qu'une multitude de locus contrôlent le caractère d'accumulation de cadmium dans les racines car si c'était le cas, il faudrait que tous ces locus soient à

dominance stricte et que les allèles positifs soient tous présents chez le même parent. La troisième hypothèse est de fait liée à la seconde. Dire que la différence phénotypique entre les variétés Kordaat et Paris Island Cos est trop faible revient à dire qu'il est trop difficile d'établir la différence phénotypique entre elles. Or, nous n'avons jamais rencontré aucun problème pour mettre en évidence la différence d'accumulation de cadmium entre ces variétés lorsque des lots de plantes étaient analysés. Le problème de mettre en évidence une différence phénotypique entre les variétés Kordaat et Paris Island Cos est donc dû au fait que l'on analyse une seule plante prise au hasard. On en revient donc à l'hypothèse principale qui est que la précision de l'évaluation phénotypique est insuffisante. Pour améliorer cette situation, plusieurs propositions peuvent être formulées. On pourrait par exemple essayer d'utiliser une méthode de dosage du cadmium plus sensible que la spectrophotométrie à absorption atomique (la spectrophotométrie d'émission plasma par exemple (ICP)). Il n'est toutefois pas certain que cela résolve le problème car une part importante de la variabilité provient du système de culture. Une deuxième proposition serait d'essayer de trouver des conditions de culture qui permettent d'augmenter la différence phénotypique entre les deux variétés parentales. Cela pourrait être tenté en jouant sur la concentration du cadmium et/ou du zinc dans le milieu de culture par exemple. Enfin, il sera peut être nécessaire d'analyser des lots de plantes issus par autofécondation de chacune des lignées F2 que nous avons produites. Cela aura cependant pour conséquence de nécessiter un dispositif expérimental beaucoup plus important, ce qui est inenvisageable dans les conditions actuelles.

Au cours de ce travail, nous avons confirmé la corrélation entre l'accumulation du zinc et celle du cadmium déjà observée lors de notre étude physiologique. Ce résultat permet de confirmer l'hypothèse d'un transport très associé entre le cadmium et le zinc. A ce propos, l'analyse des plantes F1 issues du croisement entre les variétés présentant des variations les plus fortes de translocation du cadmium des racines vers les parties aériennes suggère qu'une moindre translocation de cadmium et de zinc serait associée à la perte de fonction d'un ou de plusieurs gènes. Ce résultat fait écho à plusieurs données de la littérature. On peut en effet proposer que la faible capacité de translocation du cadmium et du zinc chez Kordaat soit causée par une moindre capacité de charger de ces deux éléments dans le xylème. Le principal candidat pour ce genre de transport est un éventuel " orthologue fonctionnel " à *HMA4* d'*A. thaliana* chez la laitue. *HMA4* d'*A. thaliana* est un transporteur de cations bivalents tels que

Zn et Cd. Comme cela a été détaillé dans la synthèse bibliographique, Verret *et al.* (2004) montrent clairement qu'*AtHMA4* joue un rôle important dans la translocation du cadmium des racines vers les feuilles chez *A. thaliana*. Plus récemment, Hanikenne *et al.* (2008) ont attribué l'hyperaccumulation des métaux observée chez *A. halleri* à la présence de trois copies du gène *HMA4*, contre une seule copie chez *A. thaliana*, ainsi qu'à l'augmentation de l'expression de ces gènes chez *A. halleri*. La perturbation du fonctionnement de ce transporteur provoque les mêmes changements dans l'accumulation du cadmium que ceux qui sont observés dans l'accumulation du zinc (Wong *et al.*, 2009). Le gène *HMA4* semble ainsi être un acteur majeur du transport du cadmium des racines vers les parties aériennes *in planta*. De ce fait, un éventuel " orthologue fonctionnel " à *HMA4* pourrait être le principal candidat assurant la translocation de cadmium et de zinc des racines vers les parties aériennes chez la laitue. La mise en évidence d'un tel orthologue a déjà été réalisée chez le tabac (Hayes *et al.*, 2009). Ainsi, des mutations ou des variations d'expression de ce gène pourraient être à la base des différences au niveau de la translocation de ces deux éléments entre les différentes variétés de laitue étudiées.

En conclusion, l'approche génétique que nous avons conduite a permis de progresser un peu dans la compréhension des mécanismes contrôlant la tolérance au cadmium, l'accumulation de cadmium et la translocation du cadmium des racines vers les parties aériennes chez la laitue. Il apparaît qu'il serait souhaitable d'améliorer le dispositif expérimental pour améliorer la précision des mesures phénotypiques et pouvoir valoriser le travail novateur qui a été entrepris. Il convient en effet de noter qu'il s'agit là de la première étude qui a été réalisée dans le monde pour caractériser ce type de caractère chez la laitue.

## Chapitre VI

### Recherche des gènes candidats impliqués dans le contrôle de l'accumulation de cadmium



## **Chapitre VI: Recherche des gènes candidats impliqués dans le contrôle de l'accumulation de cadmium**

### **1. Introduction**

Dans le but de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans l'accumulation du cadmium chez la laitue, nous avons complété les approches d'analyse de la diversité, de physiologie et de génétique par une approche moléculaire. Cette approche avait comme objectif l'identification de corrélations, si elles existent, entre l'accumulation de cadmium dans les racines et/ou les feuilles et le niveau d'expression de gènes candidats décrits chez les espèces modèles comme impliqués dans le contrôle de l'accumulation de cadmium. Cette approche a été déclinée en trois étapes. Une recherche bibliographique a d'abord permis d'identifier des gènes réputés contrôler l'accumulation de cadmium. Le clonage de fragments de gènes de laitue orthologues à ces gènes candidats a ensuite été entrepris, puis les séquences correspondantes ont été déterminées. Le niveau d'expression de ces gènes a enfin été évalué par PCR quantitative et comparé aux teneurs en cadmium mesurées dans les racines et/ou les feuilles. Puisque notre étude physiologique a permis d'émettre l'hypothèse d'un transport très associé entre le cadmium et le zinc, des mesures des teneurs de zinc ont aussi été effectuées afin de confirmer cette hypothèse.

### **2. Recherche bibliographique des gènes contrôlant l'accumulation de cadmium**

Pour trouver une liste de gènes candidats susceptibles d'être impliqués dans le contrôle de l'accumulation de cadmium, nous avons d'abord cherché des publications en utilisant les mots clés "overexpression, gene, accumulation, cadmium et plant". Les publications correspondantes ont été analysées avec l'objectif de sélectionner les gènes qui pouvaient être impliqués dans le contrôle de l'accumulation de cadmium. Comme notre moyen d'étude des gènes candidats allait être de mesurer le niveau de transcrits par PCR quantitative, nous n'avons pris en considération que les gènes candidats pour lesquels des variations de l'expression avaient pour conséquence des variations de teneur en cadmium. Des gènes candidats susceptibles de jouer un rôle dans le transport ou l'accumulation de cadmium mais dont l'expression n'avait pas d'incidence démontrée sur l'accumulation de cadmium ont été écartés.

Cette étude bibliographique a permis de sélectionner les gènes *HMA4*, *IRT1* et *PDR8* qui sont des transporteurs de métaux, et les gènes GS (glutathion synthase) et  $\gamma$ -GCS ( $\gamma$ -glutamylcystéine synthase) qui interviennent dans la synthèse du glutathion, précurseur de la synthèse des phytochélatines.

Comme cela a été détaillé dans la synthèse bibliographique, *HMA4* code une ATPase plasmalemmique à zinc et à cadmium qui est exprimée dans les tissus entourant les vaisseaux des racines. *HMA4* joue un rôle important dans la translocation du cadmium des racines vers les parties aériennes chez *A. thaliana* et *A. halleri* (Verret et al., 2004 ; Hanikenne et al., 2008). *PDR8* code un transporteur de type ABC qui contrôle l'efflux du cadmium hors des cellules aussi bien au niveau foliaire qu'au niveau racinaire (Kim et al., 2007). Le gène *IRT1* code un transporteur de fer de la famille ZIP dont on suppose qu'il est la principale voie d'entrée du cadmium dans les racines (Connolly et al., 2002). Les phytochélatines possèdent une très forte affinité pour certains ions métalliques, et particulièrement le cadmium, elles sont donc capables de former des complexes stables avec ces métaux (Cobbett, 2000). Chez les plantes, les phytochélatines chélatent le cadmium et les complexes PC-Cd sont ensuite adressés à la vacuole, diminuant ainsi la toxicité de cadmium dans le cytoplasme et les différents organites (Cobbett, 2000). Les complexes PC-Cd sont aussi retrouvés dans le xylème et dans le phloème. Ils interviennent potentiellement dans les transports de cadmium à longue distance (Ueno et al., 2008). L'expression des deux enzymes impliqués dans la biosynthèse du glutathion (la glutathion synthase et la  $\gamma$ -glutamylcystéine synthase) semble être l'étape limitante pour la synthèse des phytochélatines (Zhu et al., 1999a ; Zhu et al., 1999b) (voir Chapitre I : Synthèse bibliographique).

### **3. Recherche des séquences des orthologues aux gènes candidats chez la laitue**

Afin de pouvoir étudier chez la laitue l'expression des gènes orthologues aux gènes candidats par PCR quantitative, il faut commencer par identifier les séquences de ces gènes. Il faut aussi disposer de gènes "contrôles" dont l'expression est stable et qui serviront pour la normalisation de l'expression des gènes candidats.

### 3.1. Recherche de séquences de laitue dans les bases de données

#### 3.1.1. Recherche des séquences des gènes contrôle

La PCR quantitative demande l'utilisation d'un gène qui présente une expression stable dans toutes les conditions et qui servira pour la normalisation de l'expression des gènes d'intérêt. Nous avons choisi de tester 2 gènes, qui sont la Triose Phosphate Isomérase (*TPI*) et l'*Actine2* (*Actin2*). Notre choix s'est porté sur l'*Actine2* car ce gène est considéré comme un gène à expression stable chez *A. thaliana*, en plus un orthologue à un gène d'*Actine2* est disponible chez la laitue et a déjà été utilisé par une équipe de recherche pour des expériences de RT-PCR semi-quantitatives (He et al., 2005). Afin d'augmenter nos chances de réussite, nous avons ajouté un deuxième gène, la Triose Phosphate Isomérase. Ce gène est lui aussi connu chez la laitue et il a déjà été utilisé par une équipe de recherche pour des expériences de RT-PCR semi-quantitatives faites chez la laitue (Bennett et al., 2002). Dans les deux publications citées, les gènes de la Triose Phosphate Isomérase et de l'*Actine2* se sont révélés constitutivement exprimés.

#### 3.1.2. Recherche de séquences de laitue orthologues aux gènes candidats dans les bases de données

Nous avons tout d'abord cherché si des orthologues de nos gènes sélectionnés étaient connus chez la laitue en explorant les bases de données de séquences.

La méthode utilisée a consisté à rechercher des similitudes entre les séquences génomiques des gènes candidats disponibles chez *A. thaliana*, et les séquences de *L. sativa*, mais aussi d'autres espèces, présentes dans les banques de données. Dans un deuxième temps, nous avons dessiné des arbres phylogénétiques dans le but de savoir si les séquences identifiées chez la laitue étaient (ou pas) celles des gènes strictement orthologues à celles des gènes candidats d'*A. thaliana*.

La recherche de similitude a été faite dans la banque de données de Genbank regroupant des séquences non redondantes (banque de données "nr") et les ESTs (expressed sequence tags) (banque de données "dbest"), en utilisant différents programmes selon l'ordre suivant: Blastn, Blastx et tBlastn. Les séquences de laitue présentant les plus grandes similarités avec celles de nos gènes candidats ont été trouvées dans la banque de données dbest en utilisant le logiciel tBlastn. Les séquences EST de laitue identifiées de cette façon ont été assemblées avec le logiciel

CAP3 (Sequence Assembly Program <http://pbil.univ-lyon1.fr/cap3.php>). Ces séquences ont ensuite été traitées par le logiciel Phylip pour dresser les arbres phylogénétiques en utilisant trois méthodes de calcul pour chacun des arbres (méthode de maximum de vraisemblance, méthode des distances et méthode de parcimonie).

Suite à cette étude bioinformatique nous avons identifié les éléments suivants.

- Il existe une séquence de laitue orthologue à la séquence du gène d'*A. thaliana* codant la  $\gamma$ -Glutamylcystéine synthase. Chez toutes les espèces végétales, et notamment chez *A. thaliana*, ce gène est un gène unique (il n'appartient pas à une famille multigénique).
- Pour les autres gènes candidats (*HMA4*, *IRT1*, *PDR8*), l'étude des séquences EST de laitue a permis d'identifier plusieurs séquences homologues à ces gènes et notamment une qui était très similaire à *AtHMA4*, deux qui étaient très similaires à *AtIRT1* et 3 qui étaient très similaires à *AtPDR8*. Cependant, après avoir construit les arbres phylogénétiques il s'est avéré que ces séquences n'étaient pas celles des gènes strictement orthologues à nos gènes candidats (voir les détails ci-dessous).
- Pour le gène codant la glutathion synthase (GS) on n'a pas trouvé de séquence homologue chez la laitue.

### **3.2. Identification et clonage par PCR des gènes de laitue orthologues aux gènes contrôle et aux gènes d'intérêt**

Dans le cas où l'analyse de séquences décrite ci-dessus a montré qu'il existait des séquences de laitue correspondant à des gènes contrôle ou à des gènes d'intérêt (cas des gènes Actine2, triose phosphate isomérase (TPI) et  $\gamma$ -Glutamylcystéine synthase ( $\gamma$ -GCS)), nous avons cherché à cloner les fragments correspondants. Ceci était une étape nécessaire pour tester la spécificité des amorces qui seront définies ultérieurement pour l'expérience PCR quantitative (voir partie résultats ci-dessous).

Dans les cas où l'analyse de séquences décrite ci-dessus a montré qu'il n'existait pas de séquence de laitue correspondant aux gènes d'intérêt, nous avons essayé de cloner ces gènes de laitue orthologues à nos gènes d'intérêt en utilisant une approche PCR. Cette approche est détaillée ci-dessous. Une fois clonés, les fragments étaient

séquencés pour s'assurer qu'il s'agissait de la bonne séquence puis les clones étaient utilisés pour caractériser la spécificité des amorces.

Pour le clonage, les fragments de gènes ont été amplifiés par PCR à partir d'ADN génomique de laitue, en utilisant des amorces spécifiques pour chacun des gènes (voir tableau I dans les annexes). Ils ont ensuite été purifiés puis ligués dans un vecteur. Le produit de ligation a été transformé par choc thermique dans des bactéries *E. coli* thermocompétents. L'intégrité de l'insert a été vérifiée sur des précultures de colonies bactériennes par PCR. Enfin, l'ADN plasmidique des colonies bactériennes criblées a été extrait puis séquencé (voir Chapitre II Matériels et méthodes).

### 3.2.1. Clonage des gènes candidats

#### 3.2.1.1. Les premiers essais de clonage des gènes candidats

Lors de nos premiers essais de clonage des gènes candidats, nous avons défini des amorces de la façon suivante:

- Dans le cas du gène  $\gamma$ -GCS les amorces ont été définies à partir de la séquence de laitue correspondant à ce gène et présente dans les banques de données.
- Dans le cas des autres gènes candidats (*GS*, *HMA4*, *IRT1* et *PDR8*) les essais d'amplification ont été effectués en utilisant des amorces définies dans des régions conservées entre les séquences des gènes identifiés chez différentes espèces, notamment des Brassicacées (*A. thaliana* et *A. halleri*).

Dès les premiers essais, les clonages ont été effectués avec succès pour deux de nos gènes ( $\gamma$ -GCS et *GS*). Suite à ces clonages, nous avons pu trouver des séquences des gènes strictement orthologues à ces deux gènes chez la variété Paris Island Cos. Par contre, après plusieurs tentatives nous n'avons pas pu trouver des séquences de gènes strictement orthologues chez la laitue aux gènes *IRT1*, *HMA4* et *PDR8* en utilisant les amorces définies chez les Brassicacées.

#### 3.2.1.2. Les deuxièmes essais de clonage des gènes candidats

Suite à l'échec rencontré pour l'identification de gènes strictement orthologues aux gènes *IRT1*, *HMA4* et *PDR8* chez la laitue, nous avons entrepris une étude bioinformatique plus poussée et systématique pour analyser les familles des transporteurs HMA, ZIP (dont fait partie *IRT1*) et ABC (dont fait partie *PDR8*).

L'objectif de cette analyse était de vérifier la présence de gènes strictement orthologue aux gènes *IRT1*, *HMA4* et *PDR8* chez des espèces dont le génome est entièrement séquencé autres que les Brassicacées (notamment le riz, la vigne et le peuplier).

### 3.2.1.2.1. Recherche bioinformatique des gènes candidats chez les espèces dont le génome est entièrement séquencé autres que les Brassicacées

Chez les trois espèces dont le génome est entièrement séquencé (riz, vigne et peuplier) la recherche de séquences de gènes orthologues à *IRT1*, *HMA4* et *PDR8* a été effectuée dans la banque de données Genbank ainsi que dans les banques de données appropriées pour chacune d'entre elles:

pour le peuplier: JGI *Populus trichocarpa*

[http://genome.jgi-psf.org/Poptr1\\_1/Poptr1\\_1.home.html](http://genome.jgi-psf.org/Poptr1_1/Poptr1_1.home.html)

pour la vigne (*Vitis vinifera*): Grape Genome Browser

<http://www.genoscope.cns.fr/externe/GenomeBrowser/Vitis/>

pour le riz: *Oryza sativa* database

<http://orygenesdb.cirad.fr/>

Afin de choisir les gènes les plus proches phylogénétiquement de nos gènes candidats, les séquences identifiées ont été étudiées une par une, comparées aux autres séquences, et positionnées sur des arbres phylogénétiques pour avoir une idée sur leurs emplacements par rapport à nos gènes candidats.

Selon leur disponibilité, des séquences d'autres espèces ont été utilisées pour renforcer les arbres phylogénétiques.

#### 3.2.1.2.1.1. Les transporteurs de la famille HMA

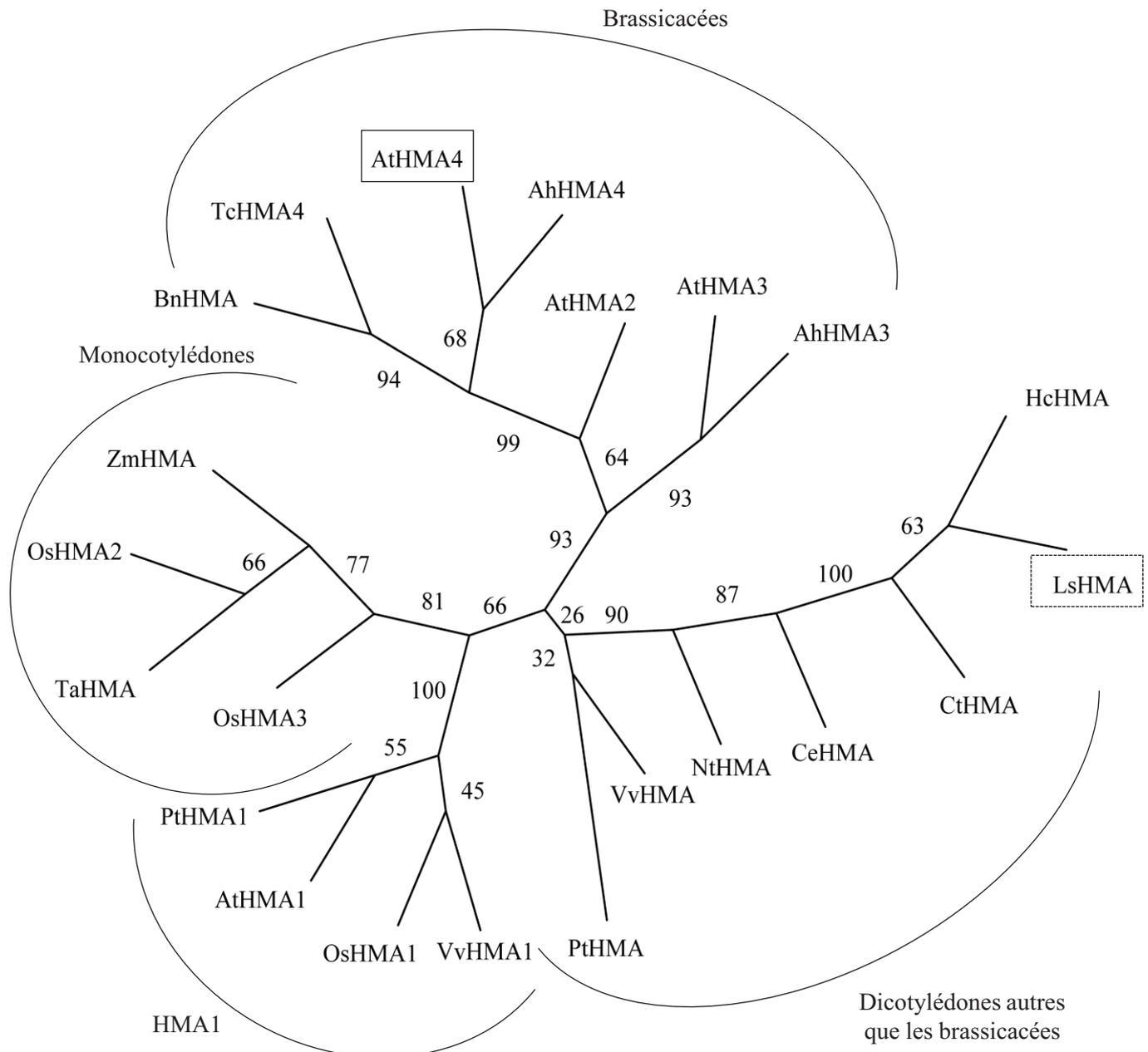
Pour la famille HMA, nous nous sommes concentrés sur les gènes nommés *HMA1*, 2, 3 et 4 d'*A. thaliana*. Les gènes *HMA2*, 3 et 4 d'*A. thaliana* jouent un rôle dans le transport du Zn et du Cd, et le gène *HMA1* est plutôt impliqués dans le transport de  $\text{Cu}^+$  (Baxter et al., 2003). Ce gène et tous ses orthologues ont été utilisés comme un « outgroup » dans l'analyse phylogénétique. Nous avons écarté de l'analyse les gènes *HMA5*, 6, 7 et 8 d'*A. thaliana* qui sont aussi des ATPases à cuivre mais qui sont phylogénétiquement plus éloignées que *HMA1* des ATPases à Zn/Cd.

L'analyse des séquences *HMA* que nous avons identifiées dans les bases de données permet de produire l'arbre phylogénétique 6.1 qui révèle la présence de 4 sous arbres clairement isolés les uns des autres comme en témoignent les valeurs de bootstrap de 100. Un premier sous arbre regroupe les gènes *HMA1* de toutes les espèces végétales. Les autres *HMA*s se répartissent dans trois sous-arbres. L'un d'entre eux regroupe tous les gènes *HMA2*, *HMA3* et *HMA4* de Brassicacées exclusivement (*A. thaliana*, *A. halleri*, *B. napus* et *T. caerulescens*). Le second d'entre eux regroupe les gènes *HMA*s de monocotylédones et le dernier d'entre eux regroupe exclusivement les *HMA*s des dicotylédones qui ne sont pas des Brassicacées. En particulier, aucun gène *HMA* des deux plantes dicotylédones dont le génome est entièrement séquencé, la vigne (*V. vinifera*) et le peuplier (*P. trichocarpa*), ne figure dans le groupe des *HMA*s de Brassicacées. Les gènes *HMA* (*HMA 2*, *3* et *4*) des Brassicacées constituent donc vraiment un groupe spécifique aux plantes de cette famille botanique. Dans ce contexte, on ne peut probablement pas espérer trouver de séquence *HMA* de laitue présentant une orthologie stricte avec la séquence *HMA4* d'*A. thaliana*. Il semblerait donc que la séquence *HMA* de laitue trouvée dans les banques de données est celle de " l'orthologue fonctionnel " au gène *HMA4*. On a donc décidé d'utiliser cette séquence pour l'expérience de PCR quantitative.

### 3.2.1.2.1.2. Les transporteurs de la famille ZIP

Concernant l'analyse bioinformatique des transporteurs de la famille ZIP, nous nous sommes concentrés sur les gènes *AtIRT1* et *AtIRT2* ainsi que sur les membres de la famille ZIP les plus proches phylogénétiquement de ces deux gènes, notamment *AtZIP7*, *AtZIP8* et *AtZIP10*.

L'étude bioinformatique que nous avons menée a permis de produire l'arbre phylogénétique 6.2 qui révèle la présence de 2 sous arbres clairement isolés (bootstrap = 87). Le premier sous arbre regroupe les gènes *IRT1* et *IRT2*, leurs orthologues stricts identifiés chez les Brassicacées ainsi que *ZIP8* d'*A. thaliana*. Le 2<sup>e</sup> sous arbre regroupe exclusivement des IRTs des autres espèces ainsi que le *ZIP10* et le *ZIP7* d'*A. thaliana*. Donc ceci montre l'absence de gène strictement orthologue au gène *IRT1* chez les espèces autres que les Brassicacées, et notamment chez les plantes dicotylédones dont le génome est entièrement séquencé, la vigne (*V. vinifera*) et le peuplier (*P. trichocarpa*).



### Arbre phylogénétique 6.1. Arbre phylogénétique de la famille des transporteurs HMA.

L'alignement a été réalisé sur les séquences protéiques grâce au logiciel Multalign. L'arbre phylogénétique a ensuite été construit en utilisant le package de programmes de phylogénie PHYLIP « Phylogeny Inference Package » (PHYLIP, Department of Genetics, University of Washington, Seattle). Les associations entre les séquences ont été estimées avec les programmes PROTDIST, PROTPARS et PROML de PHYLIP en utilisant différentes méthodes d'estimation (la méthode des distances, la méthode de parcimonie et la méthode de maximum de vraisemblance). L'arbre représenté a été construit en utilisant la méthode de maximum de vraisemblance, mais des résultats comparables ont été obtenus en utilisant la méthode des distances et méthode de parcimonie. La signification statistique a été testée avec l'analyse de bootstraps réalisée par les programmes SEQBOOT et CONSENSUS de PHYLIP. La représentation est celle de l'arbre consensus intégrant les groupements les plus fréquents entre 100 arbres phylogénétiques. Les nombres indiquent les valeurs de bootstrap. La représentation graphique de l'arbre a été faite par le programmes DRAWTREE de PHYLIP.

Le gène *AhHMA4* est présent en 3 exemplaires quasiment similaires dans le génome d'*A. halleri*, une seule des 3 séquences a été utilisé pour dresser cet arbre.

## Numéros d'accèsion des séquences de l'arbre phylogénétique 6.1

Nom du gène	Espèce	Famille	Numéros d'accèsion
<i>AtHMA1</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Brassicacées	NM_119890
<i>AtHMA2</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Brassicacées	NM_119157
<i>AtHMA3</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Brassicacées	AY434729
<i>AtHMA4</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Brassicacées	NM_127468
<i>AhHMA4</i>	<i>Arabidopsis halleri</i>	Brassicacées	DQ221101
<i>AhHMA3</i>	<i>Arabidopsis halleri</i>	Brassicacées	AJ556182
<i>TcHMA4</i>	<i>Thlaspi caerulescens</i>	Brassicacées	AJ567384
<i>BnHMA</i>	<i>Brassica napus</i>	Brassicacées	EV020980
<i>OsHMA1</i>	<i>Oryza sativa</i>	Poacées	OS06G47550
<i>OsHMA2</i>	<i>Oryza sativa</i>	Poacées	OS06G48720
<i>OsHMA3</i>	<i>Oryza sativa</i>	Poacées	OS07G12900
<i>ZmHMA</i>	<i>Zea mays</i>	Poacées	EC878280
<i>TaHMA</i>	<i>Triticum aestivum</i>	Poacées	DQ490135
<i>HcHMA</i>	<i>Helianthus ciliaris</i>	Astéracées	EL420033
<i>CeHMA</i>	<i>Cichorium endivia</i>	Astéracées	EL346642
<i>LsHMA</i>	<i>Lactuca sativa</i>	Astéracées	Contig BQ868009 BQ870513 BQ867625
<i>CtHMA</i>	<i>Carthamus tinctorius</i>	Astéracées	EL379357
<i>NtHMA</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>	Solanacées	Contig
<i>VvHMA</i>	<i>Vitis vinifera</i>	<i>Vitaceae</i>	XM_002266529
<i>VvHMA1</i>	<i>Vitis vinifera</i>	<i>Vitaceae</i>	XM_002278513
<i>PtHMA</i>	<i>Populus trichocarpa</i>	Salicacées	gw1.VI.1514.1
<i>PtHMA1</i>	<i>Populus trichocarpa</i>	Salicacées	XM_002310080



## Numéros d'accèsion des séquences de l'arbre phylogénétique 6.2

Nom du gène	Espèce	Famille	Numéros d'accèsion
<i>AtIRT1</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Brassicacées	NM_118089
<i>AtIRT2</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Brassicacées	NM_001036593
<i>AtZIP7</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Brassicacées	NM_126440
<i>AtZIP8</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Brassicacées	NM_148089
<i>AtZIP10</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Brassicacées	NM_102864
<i>AhIRT1</i>	<i>Arabidopsis halleri</i>	Brassicacées	AJ580312
<i>AhIRT2</i>	<i>Arabidopsis halleri</i>	Brassicacées	AY960755
<i>TcIRT1</i>	<i>Thlaspi caerulescens</i>	Brassicacées	AM293350
<i>TcIRT2</i>	<i>Thlaspi caerulescens</i>	Brassicacées	AJ538344
<i>CbIRT1</i>	<i>Chorispora bungeana</i>	Brassicacées	EU330924
<i>NtIRT</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>	Solanacées	AB263746
<i>LeIRT1</i>	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Solanacées	AF136579
<i>LeIRT2</i>	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Solanacées	AF136580
<i>MxIRT</i>	<i>Malus xiaojinensis</i>	Rosacées	AY193886
<i>CsIRT</i>	<i>Cucumis sativus</i>	Cucurbitacées	AY590764
<i>DcIRT</i>	<i>Daucus carota</i>	Apiacées	AY081215
<i>PtIRT1</i>	<i>Populus trichocarpa</i>	Salicacées	FGENESH4_PG.C_LG_XV000907
<i>PtIRT2</i>	<i>Populus trichocarpa</i>	Salicacées	GW1.XV.2690.1
<i>VvIRT</i>	<i>Vitis vinifera</i>	Vitaceae	GSVIVG00031915001
<i>OsIRT1</i>	<i>Oryza sativa</i>	Poacées	AB070226
<i>OsIRT2</i>	<i>Oryza sativa</i>	Poacées	AB126086
<i>LsIRTa</i>	<i>Lactuca sativa</i>	Astéracées	Contig : DY966770 DY973882 DY959627 DY973626 BQ847243
<i>LsIRTb</i>	<i>Lactuca sativa</i>	Astéracées	Contig: DY976080 DY975331 DY981227

Les deux séquences *LsIRTa* et *LsIRTb* trouvées dans les banques de données peuvent donc être considérées comme celles des " orthologues fonctionnels " aux gènes *IRT1* et *IRT2* d'*A. thaliana*. Pour cela on a décidé d'utiliser ces deux séquences pour l'expérience de PCR quantitative. Il est intéressant de signaler que grâce à cette étude bioinformatique, on a pu construire la totalité de la séquence codante du gène *LsIRTa* en assemblant plusieurs séquences EST de laitue disponibles dans la banque de données de séquences.

### 3.2.1.2.1.3. Les transporteurs de la famille ABC

Pour l'analyse bioinformatique des transporteurs de la famille ABC, nous nous sommes concentrés sur le gène *AtPDR8* ainsi que sur les deux membres de la famille PDR les plus proches phylogénétiquement de notre gène candidats (*AtPDR1* et *AtPDR7*). L'arbre phylogénétique 6.3 issu de notre étude bioinformatique révèle la présence de 3 sous arbres. Un premier sous arbre clairement isolé (bootstrap = 99) regroupe les deux gènes d'*A. thaliana* *AtPDR7* et *AtPDR8*. Un deuxième sous arbre lui aussi bien isolé (bootstrap = 95) regroupe les gènes *PDRs* de laitue trouvés dans la banque de données de séquences (*LsPDRa*, *LsPDRb* et *LsPDRc*). Un troisième sous arbre (bootstrap = 78) regroupe les gènes *PDRs* de riz, de peuplier et de vigne, ainsi que *PDR1* d'*A. thaliana*. Ceci montre l'absence de gène strictement orthologue au gène *AtPDR8* chez toutes les espèces autres que les Brassicacées, notamment chez les plantes dicotylédones dont le génome est entièrement séquencé, la vigne et le peuplier.

L'une et / ou l'autre des trois séquences *LsPDRa*, *LsIRTb* et *LsIRTc* trouvées dans les banques de données peut donc être éventuellement celle d'un "orthologue fonctionnel" à *PDR8* d'*A. thaliana*. Pour cela on a décidé d'utiliser ces trois séquences pour l'expérience de PCR quantitative.

Cette étude bioinformatique a montré l'inexistence de gènes strictement orthologues à *HMA4*, *IRT1* et *PDR8* chez les espèces dont le génome est entièrement séquencé autres que les Brassicacées (riz, vigne et peuplier). À la suite de cette conclusion, nous avons décidé de cloner les gènes *LsHMA*, *LsPDRs* et *LsIRTs* déjà identifiés dans les banques de données et qui peuvent être éventuellement les " orthologues fonctionnels " à nos gènes candidats d'*A. thaliana*.

### 3.2.1.2.2. Clonage des gènes *LsHMA*, *LsPDRs* et *LsIRTs* identifiés dans les banques de données

Pour amplifier nos gènes (*LsHMA*, *LsPDRa*, *LsPDRb*, *LsPDRc*, *LsIRTa* et *LsIRTb*) nous avons défini des amorces à partir des séquences EST de laitue trouvées dans les banques de données. Les amorces correspondant aux gènes *LsPDRs* et *LsIRTs* ont été définies dans les régions les plus divergentes possible entre les différentes versions afin de pouvoir amplifier spécifiquement chacune d'entre elles. Dans une étape ultérieure, les clonages ont été effectués avec succès pour tous les gènes et ce, chez la variété Paris Island Cos.

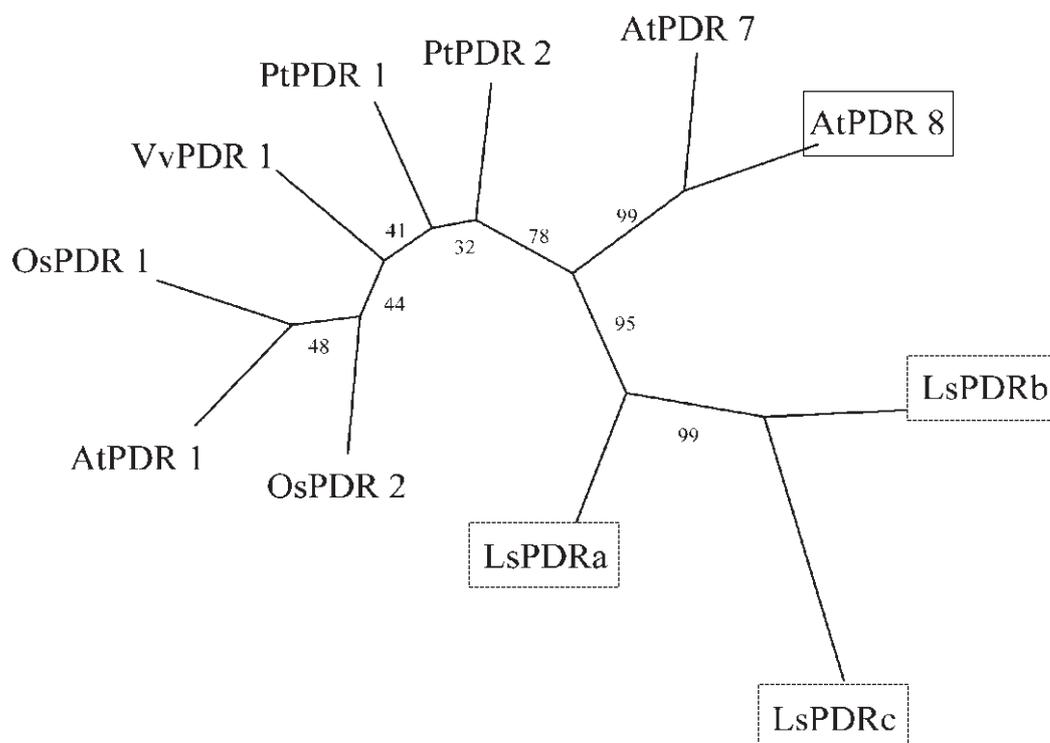
Au cours des manipulations d'amplification du gène *LsHMA* existant dans les banques de données une deuxième version du gène *LsHMA* a été identifiée par hasard. Ceci s'est vraisemblablement produit du fait d'une très forte similitude de séquence entre les deux gènes qui a permis d'amplifier la deuxième version du gène avec les amorces définies pour la première. L'arbre phylogénétique 6.4 montre la position du nouveau gène *LsHMAb* par rapport aux autres gènes de la famille HMA. Ce gène est très proche phylogénétiquement du premier gène de laitue identifié par recherche bioinformatique.

### 3.2.2. Clonage des gènes contrôle

Pour amplifier nos gènes contrôle (la Triose Phosphate Isomérase et l'Actine2) nous avons utilisé les amorces énoncées dans les deux publications He et *al.* (2005) et Bennett et *al.* (2002). Les fragments ont été amplifiés chez la variété Paris Island Cos puis clonés dans des vecteurs afin d'avoir des séquences de meilleure qualité.

### 3.2.3. Séquences des gènes chez d'autres variétés de laitue

Lors de notre étude, nous avons prévu dès le départ de nous intéresser à l'expression de nos gènes chez plusieurs variétés de laitue (voir ci-dessous). Donc le séquençage de nos fragments de gènes chez d'autres variétés de laitue était nécessaire pour définir des amorces dans des régions consensus entre les variétés étudiées lors de l'expérience de PCR quantitative. Ainsi, après clonage de nos gènes chez la variété Paris Island Cos, nous avons amplifié puis séquencé nos gènes chez 4 autres variétés de laitue (Korlaat, Red Salad Bowl, Delsay et Roxette).



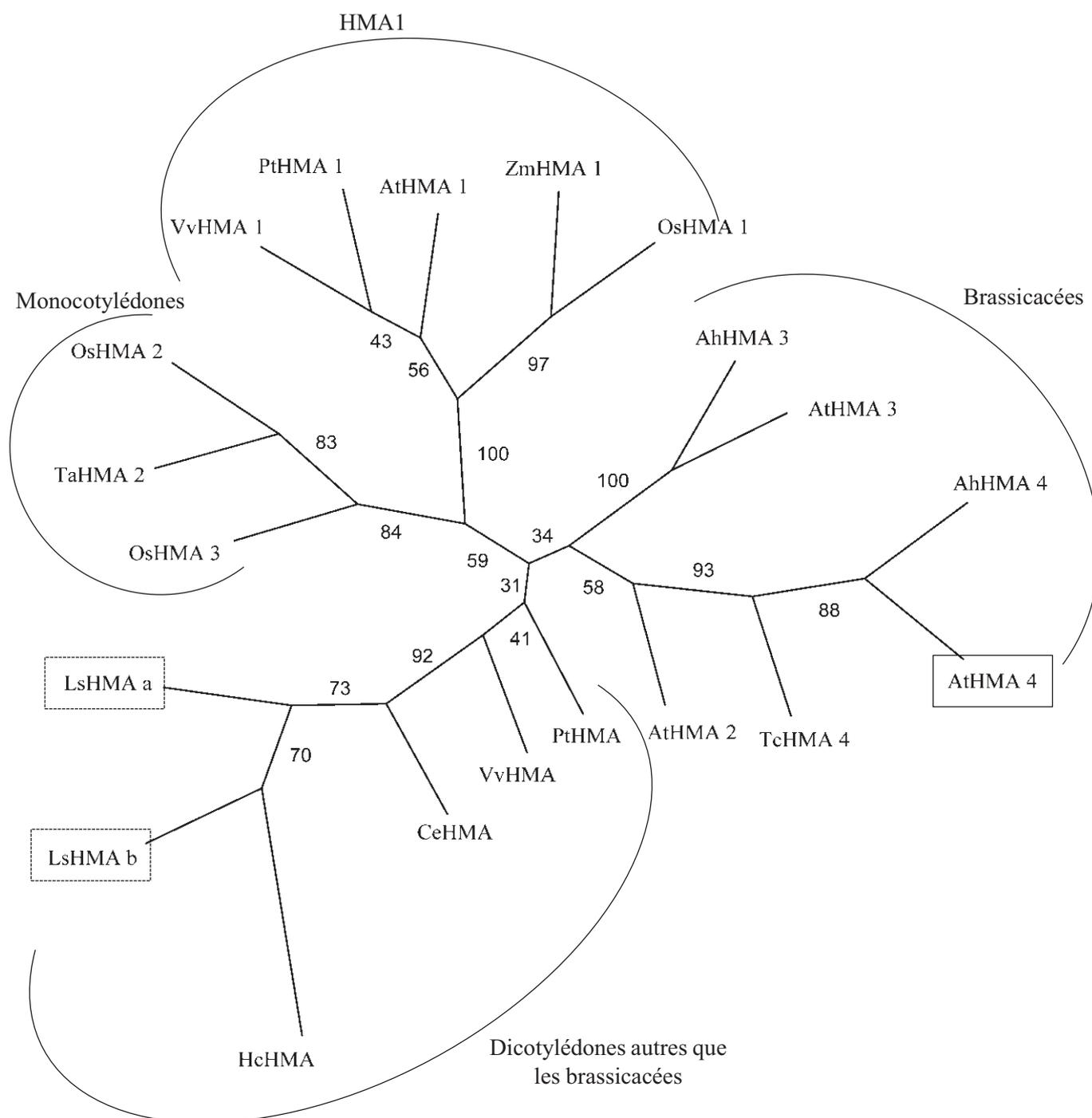
### Arbre phylogénétique 6.3. Arbre phylogénétique de la famille des transporteurs ABC.

L'alignement a été réalisé sur les séquences protéiques grâce au logiciel Multalign. L'arbre phylogénétique a ensuite été construit en utilisant le package de programmes de phylogénie PHYLIP « Phylogeny Inference Package » (PHYLIP, Department of Genetics, University of Washington, Seattle). Les associations entre les séquences ont été estimées avec les programmes PROTDIST, PROTPARS et PROML de PHYLIP en utilisant différentes méthodes d'estimation (la méthode des distances, la méthode de parcimonie et la méthode de maximum de vraisemblance). L'arbre représenté a été construit en utilisant la méthode de maximum de vraisemblance, mais des résultats comparables ont été obtenus en utilisant la méthode des distances et méthode de parcimonie. La signification statistique a été testée avec l'analyse de bootstraps réalisée par les programmes SEQBOOT et CONSENSUS de PHYLIP. La représentation est celle de l'arbre consensus intégrant les groupements les plus fréquents entre 100 arbres phylogénétiques. Les nombres indiquent les valeurs de bootstrap. La représentation graphique de l'arbre a été faite par le programmes DRAWTREE de PHYLIP.

Une deuxième séquence de vigne a été identifiée lors de notre étude bioinformatique (VvPDR2). Cette séquence n'a pas été introduire dans cette arbre car elle est très courte et peu chevauchante avec les séquences de laitue. Néanmoins la représentation d'un arbre sans séquences de laite montre une forte association entre les deux séquences de vigne trouvées.

## Numéros d'accèsion des séquences de l'arbre phylogénétique 6.3

Nom du gène	Espèce	Famille	Numéros d'accèsion
<i>AtPDR1</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Brassicacées	NM_112505
<i>AtPDR7</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Brassicacées	NM_101389
<i>AtPDR8</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Brassicacées	NM_104680
<i>LsPDRa</i>	<i>Lactuca sativa</i>	Astéracées	DY970937
<i>LsPDRb</i>	<i>Lactuca sativa</i>	Astéracées	DY975705
<i>LsPDRc</i>	<i>Lactuca sativa</i>	Astéracées	DY961303
<i>PtPDR1</i>	<i>Populus trichocarpa</i>	Salicacées	estExt_fgenesh4_pm.C_LG_III0128
<i>PtPDR2</i>	<i>Populus trichocarpa</i>	Salicacées	estExt_Genewise1_v1.C_LG_I0381
<i>VvPDR1</i>	<i>Vitis vinifera</i>	<i>Vitaceae</i>	Contig GSVIVG00034308001 GSVIVG00034319001 GSVIVG00034310001 GSVIVG00034309001 GSVIVG00034307001
<i>VvPDR2</i>	<i>Vitis vinifera</i>	<i>Vitaceae</i>	GSVIVG00034307001
<i>OsPDR1</i>	<i>Oryza sativa</i>	Poacées	OS06G36090
<i>OsPDR2</i>	<i>Oryza sativa</i>	Poacées	OS01G52560



#### Arbre phylogénétique 6.4. Arbre phylogénétique de la famille des transporteurs HMA montrant les deux gènes *LsHMA*.

L'alignement a été réalisé sur les séquences protéiques grâce au logiciel Multalign. L'arbre phylogénétique a ensuite été construit en utilisant le package de programmes de phylogénie PHYLIP « Phylogeny Inference Package » (PHYLIP, Department of Genetics, University of Washington, Seattle). Les associations entre les séquences ont été estimées avec les programmes PROTDIST, PROTPARS et PROML de PHYLIP en utilisant différentes méthodes d'estimation (la méthode des distances, la méthode de parcimonie et la méthode de maximum de vraisemblance). L'arbre représenté a été construit en utilisant la méthode de maximum de vraisemblance, mais des résultats comparables ont été obtenus en utilisant la méthode des distances et méthode de parcimonie. La signification statistique a été testée avec l'analyse de bootstraps réalisée par les programmes SEQBOOT et CONSENSUS de PHYLIP. La représentation est celle de l'arbre consensus intégrant les groupements les plus fréquents entre 100 arbres phylogénétiques. Les nombres indiquent les valeurs de bootstrap. La représentation graphique de l'arbre a été faite par le programmes DRAWTREE de PHYLIP.

## Numéros d'accèsion des séquences de l'arbre phylogénétique 6.4

Nom du gène	Espèce	Famille	Numéros d'accèsion
<i>AtHMA1</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Brassicacées	NM_119890
<i>AtHMA2</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Brassicacées	NM_119157
<i>AtHMA3</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Brassicacées	AY434729
<i>AtHMA4</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Brassicacées	NM_127468
<i>AhHMA4</i>	<i>Arabidopsis halleri</i>	Brassicacées	DQ221101
<i>AhHMA3</i>	<i>Arabidopsis halleri</i>	Brassicacées	AJ556182
<i>TcHMA4</i>	<i>Thlaspi caerulescens</i>	Brassicacées	AJ567384
<i>OsHMA1</i>	<i>Oryza sativa</i>	Poacées	OS06G47550
<i>OsHMA2</i>	<i>Oryza sativa</i>	Poacées	OS06G48720
<i>OsHMA3</i>	<i>Oryza sativa</i>	Poacées	OS07G12900
<i>ZmHMA1</i>	<i>Zea mays</i>	Poacées	BT041377
<i>TaHMA2</i>	<i>Triticum aestivum</i>	Poacées	DQ490135
<i>HcHMA</i>	<i>Helianthus ciliaris</i>	Astéracées	EL420033
<i>CeHMA</i>	<i>Cichorium endivia</i>	Astéracées	EL346642
<i>LsHMAa</i>	<i>Lactuca sativa</i>	Astéracées	Contig BQ868009 BQ870513 BQ867625
<i>LsHMAb</i>	<i>Lactuca sativa</i>	Astéracées	La 2 <sup>e</sup> Séquence <i>LsHMA</i> identifiée
<i>VvHMA</i>	<i>Vitis vinifera</i>	<i>Vitaceae</i>	XM_002266529
<i>VvHMA1</i>	<i>Vitis vinifera</i>	<i>Vitaceae</i>	XM_002278513
<i>PtHMA</i>	<i>Populus trichocarpa</i>	Salicacées	gw1.VI.1514.1
<i>PtHMA1</i>	<i>Populus trichocarpa</i>	Salicacées	XM_002310080

Pour faciliter l'étape d'amplification des nos gènes chez les 4 variétés de laitue, des amorces internes d'une meilleure qualité ont été parfois définies à partir des premières séquences que nous avons définies chez la variété Paris Island Cos. En ce qui concerne la deuxième version du gène *LsHMAb* identifiée par hasard, des amorces internes définies dans des régions divergentes entre les deux gènes *LsHMA* ont été utilisées afin d'obtenir des séquences des deux gènes *LsHMA* chez les 4 variétés.

Les résultats obtenus ont montré une très forte similitude entre les séquences des 5 variétés surtout au niveau des exons. Selon le gène, la similitude entre les séquences correspondant aux différentes variétés de laitue varie entre 98% et 100% au niveau nucléotidique. Cette forte similitude entre les séquences des gènes que nous avons sélectionnés chez les différences variétés a permis dans une étape ultérieure de définir facilement des amorces utilisables pour les expériences de PCR quantitatives pour tous les gènes.

#### 3.2.4. Conclusion

En conclusion, nos expériences nous ont permis de trouver des séquences de laitue strictement orthologues à celles des gènes  $\gamma$ -GCS, GS, *Actin2* et *TPI* d'*A. thaliana*, et ce chez les 5 variétés de laitue prises en considération dans l'analyse. Une étude bioinformatique a montré l'inexistence de gène strictement orthologue à *HMA4*, *IRT1* et *PDR8* chez les espèces dont le génome est entièrement séquencé autres que les Brassicacées (riz, vigne et peuplier). À la suite de cette conclusion, nous avons décidé de nous intéresser aux gènes de laitue les plus proches phylogénétiquement des gènes *HMA4*, *IRT1* et *PDR8* et pour lesquels des séquences de laitue étaient présentes dans la banque de données. Au cours des expériences d'amplification, une deuxième version du gène *LsHMA* a été identifiée par hasard. La séquence de ce nouveau gène a aussi été trouvée chez les 5 variétés de laitue ce qui conforte son existence. La forte similitude entre les séquences correspondant aux différentes variétés de laitue a permis dans une étape ultérieure de définir facilement des amorces pour tous les gènes.

## 4. Étude de l'expression des gènes candidats chez la laitue

### 4.1. Introduction

Cette étude avait comme objectif d'identifier des corrélations, si elles existent, entre l'accumulation de cadmium et le niveau d'expression de gènes de laitue identifiés comme orthologues ou orthologues potentiels aux gènes candidats décrits chez d'autres espèces comme impliqués dans le contrôle de l'accumulation du cadmium. Les niveaux d'expression des gènes ont été évalués par PCR quantitative et comparés aux teneurs en cadmium mesurées dans les racines et les feuilles. Puisque notre étude physiologique a permis d'émettre l'hypothèse d'un transport très associé entre le cadmium et le zinc, des mesures des teneurs en zinc ont aussi été effectuées afin de vérifier davantage cette hypothèse.

### 4.2. Protocole expérimental

Les plantes ont été cultivées en hydroponie (voir chapitre II: matériels et méthodes). Des plantes âgées de 14 jours ont été exposées pendant 8 jours supplémentaires à du  $\text{CdCl}_2$  à la concentration de  $15\mu\text{M}$ . Afin d'augmenter nos chances d'identifier des corrélations entre l'accumulation de cadmium et le niveau d'expression de nos gènes candidats, nous avons choisi d'étudier des plantes appartenant à plusieurs variétés de laitue. De cette façon, nous maximisons la variabilité d'accumulation de cadmium tout en analysant un échantillon de plantes réduit et en évitant une éventuelle redondance des données. Ainsi, 14 plantes appartenant à 14 variétés différentes ont été utilisées pour l'expérience de PCR quantitative. Nous avons pris ces 14 variétés parmi les variétés qui ont été étudiées lors de l'analyse de la diversité phénotypique. Les 2 génotypes de laitue sauvage *L. serriola* ainsi que 2 variétés *L. sativa* montrant, lors de l'analyse de la diversité phénotypique, un comportement très voisin de celui d'une autre variété du même cultigrroupe ont été retirées afin de minimiser le coût de l'expérience de PCR quantitative et de limiter les redondances (Tableau 6.1). Les récoltes ont été faites le 22<sup>e</sup> jour du traitement. Les parties aériennes et les racines de chaque plante ont été séparées et broyées dans de l'azote liquide jusqu'à obtention d'une poudre fine. Environ 100 mg de cette poudre ont été utilisés pour extraire les ARNs totaux, alors que le reste de la poudre a été utilisé pour la détermination des teneurs en cadmium et en zinc par spectrophotométrie à absorption atomique.

**Tableau 6.1.** Les 14 variétés de laitue utilisées lors de l'expérience PCR quantitative.

<b>Génotype</b>	<b>Espèce</b>	<b>Cultigroupe</b>
<b>Red Salad Bowl</b>	<i>L. sativa</i>	à couper
<b>Ruby</b>	<i>L. sativa</i>	à couper
<b>Delsay</b>	<i>L. sativa</i>	batavia
<b>Pierre Bénite</b>	<i>L. sativa</i>	batavia
<b>GL 659</b>	<i>L. sativa</i>	batavia type iceberg
<b>Roxette</b>	<i>L. sativa</i>	batavia type iceberg
<b>Saladin</b>	<i>L. sativa</i>	batavia type iceberg
<b>Cobham green</b>	<i>L. sativa</i>	beurre
<b>Pia</b>	<i>L. sativa</i>	beurre
<b>Kordaat</b>	<i>L. sativa</i>	beurre
<b>Mélina</b>	<i>L. sativa</i>	beurre
<b>Oresto</b>	<i>L. sativa</i>	beurre
<b>Paris Island Cos</b>	<i>L. sativa</i>	romaine
<b>Remus</b>	<i>L. sativa</i>	romaine

Après extraction des ARNs totaux, les échantillons ont été traités à la DNase pour éliminer l'ADN génomique résiduel, puis une transcription inverse a été réalisée sur les ARNs afin d'obtenir les ADNc (voir chapitre II: Matériels et méthodes).

Après définition des amorces (voir chapitre II: Matériels et méthodes), et avant de commencer notre expérience de PCR quantitative sur les 14 variétés de laitue, plusieurs expériences préliminaires ont été menées afin de mettre au point notre expérience. Ces expériences avaient pour but:

- (1) de vérifier la présence ou non d'ADN génomique résiduel dans les échantillons d'ARNs. Ceci a été réalisé au moyen d'une PCR classique réalisée sur les extraits d'ARN,
- (2) de vérifier la réussite de la transcription inverse. Ceci a été réalisé au moyen d'une PCR classique faite sur les échantillons d'ADNc,
- (3) de vérifier les conditions de l'amplification ainsi que la spécificité des amorces définies pour les gènes appartenant aux familles multigéniques. Ceci a été réalisé au moyen d'une PCR classique faite sur des plasmides contenant nos gènes d'intérêt,
- (4) de vérifier les conditions de l'amplification, l'efficacité et la spécificité des amorces définies pour les gènes appartenant aux familles multigéniques et le niveau d'expression de nos gènes. Ceci a été réalisé au moyen de la PCR quantitative faite sur des échantillons d'ADNc d'une seule variété.

Après les expériences de mise au point, nous avons entrepris l'étude de l'expression des gènes chez les plantes appartenant aux 14 variétés différentes par PCR quantitative. Durant cette étude, plusieurs contrôles de qualité ont été effectués pour valider la qualité de notre PCR quantitative pour chaque échantillon (voir chapitre II Matériels et méthodes):

- Vérification qu'un seul produit PCR est amplifié grâce à la courbe de fusion (melting curve). Il est ainsi possible de distinguer, grâce à cette courbe, l'existence de plusieurs amplicons (figure 2.4).
- Vérification de l'homogénéité de l'efficacité d'amplification entre les échantillons grâce à la courbe Log Qn en fonction du nombre de cycles. Si toutes les droites sont parallèles, cela signifie que l'amplification lors de la

phase exponentielle s'est produite de la même manière suivant les échantillons (figure 2.3.B).

- Vérification de l'efficacité de la PCR pour chaque échantillon. Pour valider un échantillon, il faut que les 4 points correspondant aux 4 dilutions montrent un alignement parfait sur la courbe représentant le Ct (Ct = threshold cycle) en fonction de Log Qn (Qn = quantité de matrice) (figure 2.3.C) et que l'efficacité d'amplification soit supérieure à 80%.

Tout au long de cette étude, les échantillons qui n'ont pas accompli un des critères ont été répétés jusqu'à l'obtention d'une mesure fiable.

### **4.3. Résultats**

#### **4.3.1. Expériences préliminaires**

Avant de commencer notre expérience de PCR quantitative sur les 14 variétés de laitue, plusieurs expériences ont été menées afin de mettre au point cette expérience. Les paragraphes suivants vont détailler les objectifs de ces expériences ainsi que les résultats obtenus.

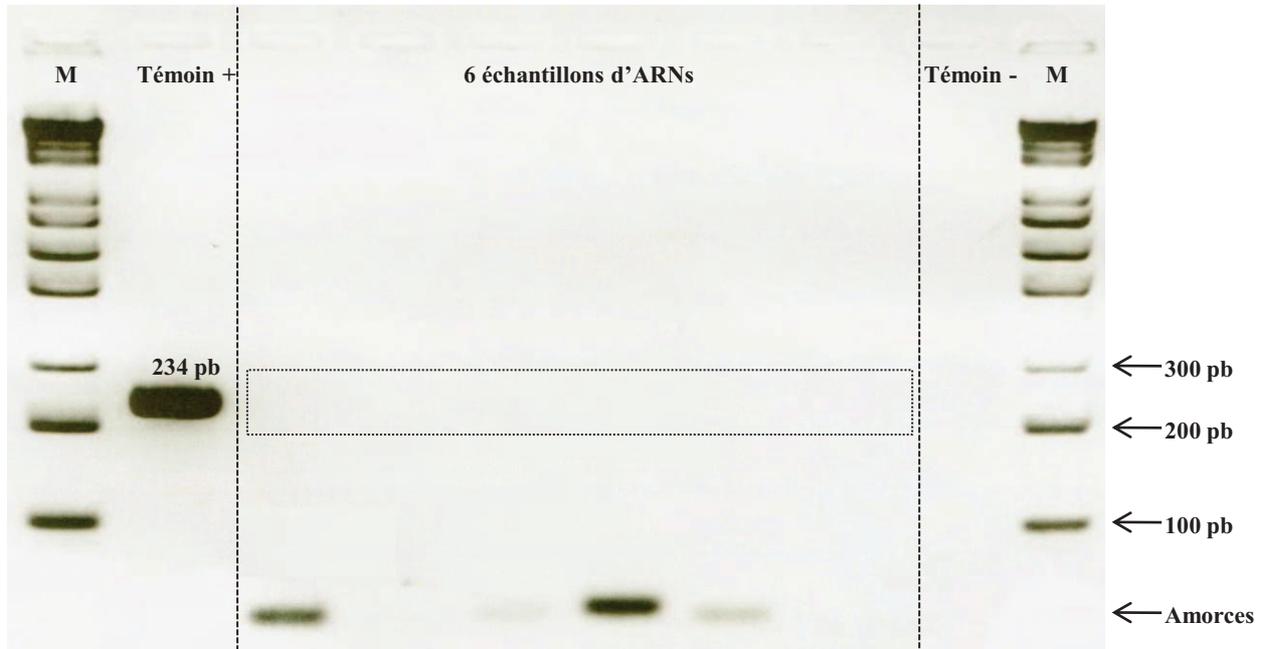
##### **4.3.1.1. Vérification de l'intégrité et de la pureté des ARNs**

L'objectif de cette étape était de vérifier l'intégrité (la non-dégradation) et de la pureté des échantillons d'ARNs (l'absence d'ADN génomique résiduel).

Après traitement des échantillons d'ARNs à la DNase, l'analyse par électrophorèse a montré que nos ARNs étaient purs et d'une bonne qualité (pas de dégradation observée sur gel). Une PCR a été effectuée sur les ARNs en utilisant un couple d'amorces permettant d'amplifier le gène de la glutathion synthase (*LsGS*) de la laitue (amorces *LsGS Forward* et *LsGS Reverse* (voir annexes tableau II)). Un témoin positif d'ADN génomique a été utilisé pour s'assurer de la réussite de la PCR. Cette expérience a montré l'absence d'amplification pour tous nos échantillons d'ARNs (voir un exemple sur la figure 6.1) ce qui établit la réussite du traitement DNase et montre qu'il n'y a plus d'ADN génomique résiduel dans nos échantillons.

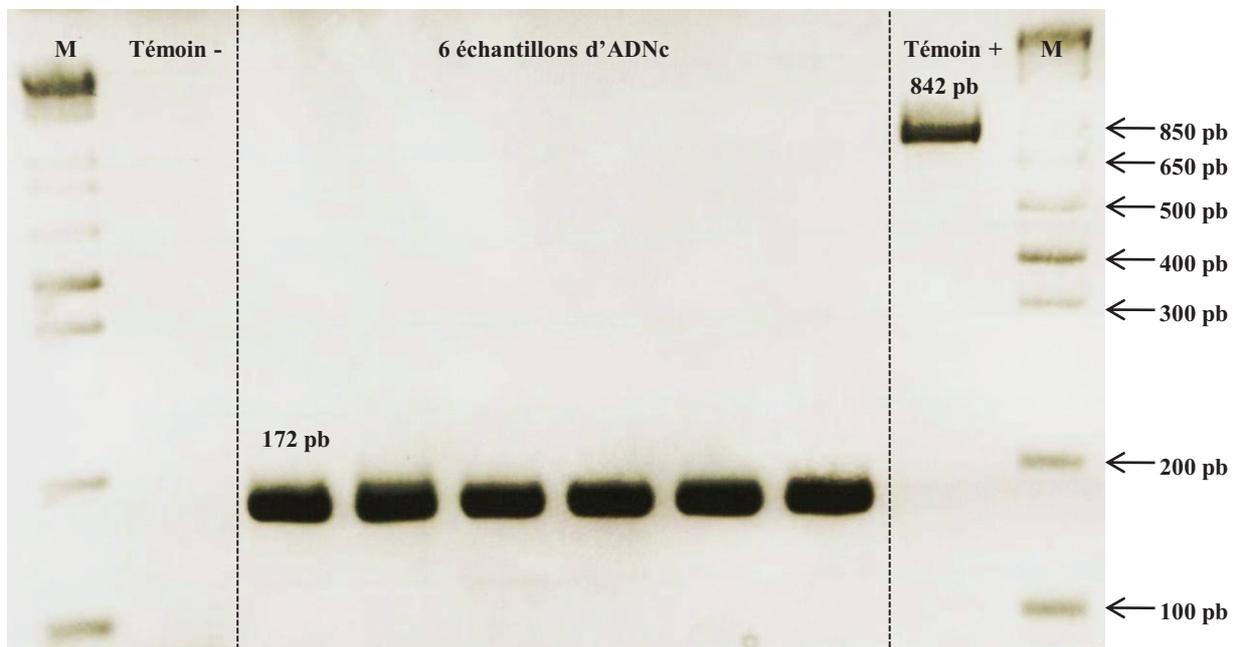
##### **4.3.1.2. Vérification de la réussite de la transcription inverse**

Pour obtenir les ADNc qui seront utilisés pour l'expérience de PCR quantitative, une transcription inverse a été réalisée sur nos échantillons d'ARNs (voir Chapitre II Matériels et méthodes). Nous avons alors cherché à vérifier la qualité de ces ADNc.



**Figure 6.1. Vérification de l'état et de la pureté des ARNs**

Des PCRs classiques ont été effectuées sur les échantillons d'ARNs afin de vérifier la présence ou non d'ADN génomique résiduel, et de confirmer la réussite du traitement avec la DNase. Les amorces utilisées pour l'amplification sont les amorces LsGS Forward et LsGS Reverse qui permettent d'amplifier un fragment de 234 pb correspondant au gène codant la glutathion synthase (voir annexes tableau II). Les produits de PCR ont été prélevés après 50 cycles. 10µl de produits PCR ont été déposés sur gel pour chacun des échantillons. Un témoin positif d'ADN génomique (Témoin +) a été utilisé pour s'assurer de la réussite de la PCR. Un témoin négatif d'eau Milli-Q (Témoin -) a été utilisé pour s'assurer de l'absence de contamination. M: marqueur de taille (1 Kb Plus DNA Ladder, Invitrogen).



**Figure 6.2. Vérification de la réussite de la transcription inverse**

Des PCRs classiques ont été effectuées sur les échantillons d'ADNc afin de vérifier la réussite de la transcription inverse. Les amorces utilisées pour l'amplification sont les amorces LsActin Forward et LsActin Reverse qui permettent d'amplifier un fragment de 172 pb (pour une matrice d'ADNc) et de 842 pb (pour une matrice d'ADN génomique) correspondant au gène codant l'Actin2 (voir annexes tableau II). Les produits de PCR ont été prélevés après 50 cycles. 10µl de produits PCR ont été déposés sur gel pour chacun des échantillons. Un témoin positif d'ADN génomique (Témoin +) a été utilisé pour s'assurer de la réussite de la PCR. Un témoin négatif (Témoin -) d'eau Milli-Q a été utilisé pour s'assurer de l'absence de contamination. M: marqueur de taille (1 Kb Plus DNA Ladder, Invitrogen).

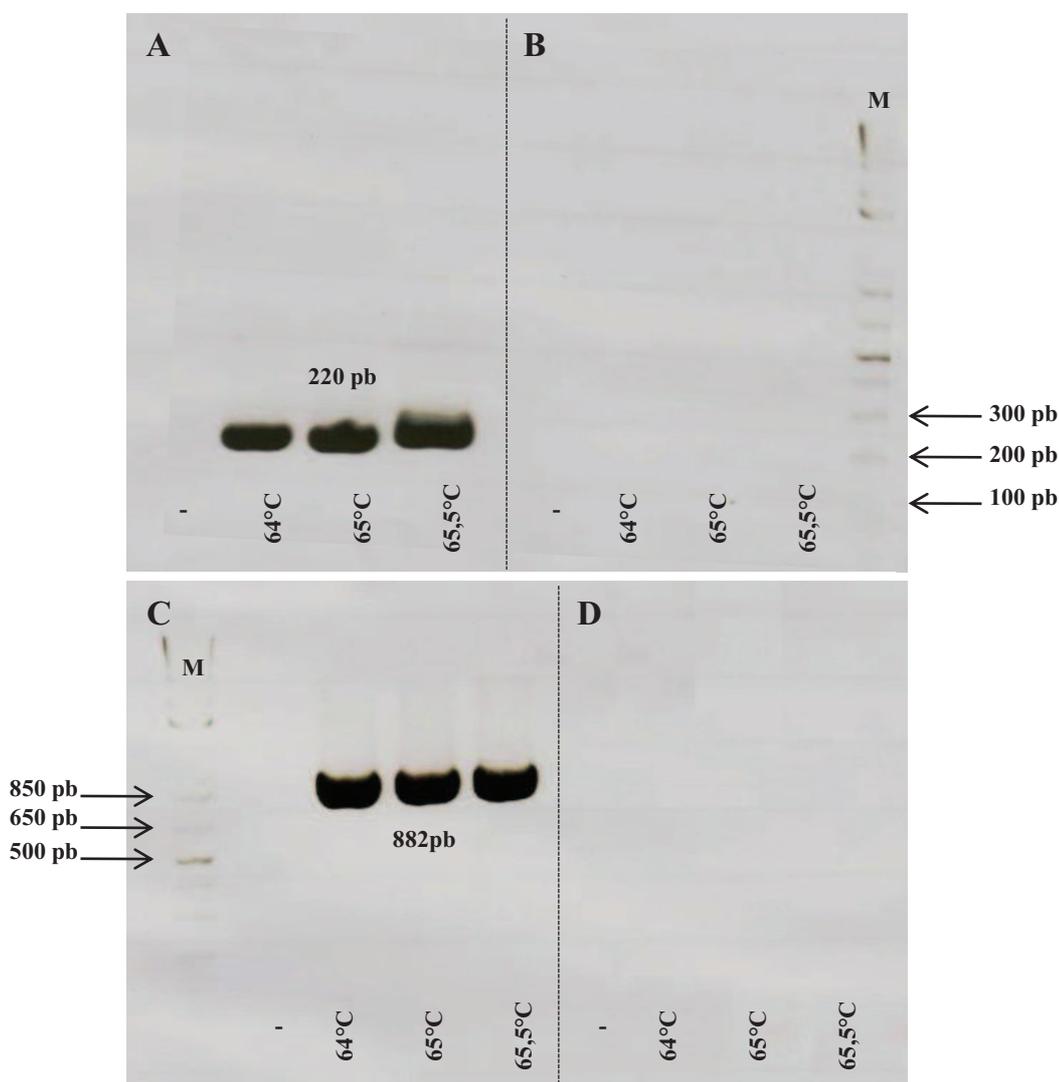
Après la transcription inverse, une nouvelle PCR a été effectuée sur les échantillons d'ADNc en utilisant des amorces LsActin Forward et LsActin Reverse bordant un intron du gène de l'actine2 de la laitue (voir annexes tableau II). Pour s'assurer de la réussite de la PCR, un témoin positif d'ADN génomique a été utilisé. Pour tous nos échantillons d'ADNc, nous avons observé la présence d'une unique bande d'une intensité importante à la taille attendue (172 pb). Par comparaison, si on amplifie à partir d'ADN génomique on obtient une bande à une taille de 842 pb. Ceci est dû à la présence d'un intron au niveau de la séquence d'ADN génomique. L'amplification obtenue pour les échantillons d'ADNc montre la réussite de notre transcription inverse (voir un exemple sur la figure 6.2).

#### **4.3.1.3. Vérification de la qualité d'amplification et la spécificité des amorces**

L'objectif de cette étape était de vérifier par PCR la qualité de l'amplification (pour chacun des gènes) ainsi que la spécificité des amorces définies pour les gènes appartenant aux familles multigéniques (*LsPDRs*, *LsIRTs*, *LsHMAs*), et ce, en utilisant les plasmides contenant des fragments de nos gènes d'intérêt comme matrice pour la PCR. Toutes les combinaisons possibles entre amorces et plasmides ont été testées pour vérifier la spécificité de nos amorces. Les PCRs ont été menées en faisant un gradient de température d'hybridation d'amorces afin de trouver la température à partir de laquelle on commence à amplifier spécifiquement nos gènes. Ces manipulations ont montré une amplification d'une bonne qualité, pour tous nos gènes (Figure 6.3). En outre, on a pu obtenir des amplifications spécifiques pour chacun des gènes appartenant aux familles multigéniques en utilisant des températures d'hybridation supérieures ou égales à 64°C. Nous avons donc choisi la température de 64°C pour la réalisation de la PCR quantitative.

#### **4.3.1.4. Vérification de la qualité de l'amplification et du niveau d'expression par PCR quantitative**

L'objectif de cette étape était de vérifier par PCR quantitative la qualité de l'amplification de nos gènes sur une matrice d'ADNc et d'avoir une idée préliminaire sur les niveaux d'expression de nos gènes.



**Figure 6.3. Vérification de la spécificité des amorces (exemple des gènes *LsIRT*s)**

Des PCRs ont été effectuées en utilisant comme matrice des plasmides contenant des fragments des gènes *LsIRTa* et *LsIRTb*. Les amorces utilisées pour l'amplification sont *LsIRTa* Forward et *LsIRTa* Reverse qui permettent d'amplifier un fragment de 220 pb correspondant au gène *LsIRTa* et *LsIRTb* Forward et *LsIRTb* Reverse qui permettent d'amplifier un fragment de 882 pb correspondant au gène *LsIRTb* (voir annexes tableau II). Les produits de PCR ont été prélevés après 50 cycles. 10 µl de produits PCR ont été déposés sur gel pour chacun des échantillons. Les PCRs ont été menées en appliquant un gradient de température à l'étape d'hybridation des amorces. Les températures utilisées pour ces PCRs sont indiquées sur la figure. Un témoin négatif d'eau Milli-Q (-) a été utilisé pour s'assurer de l'absence de contamination (température d'hybridation des amorces 63°C). M: marqueur de taille (1 Kb Plus DNA Ladder, Invitrogen). **A:** amorces utilisées: *LsIRTa* Forward et *LsIRTa* Reverse. matrice utilisée: plasmide contenant un fragment du gène *LsIRTa*. **B:** amorces utilisées: *LsIRTa* Forward et *LsIRTa* Reverse. matrice utilisée: plasmide contenant un fragment du gène *LsIRTb*. **C:** amorces utilisées: *LsIRTb* Forward et *LsIRTb* Reverse. matrice utilisée: plasmide contenant un fragment du gène *LsIRTb*. **D:** amorces utilisées: *LsIRTb* Forward et *LsIRTb* Reverse. matrice utilisée: plasmide contenant un fragment du gène *LsIRTa*.

Dans une première étape, les ADNc d'une seule variété de laitue, la variété GL 659, ont été utilisés. Afin d'estimer l'efficacité de la PCR (laquelle est dépendante des amorces et de la qualité des matrices), les échantillons d'ADNc ont été dilués au 5<sup>ème</sup>, au 25<sup>ème</sup>, au 125<sup>ème</sup> et au 625<sup>ème</sup>.

Les contrôles de qualité cités ci-dessus ont été effectués pour valider la qualité de la PCR quantitative pour chaque couple d'amorces (et donc pour chaque gène) considéré.

Nos expériences préliminaires ont montré des niveaux d'expression différentiels entre gènes. Grâce aux valeurs de Ct (threshold cycle) nous avons classé grossièrement les niveaux d'expression de nos gènes en 4 groupes:

1. gènes fortement exprimés (valeurs de Ct inférieures à 29 pour les ADNc dilués au 25<sup>ème</sup>),
2. gènes faiblement exprimés (valeurs de Ct comprises entre 29 et 31 pour les ADNc dilués au 25<sup>ème</sup>),
3. gènes très faiblement exprimés (valeurs de Ct supérieures à 31 pour les ADNc dilués au 25<sup>ème</sup>),
4. et gènes non exprimés (gènes non détectables) (Tableau 6.2).

Dans une deuxième étape, les résultats obtenus pour la variété GL 659 concernant le niveau d'expression des gènes ont été confirmés pour les variétés Kordaat, Red Salad Bowl et Paris Island Cos.

Pour les gènes faiblement et fortement exprimés, les valeurs d'efficacité de PCR ainsi que tous les autres contrôles de qualité ont validé la qualité de notre expérience de PCR quantitative (Tableau 6.2). En revanche, pour les gènes présentant une expression très faible dans un organe donné, nous étions à la limite de la détection du niveau d'expression par PCR quantitative. Cette très faible expression n'a pas permis de déterminer l'efficacité des PCR d'une manière fiable. En conséquence, les gènes présentant une expression très faible ont été retirés de notre liste. Ainsi, nous n'avons pas pu continuer notre étude sur l'expression des gènes *LsHMAa*, *LsIRTb*, *LsPDRb* au niveau racinaire et sur celle de l'expression du gène *LsPDRc* au niveau foliaire.

**Tableau 6.2.** Données préliminaires des niveaux d'accumulation des transcrits des gènes candidats ainsi que des gènes contrôle chez la variété GL 659. Les valeurs de Ct (threshold cycle) correspondent aux ADNc dilués au 25<sup>ème</sup>. Pour le gène non exprimé (IRTb), les gènes montrant une expression faible (valeurs de Ct entre 29 et 31) et les gènes montrant une expression très faible (valeurs de Ct supérieures à 31) dans un organe donné, les résultats ont été confirmés chez les variétés Kordaat, Red Salad Bowl et Paris Island Cos. La colonne alignement montre le résultat de l'alignement des points correspondants aux quatre dilutions sur la droite d'étalonnage (Ct en fonction de Log Qn) (voir chapitre II: Matériels et méthodes). La dernière colonne montre le résultat de validation des PCR quantitative suite aux contrôles de qualité effectués (voir chapitre II: Matériels et méthodes). Des plantes âgées de 14 jours ont été exposées à une concentration de CdCl<sub>2</sub> (15 µM) durant les 8 derniers jours de culture. Les prélèvements ont été effectués plante par plante.

Gene	Organe	Expression	Crossing point	Alignement	Validation
<i>Actin2</i>	Feuilles	Forte	23,5	Alignement parfait	Valide
	Racines	Forte	24,0	Alignement parfait	Valide
<i>TPI</i>	Feuilles	Forte	22,6	Alignement parfait	Valide
	Racines	Forte	22,5	Alignement parfait	Valide
<i>γGCS</i>	Feuilles	Forte	25,3	Alignement parfait	Valide
	Racines	Forte	25,3	Alignement parfait	Valide
<i>GS</i>	Feuilles	Forte	28,3	Alignement parfait	Valide
	Racines	Forte	26,6	Alignement parfait	Valide
<i>HMAa</i>	Feuilles	Très faible	35,3	<b>Points non alignées</b>	<b>Non valide</b>
	Racines	Très faible	34,5	<b>Points non alignées</b>	<b>Non valide</b>
<i>HMAb</i>	Feuilles	Faible	29,1	Alignement parfait	Valide
	Racines	Forte	27,2	Alignement parfait	Valide
<i>IRTa</i>	Feuilles	Très faible	34,3	Alignement parfait	Valide
	Racines	Forte	26,4	Alignement parfait	Valide
<i>IRTb</i>	Feuilles	Non détectable	-	-	<b>Non valide</b>
	Racines	Non détectable	-	-	<b>Non valide</b>
<i>PDRa</i>	Feuilles	Forte	27,5	Alignement parfait	Valide
	Racines	Faible	30,0	Alignement parfait	Valide
<i>PDRb</i>	Feuilles	Forte	27,5	Alignement parfait	Valide
	Racines	Très faible	31,3	<b>Points non alignés</b>	<b>Non valide</b>
<i>PDRc</i>	Feuilles	Très faible	33,4	<b>Points non alignés</b>	<b>Non valide</b>
	Racines	Forte	23,9	Alignement parfait	Valide

Ces expériences préliminaires ont aussi permis de choisir les dilutions qui ont été utilisées postérieurement pour la détermination de l'efficacité des PCR quantitative lors de l'étude d'expression des gènes chez les 14 variétés de laitue. Ainsi, selon le niveau d'expression du gène étudié (fort ou bien faible), les échantillons ont été dilués au 5<sup>ème</sup>, au 25<sup>ème</sup>, au 125<sup>ème</sup> et au 625<sup>ème</sup> ou bien au 25<sup>ème</sup>, au 125<sup>ème</sup>, au 625<sup>ème</sup> et au 3125<sup>ème</sup>.

### 4.3.2. L'étude d'expression des gènes chez les plantes des 14 variétés de laitue

#### 4.3.2.2. Choix du gène contrôle

Comme cela a été présenté précédemment, les expériences de PCR quantitative demandent l'utilisation d'un gène qui présente une expression la plus stable possible, dans toutes les conditions et entre toutes les variétés étudiées. Le gène contrôle servira pour la normalisation de l'expression des gènes candidats. Nous avons choisi 2 gènes, qui sont la Triose Phosphate Isomérase (*TPI*) et l'*Actine2* (*Actin2*).

Si on compare plusieurs échantillons, la variabilité des valeurs d'expression brute pour un gène donné est la somme de la variabilité due à l'expression différentielle du gène selon l'échantillon considéré et de la variabilité due à la différence des quantités initiales d'ADNc synthétisée pour chaque échantillon. Puisque nous avons utilisé les mêmes échantillons pour la détermination de l'expression brute de nos deux gènes contrôle, nous pouvons considérer que la différence de variabilité des valeurs brutes entre les deux gènes est due quasiment à une différence de stabilité entre gènes. Donc le gène qui présente la plus grande variabilité entre les échantillons analysés est forcément le gène le moins stable.

Après réalisation des expériences de PCR quantitative, un test statistique (calcul de l'erreur standard) a été réalisé sur les valeurs brutes d'expression des deux gènes contrôle (valeurs non normalisées) pour choisir le gène contrôle qui montre moins de variabilité entre les 14 plantes utilisées. Pour le gène *LsActin* les valeurs relatives des erreurs standard étaient de 10,9% au niveau des feuilles et de 14,2% au niveau des racinaire, par contre les valeurs relatives correspondantes au gène *LsTPI* étaient de 6,5% au niveau des feuilles et de 9,2% au niveau des racines. Ces calculs ont permis donc de choisir le gène contrôle qui montre le moins de variabilité entre les 14 plantes utilisées, qui est le gène *LsTPI*. Les valeurs d'expression de ce gène ont été donc utilisées ultérieurement pour la normalisation de l'expression de nos gènes candidats.

#### 4.3.2.2. Comparaison entre les niveaux d'expression des gènes candidats

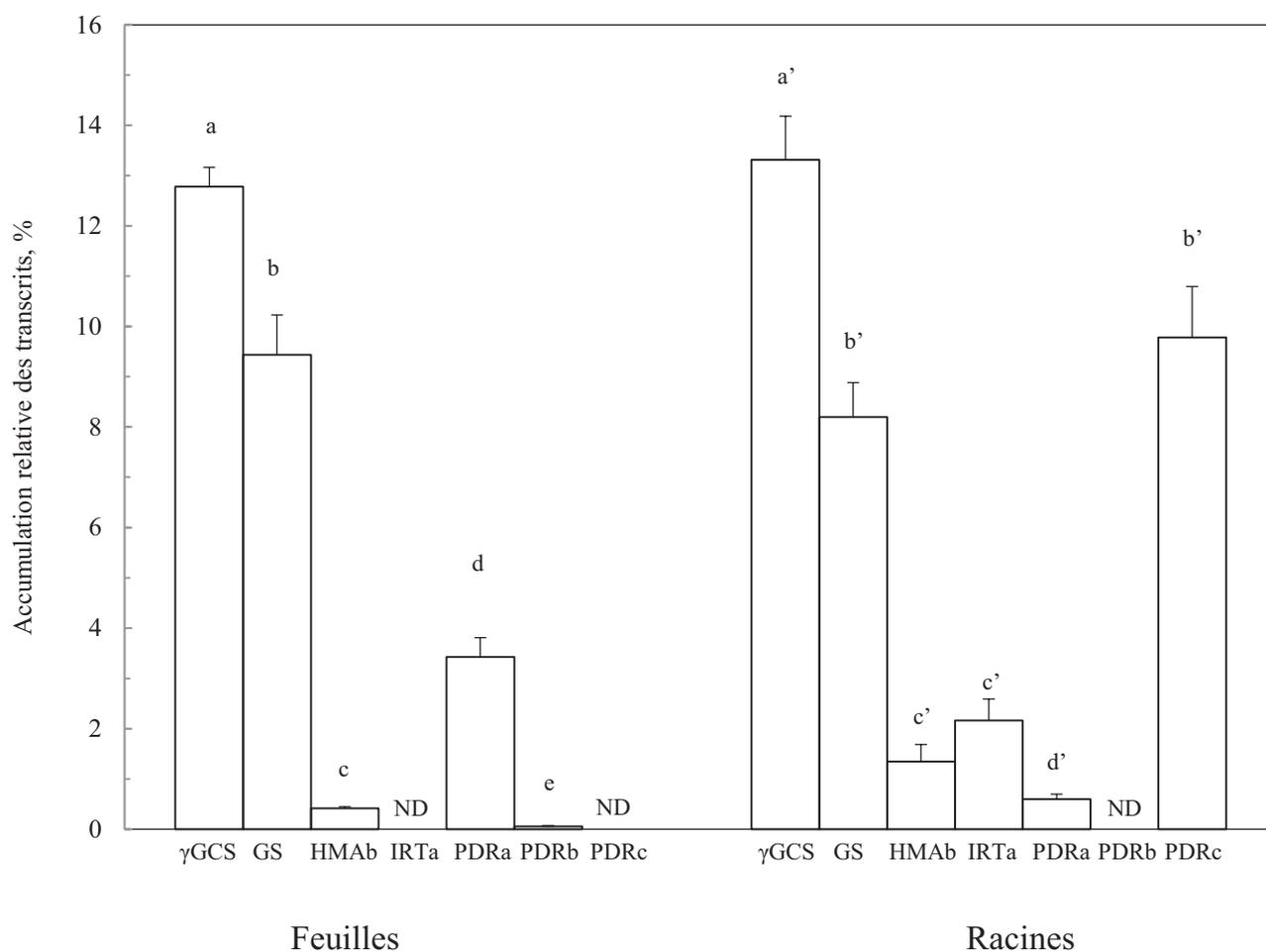
La figure 6.4 représente les valeurs moyennes d'accumulation relative des transcrits *LsγGCS*, *LsGS*, *LsHMAB*, *LsIRTa* et *LsPDRa*, *b* et *c* dans les feuilles et/ou les racines des 14 plantes étudiées. Cette figure montre qu'au niveau foliaire, le classement décroissant des niveaux d'expression de nos gènes est le suivant:  $Ls\gamma GCS > LsGS > LsPDRa > LsHMAB > LsPDRb$ , les transcrits *LsIRTa* et *LsPDRc* étant indétectables. Au niveau des racines, le classement décroissant des niveaux d'expression est le suivant:  $Ls\gamma GCS > LsGS$  et  $LsPDRc > LsHMAB$  et  $LsIRTa > LsPDRa$ , le transcrit *LsPDRb* étant indétectables.

Les résultats d'expression montrent que les deux gènes les plus exprimés sont *LsγGCS* et *LsGS*, aussi bien au niveau foliaire qu'au niveau racinaire.

Il est intéressant de noter que le gène *LsPDRc* a montré une expression très élevée au niveau des racines (statistiquement identique à celle du gène *LsGS*) tandis que l'expression de ce gène est à peine détectable au niveau des feuilles, et ce chez les 4 variétés de laitues analysées lors des expériences préliminaires. Ceci montre que dans nos conditions de culture l'expression du gène *LsPDRc* a majoritairement lieu au niveau des racines (Figure 6.4).

#### 4.3.2.3. Corrélations entre les niveaux d'expression des gènes candidats et l'accumulation des métaux

Après détermination des niveaux d'expression relative de nos gènes, des représentations de ces niveaux d'expression en fonction des teneurs en cadmium et en zinc ont été faites afin de déterminer le coefficient de détermination ( $R^2$ ) qui permet de donner la part de variance expliquée par un modèle linéaire qui associerait les deux variables. Ultérieurement une étude statistique a été faite afin de déterminer les corrélations statistiquement significatives.



**Figure 6.4. Niveaux d'expression des gènes candidats**

Accumulation relative des transcrits *LsγGCS*, *LsGS*, *LsHMAb*, *LsIRTa* et *LsPDR* (a, b et c) dans les feuilles et/ou les racines de *Lactuca sativa* obtenue par PCR quantitative. Des plantes âgées de 14 jours cultivées en hydroponie, ont été exposées à une concentration de  $\text{CdCl}_2$  (15  $\mu\text{M}$ ) durant les 8 derniers jours de culture. Les prélèvements ont été effectués plante par plante. Les valeurs d'expression des gènes ont été normalisées grâce aux valeurs d'expression du gène contrôle (*LsTPI*). Chaque valeur est la moyenne des mesures obtenues pour 14 plantes appartenant chacune à une variété différentes. Les barres d'erreur correspondent aux erreurs standards. ND: Expression des gènes non déterminée à cause d'un niveau d'expression inférieur à la limite de la détection par PCR quantitative. Les valeurs marquées par la même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 0,05 (comparaisons multiples des moyennes (Test de Tukey)).

Cette étude a montré l'existence de trois corrélations statistiquement significatives (Tableau 6.3):

- une corrélation entre l'expression du gène *LsPDRa* et la teneur en cadmium au niveau foliaire (coefficient de détermination de 0,57; coefficient de corrélation positive de 0,76) (voir figure 6.5),
- une corrélation entre l'expression du gène *LsPDRa* et la teneur en zinc au niveau foliaire (coefficient de détermination de 0,69; coefficient de corrélation positive de 0,83) (voir figure 6.5),
- et une corrélation entre l'expression du gène *LsIRTa* et la teneur en cadmium au niveau racinaire (coefficient de détermination de 0,47; coefficient de corrélation positive de 0,69) (voir figure 6.6).

Les autres corrélations sont statistiquement non significatives. De même, notre étude a montré que toutes les corrélations entre les expressions relatives de nos gènes candidats et la translocation de cadmium et de zinc des racines vers les parties aériennes sont statistiquement non significatives (avec des valeurs de coefficient de détermination ( $R^2$ ) inférieures à 0,2 pour toutes les corrélations).

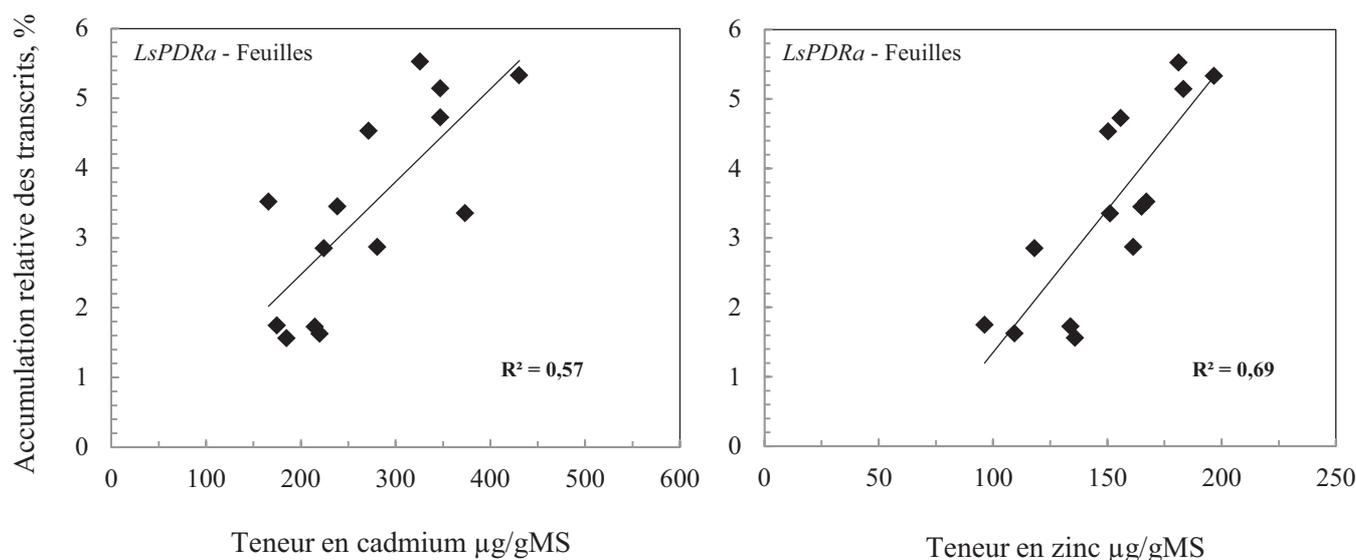
## 5. Discussion

Nos deux approches génétique et physiologique ont été complétées par une approche moléculaire dont l'objectif était de déterminer si des corrélations peuvent être établies entre les teneurs tissulaires de cadmium mesurées chez les variétés de laitue et les niveaux d'expression de gènes décrits chez des espèces modèles comme des déterminants du contrôle de l'accumulation de cadmium.

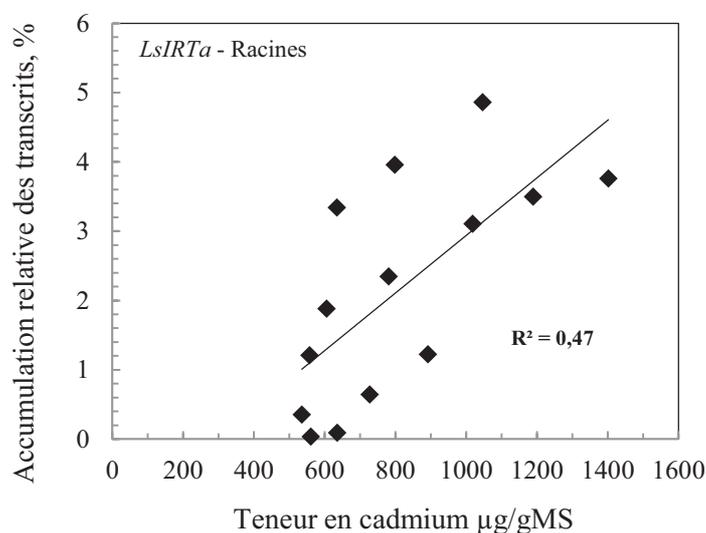
Cette approche a été déclinée en trois étapes. Une recherche bibliographique a d'abord permis d'identifier des gènes réputés contrôler l'accumulation de cadmium chez les espèces modèles, notamment *A. thaliana*. Le clonage des gènes de laitue "orthologues" à ces gènes candidats a ensuite été réalisé et leurs séquences ont été identifiées. Le niveau d'expression de ces gènes a alors été évalué par PCR quantitative et comparé aux teneurs en cadmium mesurées. Puisque notre étude physiologique a permis d'émettre l'hypothèse d'un transport très associé entre le cadmium et le zinc, des mesures de teneurs en zinc ont aussi été effectuées afin de confirmer cette hypothèse.

**Tableau 6.3.** Corrélations entre les niveaux d'expression des gènes candidats et l'accumulation du zinc et du cadmium chez *Lactuca sativa*. Le tableau représente les valeurs de coefficient de détermination ( $R^2$ ) correspondant à des régressions linéaires modélisant les relations entre l'accumulation relative des transcrits pour chacun des gènes candidats et les teneurs en zinc ou en cadmium. ND: Expression des gènes non déterminée à cause d'un niveau d'expression inférieur à la limite de la détection par PCR quantitative. Les étoiles (\*) montrent les corrélations statistiquement significatives au seuil de 0,01.

Gene	Organe	Coefficient de détermination ( $R^2$ )	
		Zinc	Cadmium
<i>γGCS</i>	Feuilles	0,007	0,04
	Racines	0,03	0,18
<i>GS</i>	Feuilles	0,02	0,02
	Racines	0,18	0,13
<i>HMAb</i>	Feuilles	0,06	0,008
	Racines	0,01	0,004
<i>IRTb</i>	Feuilles	ND	ND
	Racines	0,04	0,47 *
<i>PDRa</i>	Feuilles	0,69 *	0,57 *
	Racines	0,05	0,27
<i>PDRb</i>	Feuilles	0,24	0,17
	Racines	ND	ND
<i>PDRc</i>	Feuilles	ND	ND
	Racines	0,008	0,003



**Figure 6.5.** Corrélations entre les niveaux d'expression, obtenue par PCR quantitative, du gène *LsPDRa* au niveau foliaire et les teneurs en zinc et en cadmium chez *Lactuca sativa*. Les valeurs d'expression de ces gènes ont été normalisées grâce aux valeurs d'expression du gène contrôle (*LsTPI*). Des plantes âgées de 14 jours cultivées en hydroponie, ont été exposées à une concentration de  $\text{CdCl}_2$  ( $15 \mu\text{M}$ ) durant les 8 derniers jours de culture. Les prélèvements ont été effectués plante par plante. Chaque point représente les valeurs individuelles pour chacune des 14 plantes utilisées. Les équations des courbes sont  $y = 0,013x - 0,19$  pour le cadmium et  $y = 0,04x - 2,8$  pour le zinc. Les  $R^2$  correspondent aux valeurs des coefficients de détermination pour chacune des courbes de tendance. Les deux corrélations sont statistiquement significatives au seuil de 0,01.



**Figure 6.6.** Corrélations entre les niveaux d'expression, obtenue par PCR quantitative, du gène *LsIRTa* au niveau racinaire et la teneur en cadmium chez *Lactuca sativa*. Les valeurs d'expression de ces gènes ont été normalisées grâce aux valeurs d'expression du gène contrôle (*LsTPI*). Des plantes âgées de 14 jours cultivées en hydroponie, ont été exposées à une concentration de  $\text{CdCl}_2$  ( $15 \mu\text{M}$ ) durant les 8 derniers jours de culture. Les prélèvements ont été effectués plante par plante. Chaque point représente les valeurs individuelles pour chacune des 14 plantes utilisées. L'équation de la courbe est  $y = 0,004x - 1,1$ .  $R^2$  correspond à la valeur du coefficient de détermination. La corrélation est statistiquement significative au seuil de 0,01.

Au début de notre analyse, une étude bibliographique a permis de sélectionner les gènes *HMA4*, *IRT1* et *PDR8* d'*A. thaliana* qui sont des transporteurs de métaux, et les gènes *GS* (glutathion synthase) et  $\gamma$ -*GCS* ( $\gamma$ -glutamylcystéine synthase) qui interviennent dans la synthèse du glutathion, un précurseur de la synthèse des phytochélatines.

Dès les premiers essais, les clonages ont été effectués avec succès pour les deux gènes  $\gamma$ -*GCS* et *GS*. Ce succès rapide a été la conséquence du fait qu'il existe des gènes strictement orthologues aux gènes  $\gamma$ -*GCS* et *GS* chez la laitue. Pour les autres gènes, la situation s'est avérée plus complexe. Une étude bioinformatique faite sur les familles des transporteurs HMA, ZIP (dont fait partie *IRT1*) et ABC (dont fait partie *PDR8*) a en effet montré l'inexistence de gènes strictement orthologues à *HMA4*, *IRT1* et *PDR8* chez les espèces dont le génome est entièrement séquencé autres que les Brassicacées, ce qui suggère qu'il pourrait en être de même chez la laitue. De fait, nous n'avons pas été capables de trouver des gènes strictement orthologues à *HMA4*, *IRT1* et *PDR8* chez la laitue.

Si on revient sur notre étude bioinformatique on constate que pour les gènes auxquels nous nous sommes intéressés, nous sommes loin d'un modèle d'orthologie stricte et parfaite entre espèces. Ainsi l'analyse phylogénétique a montré que l'association entre gènes de la même espèce était plus forte que celle que l'on observe entre gènes orthologues présents dans des espèces proches. Dans notre cas, ceci a été montré clairement pour la famille des transporteurs ABC, avec l'association très forte entre les trois gènes *LsPDR* de la laitue et l'absence d'orthologues stricts aux deux gènes *PDR8* et *PDR7* d'*A. thaliana* (voir arbre phylogénétique 6.1). Baxter *et al.* (2003) ont observé le même genre de résultat en comparant les ATPases de type P d'*A. thaliana* et de riz. En effet, dans un tiers des cas l'orthologie stricte n'est pas rencontrée.

Nous avons aussi observé qu'au sein d'une même famille multigénique, le nombre de gènes varie considérablement d'une espèce à une autre. Ceci peut même être rencontré en considérant des espèces très proches appartenant à la même famille botanique. Ainsi, Hanikenne *et al.* (2008) suggèrent qu'une des causes de l'hyperaccumulation de zinc observée chez *A. halleri* serait la présence de 3 copies du gène *HMA4* qui se succèdent en tandem, contre une unique copie chez *A. thaliana*. Nous avons aussi observé que la duplication en 3 isoformes *HMA2*, *HMA3* et *HMA4* était spécifique au Brassicacées. Cette duplication n'est présente ni chez les

monocotylédones ni chez les dicotylédones autres que les Brassicacées (voir Arbre phylogénétique 6.4). Ces observations nous amènent à penser que l'organisation différentielle que l'on observe pour certaines familles multigéniques entre différentes espèces pourrait expliquer le comportement différentiel de ces espèces.

À la suite de cette conclusion, nous avons décidé de choisir de continuer notre étude en travaillant sur les gènes *LsHMA*, *LsPDRs* et *LsIRTs* dont les séquences étaient les plus proches de celles des gènes *AtHMA4*, *AtIRT1* et *AtPDR8*. Nous avons considéré que ces séquences, présentes dans les banques de données, sont vraisemblablement les " orthologues fonctionnels " à nos gènes candidats d'*A. thaliana*. Dans une étape ultérieure, ces gènes ont été clonés avec succès.

Nos expériences de PCR quantitative ont montré des niveaux d'expression relative des gènes étudiés variables selon que l'on étudie l'expression de ces gènes dans les feuilles et dans les racines. Ces expériences ont aussi montré l'existence de trois corrélations positives statistiquement significatives:

- une corrélation entre l'expression du gène *LsIRTa* et l'accumulation du cadmium au niveau racinaire,
- une corrélation entre l'expression du gène *LsPDRa* et l'accumulation du cadmium au niveau foliaire,
- et une corrélation entre l'expression du gène *LsPDRa* et l'accumulation du zinc au niveau foliaire.

Le résultat montrant une corrélation statistiquement significative entre l'expression du gène *LsIRTa* et l'accumulation du cadmium au niveau racinaire est en accord avec plusieurs études. Les *IRTs* sont des membres de la famille ZIP. Les *ZIPs* sont impliqués dans le transport du Zn, du Fe, du Mn et du Cd. IRT1 représente la principale voie d'absorption du Fe<sup>2+</sup> par les cellules racinaires d'*A. thaliana* (Vert et al., 2002). Les premiers travaux sur la surexpression de *IRT1* chez la levure (*S. cerevisiae*) ont montré une contribution de cette protéine dans l'absorption de Zn<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup> et Cd<sup>2+</sup> (Korshunova et al., 1999). Des plantes d'*A. thaliana* qui surexpriment *IRT1* accumulent plus de Zn<sup>2+</sup> et de Cd<sup>2+</sup> dans leurs tissus racinaires que les plantes témoins dans des conditions de déficience ferrique qui induisent la surexpression de la protéine IRT1 (Connolly et al., 2002 ; Erin et al., 2002). Ces expériences ont montré une implication évidente d'IRT1 dans l'influx de Cd<sup>2+</sup> dans les

cellules racinaires des plantes. Un tel rôle d'IRT1 a été conforté par des études physiologiques faites sur d'autres espèces végétales montrant qu'une limitation du Fe dans le milieu de culture mène à une augmentation de l'accumulation du Cd (Sharma *et al.*, 2004). Ceci est en accord avec nos résultats de physiologie. En effet, notre étude physiologique a permis de mettre en évidence un effet marquant de l'augmentation de la concentration de fer dans le milieu de culture sur la limitation de l'accumulation du cadmium chez nos plantes de laitue (voir chapitre IV). Ceci permet de penser que l'absorption de  $Cd^{2+}$  peut se faire d'une manière non spécifique via des transporteurs de fer, notamment un orthologue à IRT1 chez la laitue (probablement la protéine codée par notre gène *LsIRTa*). Donc nos résultats de physiologie sont bien en accord avec la corrélation trouvée entre l'expression du gène *LsIRTa* et l'accumulation du cadmium au niveau racinaire. *LsIRTa* est vraisemblablement un des gènes qui contrôlent l'absorption du  $Cd^{2+}$  par les cellules racinaires de la laitue. Néanmoins le coefficient de détermination de 0,47 montre que ce gène est impliqué seulement dans le transport d'une partie des ions  $Cd^{2+}$  accumulés dans la racine. D'où l'implication de plusieurs gènes dans ce phénomène. Ce résultat est en concordance avec nos résultats d'étude du déterminisme génétique de l'accumulation de cadmium. En effet, en se basant sur le profil de la ségrégation phénotypique de la population F2 correspondant au caractère de l'accumulation de cadmium, nos résultats sont compatibles avec l'hypothèse selon laquelle le caractère d'accumulation de cadmium dans les racines de la laitue est contrôlé par plusieurs gènes. Ceci étant, il se peut aussi que l'existence d'un autre niveau de régulation, par exemple au niveau protéique, explique que le coefficient de détermination ne soit que de 0,47. Enfin, nous avons déjà noté que la variabilité interindividuelle des teneurs en cadmium mesurées dans les racines et les feuilles était forte. Il est probable que cette variabilité soit en partie due au fait que la précision du phénotypage est perfectible. Ceci pourrait aussi expliquer que le coefficient de détermination ne soit que de 0,47.

Toutefois, nous n'avons pas pu mettre en évidence une corrélation entre l'expression du gène *LsIRTa* et l'accumulation du zinc au niveau racinaire. Ceci semble être en désaccord avec des travaux qui montrent une éventuelle implication d'*AtIRT1* dans le transport du zinc (Connolly *et al.*, 2002). Mais il ne faut pas oublier que notre gène (*LsIRTa*) n'est pas un gène strictement orthologue au gène *AtIRT1*, et qui peut avoir donc une fonction légèrement différente de celle d'*AtIRT1*. Enfin, il est intéressant de signaler que grâce à notre étude bioinformatique, on a pu construire la totalité de la

séquence codante du gène *LsIRTa* en assemblant plusieurs séquences EST de laitue trouvées.

Nos expériences de PCR quantitative ont aussi montré que le gène *LsIRTb* est complètement réprimé dans nos conditions de culture. La présence de séquences EST (expressed sequence tag) correspondant à ce gène montre cependant qu'il est bien exprimé dans d'autres conditions de culture. Il serait donc très intéressant d'étudier l'expression de ce gène dans des conditions de déficience ferrique ou bien dans des conditions d'absence de cadmium afin de savoir si la cause de cette répression pourrait être liée entre autres à la présence du cadmium dans le milieu de culture.

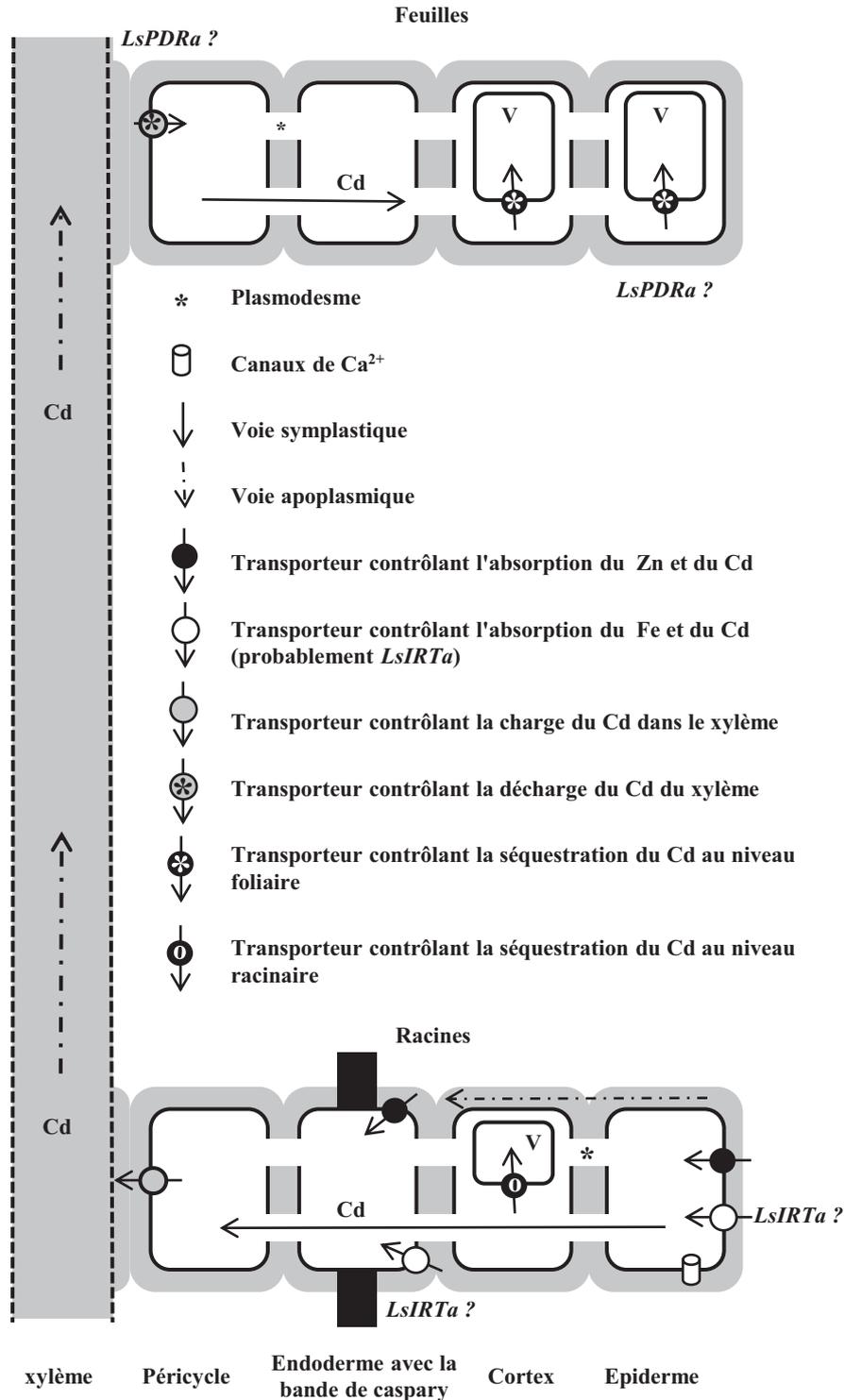
Nos résultats ont aussi montré une corrélation positive entre l'expression du gène *LsPDRa* et l'accumulation du zinc et du cadmium au niveau foliaire. Kim *et al.* (2007) suggèrent que *AtPDR8*, un transporteur de la famille ABC, pourrait jouer un rôle important dans l'efflux du cadmium. En effet, la surexpression du gène *PDR8* chez *A. thaliana* induit une forte diminution des teneurs en cadmium aussi bien au niveau foliaire qu'au niveau racinaire ainsi qu'une tolérance des plantes à ce métal. Selon ces auteurs, la protéine *AtPDR8* est adressée vers les membranes plasmiques de toutes les cellules, mais surtout celles des cellules épidermiques racinaires afin d'assurer l'efflux du cadmium. Vu la forte corrélation entre l'expression du gène *LsPDRa* et l'accumulation du cadmium au niveau foliaire, ce gène est éventuellement impliqué dans l'accumulation du cadmium à ce niveau, mais vraisemblablement il ne s'agit pas d'un " orthologue fonctionnel " au gène *AtPDR8* puisque dans le cas échéant on devrait s'attendre à une corrélation négative entre l'expression du gène *LsPDRa* et l'accumulation du cadmium et non pas l'inverse.

Cette forte corrélation a été trouvée aussi bien pour le zinc que pour le cadmium. Ceci est en faveur de notre hypothèse de transport associé entre le cadmium et le zinc (voir chapitre IV). Néanmoins, la corrélation reste plus élevée dans le cas du zinc. Ceci pourrait être éventuellement dû à la non-spécificité de *LsPDRa* pour le cadmium.

Enfin, notre étude a montré l'absence de corrélation statistiquement significative entre les niveaux d'expression de nos gènes candidats et les pourcentages de translocation de cadmium et de zinc des racines vers les parties aériennes. Ce résultat ne signifie pas que tous nos gènes candidats ne sont pas impliqués dans la translocation de cadmium et de zinc des racines vers les parties aériennes. Cette absence de corrélation

pourrait être expliquée à titre d'exemple par l'existence d'une régulation post-transcriptionnelle des éventuels gènes impliqués dans ce phénomène, ou bien par une expression non limitante vis-à-vis de l'accumulation de cadmium et de zinc.

La Figure 6.7 donne un modèle approximatif simple des processus impliqués dans l'accumulation du Cd au niveau des cellules racinaires et foliaires de la laitue.



**Figure 6.7.** Modèle approximatif des processus impliqués dans l'accumulation du Cd au niveau des cellules racinaires et foliaires de la laitue. Les ions Cd<sup>2+</sup> sont, probablement, absorbés par les cellules végétales via des transporteurs de Fe<sup>2+</sup> (*LsIRTa* ?) et de Zn<sup>2+</sup> et voir même par des canaux de Ca<sup>2+</sup>. Des transporteurs localisés dans les membranes plasmiques des cellules adjacentes au xylème sont impliqués dans la charge du xylème. Au niveau des feuilles d'autres transporteurs sont impliqués dans la décharge du xylème. D'autres transporteurs sont impliqués dans la séquestration vacuolaire du cadmium. *LsPDRa* est probablement le représentant majeur de ce genre de transporteurs au niveau foliaire. V: Vacuole.



## Conclusions générales et perspectives



## Conclusions générales et perspectives

### 1. Conclusions générales

L'objectif général de la thèse était de caractériser aux niveaux physiologique, génétique, et moléculaire, les déterminants majeurs contrôlant l'accumulation du cadmium chez la laitue. Notre objectif a été décliné en différentes opérations. Tout d'abord une analyse de diversité nous a permis de décrire la capacité d'accumulation de cadmium de 18 génotypes de laitue et de sélectionner des variétés de laitue présentant des performances extrêmes vis-à-vis du cadmium. Ces variétés ont été utilisées dans des étapes ultérieures pour développer une approche physiologique et une approche génétique. L'approche physiologique avait pour objectif de caractériser l'origine de la différence d'accumulation de cadmium observée entre les variétés étudiées. L'approche génétique a visé à préciser le déterminisme, simple ou complexe, des caractères contrôlant l'accumulation de cadmium chez la laitue. Ces deux approches ont été complétées par une analyse moléculaire dont l'objectif était de déterminer si des corrélations peuvent être établies entre les teneurs tissulaires de cadmium mesurées chez les variétés de laitue et les niveaux d'expression de gènes décrits chez des espèces modèles comme des déterminants du contrôle de l'accumulation de cadmium.

#### 1.1. Analyse de la diversité phénotypique de tolérance au cadmium et d'accumulation de cadmium au sein de l'espèce laitue

Le premier objectif des travaux présentés dans ce manuscrit était de réaliser un criblage phénotypique de 18 génotypes de laitue afin de sélectionner des génotypes présentant des performances extrêmes vis-à-vis du cadmium, et ce, dans le but de les utiliser ultérieurement dans l'identification des bases physiologiques, génétiques et moléculaires qui sous-tendent leurs diversités.

À l'issue de cette analyse, nous avons pu mettre en évidence une grande variabilité de réponse entre les différents génotypes de laitue vis-à-vis du cadmium. Concernant la tolérance au cadmium, deux variétés de laitue présentant des comportements extrêmes ont été identifiées qui sont la variété Delsay (tolérante) et la variété Roxette (sensible).

En ce qui concerne, l'accumulation de cadmium, les résultats de notre criblage phénotypique nous ont permis d'identifier des variétés extrêmes pour ce caractère, particulièrement la variété Paris Island Cos comme étant la variété la moins accumulatrice de cadmium et les deux variétés Kordaat et Fenja comme étant les deux variétés les plus accumulatrices de cadmium.

Enfin, la variété Red Salad Bowl a présenté un comportement intéressant qui est qu'elle possède la capacité la plus élevée de translocation de cadmium des racines vers les parties aériennes. Par contraste la variété Kordaat a montré la capacité la plus faible de translocation de cadmium des racines vers les parties aériennes.

Il faut particulièrement noter qu'aucune corrélation n'a été mise en évidence entre les trois caractères étudiés (tolérance au cadmium, accumulation de cadmium et translocation de cadmium des racines vers les parties aériennes) ce qui suggère que nos caractères sont indépendants génétiquement.

## **1.2. Recherche des déterminants physiologiques contrôlant l'accumulation du cadmium chez la laitue**

Dans une deuxième étape, les variétés extrêmes pour les caractères d'accumulation de cadmium et de translocation de cadmium des racines vers la partie aérienne ont été utilisées pour développer une approche physiologique. L'objectif de cette approche était de montrer l'origine de leur variabilité afin de comprendre les déterminants physiologiques contrôlant l'accumulation du cadmium chez la laitue.

Dans le cadre de cette approche, nos résultats nous ont permis de montrer que quelle que soit la concentration du cadmium dans le milieu, la variété Paris Island Cos est la variété qui accumule le moins de cadmium dans ses feuilles et ses racines par comparaison aux variétés Kordaat et Red Salad Bowl. Des expériences d'efflux faites en utilisant du cadmium marqué ( $^{109}\text{Cd}$ ) ont montré que la variété Paris Island Cos se caractérise par un efflux de cadmium marqué plus important par comparaison aux deux variétés Red Salad Bowl et Kordaat. La variété Paris Island Cos possède vraisemblablement un mécanisme d'efflux plus efficace par comparaison aux autres variétés qui pourraient être le déterminant majeur permettant d'obtenir une plus faible accumulation de cadmium chez cette variété. Ce mécanisme pourrait être donc le déterminant principal expliquant la variabilité observée entre les variétés de laitue. Le principal candidat pour ce genre de transport est un éventuel "orthologue fonctionnel" au gène *PDR8* d'*A. thaliana* chez la laitue. En effet, Kim *et al.* (2007) suggèrent que

AtPDR8, un transporteur de la famille ABC localisé au niveau de la membrane plasmique, pourrait jouer un rôle important dans l'efflux du cadmium.

Notre étude a aussi permis d'analyser les effets de différentes concentrations de cadmium dans le milieu sur l'accumulation d'une série de cations et d'anions essentiels. Nos résultats ont notamment montré un effet marquant de l'augmentation des concentrations de cadmium dans le milieu de culture sur l'accumulation du zinc, et une forte corrélation positive entre teneur en cadmium et teneur en zinc quelle que soit la variété de laitue considérée. Ceci a permis d'émettre l'hypothèse d'un transport très associé entre le cadmium et le zinc. Une deuxième hypothèse permet aussi d'expliquer cette corrélation même dans le cas d'un transport indépendant entre zinc et cadmium. En effet, une telle corrélation peut être retrouvée aussi dans le cas d'une induction de la surexpression de systèmes de transport à la fois le zinc et le cadmium, séparément, par la présence du cadmium dans le milieu. Le principal candidat pour ce genre de transports est un éventuel " orthologues fonctionnel " au gène *AtIRT1* chez la laitue (Vert et *al.*, 2002). En effet, ce transporteur est régulé positivement dans des conditions de déficience ferrique (Connolly et *al.*, 2002). Dans ce contexte, la corrélation que nous avons observée entre cadmium et zinc pourrait être la conséquence du fait que la présence de cadmium déclenche directement ou indirectement un signal de carence en fer, ou en tous les cas une surexpression de systèmes de transport à la fois du zinc et du cadmium comme, à titre d'exemple, un "orthologue fonctionnel " à IRT1.

Notre étude physiologique a aussi permis de mettre en évidence un effet du cadmium sur l'accumulation de certains anions majeurs, en particulier le citrate. En effet, une corrélation positive entre translocation de cadmium des racines vers la partie aérienne et le niveau relatif du citrate entre les racines et les feuilles a été montrée. Cette corrélation suggère que le citrate pourrait être impliqué dans le transport du cadmium. En effet, plusieurs études parlent d'un éventuel rôle de chélation des ions cadmium par le citrate (Lugon-Moulin et *al.*, 2004). En particulier, des complexes Cd-citrate ont été identifiés dans la sève xylémique de plantes de tomate traitées par le cadmium (Senden et *al.*, 1995).

Enfin, notre étude physiologique a aussi permis de mettre en évidence un effet dépressif de l'augmentation des concentrations de fer et de calcium dans le milieu de culture sur l'accumulation du cadmium chez nos plantes de laitue. Ceci permet de penser que l'absorption de  $Cd^{2+}$  peut se faire d'une manière non spécifique via des

transporteurs de fer et/ou de calcium. Concernant le transport de fer, le principal candidat pour ce genre de transport est le gène *AtIRT1* (Vert *et al.*, 2002). En ce qui concerne le calcium, l'idée que l'absorption de  $\text{Cd}^{2+}$  puisse être réalisée par l'intermédiaire de systèmes de transport calciques est survenue suite à des études de Perfus-Barbeoch *et al.* (2002) qui ont montré par électrophysiologie que les canaux calciques des cellules de garde sont perméables au  $\text{Cd}^{2+}$ . De même, Antosiewicz et Hennig (2004) suggèrent que LCT1, qui est un transporteur de cations essentiels de blé, peut aussi transporter le  $\text{Cd}^{2+}$ . Cependant, aucun gène orthologue à *LCT1* n'a été identifié chez les dicotylédones et on ne peut peut-être pas généraliser les observations faites sur le blé.

### **1.3. Étude des déterminismes génétiques de la tolérance au cadmium, de l'accumulation de cadmium et de la translocation du cadmium des racines vers les parties aériennes**

Dans le but de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans l'accumulation du cadmium chez la laitue nous avons élaboré une approche génétique. Cette approche a visé à préciser le déterminisme, simple ou complexe, des caractères d'accumulation de cadmium et de translocation du cadmium des racines vers les parties aériennes. Pour cela des croisements ont été réalisés entre les génotypes les plus extrêmes. À la suite de ces croisements, les populations F1 et F2 ont été analysées. Dans le but de déterminer les « acteurs » moléculaires contrôlant l'accumulation de cadmium chez la laitue, une tentative de cartographie a été également réalisée dans le cadre de cette approche.

Les résultats de l'analyse des plantes F1 ont montré qu'on est en présence d'une dominance forte, voire absolue, des caractères de sensibilité au cadmium, d'accumulation du cadmium et de translocation du cadmium des racines vers les parties aériennes. Pour ces trois caractères, les plantes F1 issues des deux sens de croisement ont montré un comportement identique, ce qui prouve que ces caractères ne sont pas des liés au sexe (c.-à-d. ne sont pas codés par des gènes appartenant au génome chloroplastique ou mitochondrial chez la laitue).

Les analyses des plantes F2 pour les deux caractères d'accumulation de cadmium et de translocation du cadmium des racines vers les parties aériennes ont permis de montrer que la distribution phénotypique n'est pas bimodale pour les deux caractères étudiés, indiquant que ces caractères ne semblent pas présenter des cas typiques de

monohybridisme. Ces deux caractères pourraient donc être contrôlés par plus qu'un seul gène. Pour le caractère d'accumulation de cadmium, notre résultat est en accord avec une étude génétique réalisée sur la plante modèle « hyperaccumulatrice » du cadmium *T. caerulescens* (Deniau et al., 2006). En effet, cette étude a permis d'identifier la présence de 2 QTLs pour le caractère d'accumulation de cadmium dans les racines de *T. caerulescens*, d'où l'implication de plusieurs gènes pour contrôler ce caractère (Deniau et al., 2006). De même une étude récente a permis d'identifier 3 QTLs associées au caractère d'accumulation foliaire de cadmium chez le riz, d'où l'implication d'au moins 3 gènes dans ce caractère (Tezuka et al., 2010). Cependant, nos données montrent qu'il y a une forte variabilité interindividuelle au sein même des lignées parentales (qui sont des lignées pures). Il en résulte donc que des facteurs non génétiques (facteurs environnementaux liés à la culture par exemple, ou simplement imprécision des mesures) altèrent la qualité des résultats. Dans ces conditions, on ne peut pas exclure que les résultats obtenus lors de l'étude des populations F2 correspondent malgré tout aux résultats qu'on aurait obtenus en présence d'un caractère monogénique dominant.

Suite à une mesure des teneurs en zinc dans les plantes de la population F2, les résultats ont montré que ces plantes présentaient un comportement similaire pour les caractères de translocation du zinc et de translocation du cadmium des racines vers les parties aériennes. Ce résultat permet d'émettre à nouveau l'hypothèse d'un transport très associé entre le cadmium et le zinc. La même variabilité entre les variétés de laitue pour la translocation du zinc et du cadmium des racines vers les parties aériennes peut être expliquée par une surexpression différentielle, entre ces variétés, d'un ou de plusieurs transporteurs non spécifiques de zinc qui peuvent également accepter  $\text{Cd}^{2+}$  comme substrat. Le principal candidat pour ce genre de transport est un éventuel " orthologue fonctionnel " à *HMA4* d'*A. thaliana* (Verret et al. 2004) chez la laitue. Enfin, notre analyse a permis de confirmer la corrélation entre l'accumulation du zinc et celle du cadmium déjà observée lors de notre étude physiologique.

Durant cette étude un essai de cartographie a été tenté afin d'identifier des locus potentiellement impliqués dans la l'accumulation du cadmium. Suite à notre tentative, nous n'avons pas pu identifier de QTL pour le caractère d'accumulation de cadmium chez la laitue. Ceci pourrait être expliqué surtout par l'insuffisance de la précision de la mesure phénotypique.

#### 1.4. Recherche des gènes candidats impliqués dans le contrôle de l'accumulation de cadmium

Dans le but de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans l'accumulation du cadmium chez la laitue, nous avons complété les approches d'analyse de la diversité, de physiologie et de génétique par une approche moléculaire. Cette approche avait comme objectif l'identification de corrélations, si elles existent, entre l'accumulation de cadmium dans les racines et/ou les feuilles et le niveau d'expression de gènes candidats décrits chez les espèces modèles comme impliqués dans le contrôle de l'accumulation de cadmium. Cette approche a été déclinée en trois étapes. Une recherche bibliographique a d'abord permis d'identifier des gènes réputés contrôler l'accumulation de cadmium. Le clonage de fragments de gènes de laitue orthologues à ces gènes candidats a ensuite été entrepris, puis les séquences correspondantes ont été déterminées. Le niveau d'expression de ces gènes a enfin été évalué par PCR quantitative et comparé aux teneurs en cadmium mesurées dans les racines et/ou les feuilles. Puisque notre étude physiologique a permis d'émettre l'hypothèse d'un transport très associé entre le cadmium et le zinc, des mesures des teneurs de zinc ont aussi été effectuées afin de vérifier davantage cette hypothèse.

L'étude bibliographique a permis de sélectionner les gènes *HMA4*, *IRT1* et *PDR8* d'*A. thaliana* qui sont des transporteurs de métaux, et les gènes *GS* (glutathion synthase) et  $\gamma$ -*GCS* ( $\gamma$ -glutamylcystéine synthase) qui interviennent dans la synthèse du glutathion, un précurseur de la synthèse des phytochélatines.

Dès les premiers essais, les clonages ont été effectués avec succès pour les deux gènes  $\gamma$ -*GCS* et *GS*. Ce succès rapide a été la conséquence du fait de la présence de gènes strictement orthologues à ces deux gènes chez la laitue. Pour les autres gènes, la situation s'est avérée plus complexe. Une étude bioinformatique faite sur les familles des transporteurs HMA, ZIP (dont fait partie *IRT1*) et ABC (dont fait partie *PDR8*) a montré l'inexistence de gènes strictement orthologues à *HMA4*, *IRT1* et *PDR8* chez les espèces dont le génome est entièrement séquencé autres que les Brassicacées, ce qui suggère qu'il pourrait en être de même chez la laitue. De fait, nous n'avons pas été capables de trouver des gènes strictement orthologues à *HMA4*, *IRT1* et *PDR8* chez la laitue.

À la suite de cette conclusion, nous avons décidé de choisir de continuer notre étude en travaillant sur des gènes *LsHMA* (1 gène), *LsPDRs* (3 gènes) et *LsIRTs* (2 gènes) dont les séquences étaient présentes dans les banques de données et qui sont vraisemblablement les " orthologues fonctionnels " à nos gènes candidats d'*A. thaliana*. Dans une étape ultérieure, ces gènes ont été clonés avec succès. Lors de nos manipulations de clonage, une deuxième " version " du gène *LsHMA* a été identifiée par hasard chez la laitue. Afin d'étudier son expression par PCR quantitative, ce « nouveau » gène a également été cloné.

Suite à la réalisation de l'expérience de PCR quantitative, nos résultats ont montré une éventuelle implication d'un des 2 gènes *LsIRTs* (*LsIRTa*) dans l'accumulation du cadmium au niveau racinaire, et d'un des 3 gènes *LsPDRs* (*LsPDRa*) dans l'accumulation du cadmium et du zinc au niveau foliaire.

L'éventuelle implication du gène *LsIRTa* dans le contrôle de l'accumulation du cadmium au niveau racinaire incite à penser que ce gène est vraisemblablement un "orthologue fonctionnel" au gène *AtIRT1*, lequel code un transporteur représentant la principale voie d'absorption du  $Fe^{2+}$  par les cellules racinaires chez *A. thaliana* (Vert *et al.*, 2002). Ce résultat est en accord avec notre étude physiologique qui a permis de mettre en évidence un effet marquant de l'augmentation de la concentration de fer dans le milieu de culture sur la limitation de l'accumulation du cadmium chez nos plantes de laitue. Donc notre approche moléculaire conforte l'hypothèse que le cadmium est absorbé de manière non spécifique dans les racines *via* des transporteurs de fer chez la laitue. Néanmoins, nos résultats suggèrent que ce gène ne serait probablement impliqué que dans 50% de l'absorption racinaire de cadmium. Ce résultat pourrait être en concordance avec nos résultats de l'étude du déterminisme génétique qui privilégient l'existence de plusieurs gènes impliqués dans l'accumulation de cadmium au niveau des racines. Vue la forte corrélation observée entre l'accumulation du zinc et celle du cadmium lors de notre étude physiologique, la deuxième voie impliquée dans l'absorption du cadmium au niveau racinaire, si deuxième voie il y a, ferait intervenir un ou plusieurs transporteurs de zinc.

Enfin et comme cela a été mentionné ci-dessus, nos résultats ont montré une corrélation positive entre l'expression du gène *LsPDRa* et l'accumulation du zinc et du cadmium au niveau foliaire. Ce gène est donc potentiellement impliqué dans le contrôle de ces deux caractères. Cependant, il est peu probable que ce gène soit un "orthologue fonctionnel" au gène *AtPDR8*. En effet, *AtPDR8* code un transporteur

jouant un rôle dans l'efflux du cadmium et donc dans le maintien d'une teneur réduite en cadmium dans les tissus chez *A. thaliana* (Kim *et al.*, 2007) alors que *LsPDRa* aurait plutôt tendance à contribuer à une augmentation de l'accumulation de cadmium dans les feuilles de laitue.

## 2. Perspectives

Ce travail a montré que le caractère d'accumulation du cadmium chez la laitue est un caractère complexe qui est contrôlé par plusieurs " acteurs " moléculaires, et qui ne pourrait être en aucun cas expliqué par la fonction d'un seul gène.

Malgré l'amélioration de nos connaissances sur les mécanismes impliqués dans le contrôle de l'accumulation du cadmium chez la laitue et malgré l'identification de deux gènes qui sont vraisemblablement impliqués dans ce phénomène, nous sommes encore au début du chemin dans nos recherches et il reste beaucoup de travail à réaliser afin de mieux comprendre ce phénomène.

En perspective, cette étude pourrait être approfondie par:

- l'étude de l'effet du zinc sur l'accumulation du cadmium,
- l'étude d'expression de nos gènes de laitue dans diverses conditions de culture,
- l'évaluation du pouvoir prédictif des corrélations obtenues entre l'accumulation du cadmium et le niveau d'expression des gènes identifiés grâce à l'expérience PCR quantitative, et ce en testant des variétés qui ne faisaient pas partie du crible initial ou en étudiant des individus ou des pools contrastés dans les populations F2 par exemple,
- la caractérisation des gènes de laitue identifiés grâce à l'expérience PCR quantitative en utilisant des systèmes d'expression hétérologue (levure) ou bien d'autres plantes (*A. thaliana*),
- la localisation cellulaire des protéines correspondantes aux gènes de laitue identifiés grâce à l'expérience PCR quantitative,
- l'identification et la caractérisation du (ou des) déterminant(s) majeur(s) responsable(s) de l'efflux « accru » de cadmium observé chez la variété Paris Island Cos,
- l'amélioration de l'analyse cartographique afin d'identifier de nouveaux locus impliqués dans la l'accumulation du cadmium ou bien de confirmer l'implication des gènes identifiés grâce à l'expérience de PCR quantitative,

- et enfin, la production puis l'étude des plantes de laitue transgéniques sous-exprimant l'un des gènes identifiés par l'expérience de PCR quantitative comme impliqués dans le contrôle de l'accumulation du cadmium afin de voir quel serait l'impact de cette modification d'expression sur l'accumulation de cadmium, le but étant d'obtenir des plantes accumulant moins de cadmium dans leurs tissus.



## Références bibliographiques



## Références bibliographiques

- **Ahmad P, Nabi G, Ashraf M (2010)** Cadmium-induced oxidative damage in mustard [*Brassica juncea* (L.) Czern. & Coss.] plants can be alleviated by salicylic acid. *S Afr J Bot*, In Press
- **Alcántara E, Romera FJ, Cañete M, De la Guardia MD (1994)** Effects of heavy metals on both induction and function of root Fe(III) reductase in Fe-deficient cucumber (*Cucumis sativus* L.) plants. *J Exp Bot* **45**: 1893-1898
- **Alexander PD, Alloway BJ, Dourado AM (2006)** Genotypic variations in the accumulation of Cd, Cu, Pb and Zn exhibited by six commonly grown vegetables. *Environ Pollut* **144**: 736-745
- **Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990)** Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**: 403-410
- **Antosiewicz DM, Hennig J (2004)** Overexpression of LCT1 in tobacco enhances the protective action of calcium against cadmium toxicity. *Environ Pollut* **129**: 237-245
- **Arduini I, Masoni A, Mariotti M, Ercoli L (2004)** Low cadmium application increase *miscanthus* growth and cadmium translocation. *Environ Exp Bot* **52**: 89-100
- **Asada K (1999)** The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **50**: 601-639
- **Asp H, Gussarsson M, Adalsteinson S, Lensén P (1994)** Control of potassium influx in roots of birch (*Betula pendula*) seedlings exposed to cadmium. *J Exp Bot* **45**: 1823-1827
- **Astolfi S, Zuchi S, Passera C (2004)** Role of sulphur availability on cadmium-induced changes of nitrogen and sulphur metabolism in maize (*Zea mays* L.) leaves. *J Plant Physiol* **161**: 795-802
- **Astolfi S, Zuchi S, Passera C (2005)** Effect of cadmium on H<sup>+</sup>ATPase activity of plasma membrane vesicles isolated from roots of different S-supplied maize (*Zea mays* L.) plants. *Plant Science* **169**: 361-368
- **Axelsen KB, Palmgren MG (2001)** Inventory of the superfamily of P-type ion pumps in Arabidopsis. *Plant Physiol* **126**: 696-706
- **Báckor M, Fahselt D, Wu CT (2004)** Free proline content is positively correlated with copper tolerance of the lichen photobiont *Trebouxia erici* (Chlorophyta). *Plant Sci* **167**: 151-157
- **Barbier O, Jacquillet G, Tauc M, Cougnon M, Poujeol P (2005)** Effect of heavy metals on, and handling by, the kidney. *Nephron Physiol* **99**: p105-110
- **Barcelo J, Ch Pochenrieder, Andreu I (1986)** Cadmium-induced decrease of water stress resistance in bush bean plants (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Contender). I. Effects of Cd on water potential, relative water content and cell wall elasticity. *J Plant Physiol* **125**: 17-25
- **Barcelo J, Vázquez MD, Poschenrieder C (1988)** Cadmium induced structural and ultrastructural changes in the vascular system of bush bean stems. *Bot Acta* **101**: 254-261

- **Baryla A, Carrier P, Franck F, Coulomb C, Sahut C, Havaux M (2001)** Leaf chlorosis in oilseed rape plants (*Brassica napus*) grown on cadmium-polluted soil: causes and consequences for photosynthesis and growth. *Planta* **212**: 696-709
- **Baxter I, Tchieu J, Sussman MR, Boutry M, Palmgren MG, Gribskov M, Harper JF, Axelsen KB (2003)** Genomic comparison of P-type ATPase ion pumps in Arabidopsis and rice, *Plant Physiol* **132**: 618-628
- **Beji Sassi A, Sassi S (1999)** Le cadmium associé aux dépôts phosphatés en Tunisie méridionale (Cadmium associated with phosphate deposits in southern Tunisia). *J Afr Earth Sci* **29**: 501-513
- **Benavides MP, Gallego SM, Tomaro ML (2005)** Cadmium toxicity in plants. *Braz J Plant Physiol* **17**: 21-34
- **Bennett MH, Mansfield JW, Lewis MJ, Beale MH (2002)** Cloning and expression of sesquiterpene synthase genes from lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Phytochemistry* **60**: 255-261
- **Berkelaar E, Hale BA (2003)** Accumulation of cadmium by durum wheat roots: bases for citrate-mediated exceptions to the free ion model. *Environ Toxicol Chem* **22**: 1155-1161
- **Bingham F T, Sposito G, Strong J E (1986)** The effect of sulfate on the availability of cadmium. *Soil Sci* **141**: 172-177
- **Boulila Zoghalmi L, Djebali W, Chaibi W, Ghorbel MH (2006)** Physiological and structural modifications induced by cadmium-calcium interaction in tomato (*Lycopersicon esculentum*). *C R Biol* **329**: 702-711
- **Bourrelier PH, Berthelin J (1998)** Contamination des sols par les éléments en traces: les risques et leur gestion. Rapport de l'Académie des sciences n°42
- **Boussama N, Ouariti O, Suzuki A, Ghorbel MH (1999)** Cd-stress on nitrogen assimilation. *J Plant Physiol* **155**: 310-317
- **Bovet L, Eggmann T, Meylan-bettex M, Polier J, Kammer P, Marin E, Feller U and Martnoia E (2003)** Transcript levels of *AtMRPs* after cadmium treatment: induction of *AtMRP3*. *Plant Cell Environ* **26**: 371-381
- **Breckle SW, Kahle H (1992)** Effects of toxic heavy metals (Cd, Pb) on growth and mineral nutrition of beech (*Fagus sylvatica* L.). *Vegetatio* **1001**: 43-53
- **Bressler JP, Olivi L, Cheong JH, Kim Y, Bannona D (2004)** Divalent metal transporter 1 in lead and cadmium transport. *Ann N Y Acad Sci* **1012**: 142-152
- **Cataldo DA, McFadden KM, Garland TR, Wildung RE (1988)** Organic constituents and complexation of nickel(II), iron(III), cadmium(II) and potonium (IV) in soybean xylem exsudates. *Plant Physiol* **86**: 734-739
- **Cellier M, Gros P (2004)** The Nramp Family, *Eurekah.com* and *Kluwer Academic/Plenum Publishers*, Georgetown, Texas, USA
- **Chaffei C, Pageau K, Suzuki A, Gouia H, Ghorbel MH, Masclaux-Daubresse C (2004)** Cadmium toxicity induced changes in nitrogen management in *Lycopersicon esculentum* leading to a metabolic safeguard through an amino acid storage strategy. *Plant Cell Physiol* **45**: 1681-1693
- **Chaignon V (2001)** Biodisponibilité du cuivre dans la rhizosphère de différentes plantes cultivées. Cas de sols viticoles contaminés par des fongicides. Thèse de Doctorat. Université d'Aix-Marseille
- **Chaoui A, El Ferjani E (2004)** Impact of cadmium and copper excess on cell wall peroxidases in Pea stems. *Pak J Biol Sci* **7**: 902-904

- **Chaoui A, El Ferjani E (2005)** Effects of cadmium and copper on antioxidant capacities, lignification and auxin degradation in leaves of pea (*Pisum sativum* L.) seedlings. *C R Biol* **328**: 23-31
- **Chaudri AM, Zhao FJ, McGrath SP, Crosland A (1995)** The cadmium content of british wheat grain. *J Environ Qual* **24**: 850-855
- **Chen LQ, Guo YF, Yang LM, Wang QQ (2007)** SEC-ICP-MS and ESI-MS/MS for Analyzing *In Vitro* and *In Vivo* Cd-Phytochelatin Complexes in a Cd-Hyperaccumulator *Brassica chinensis*. *J Anal Atom Spectrom* **22**: 1403-1408
- **Chen W, Li L, Chang AC, Wu L, Kwon SI, Bottoms R (2008)** Modeling uptake kinetics of cadmium by field-grown lettuce. *Environ Pollut* **152**: 147-152
- **Cho UH, Seo NH (2005)** Oxidative stress in *Arabidopsis thaliana* exposed to cadmium is due to hydrogen peroxide accumulation. *Plant Sci* **168**: 113-120
- **Chugh LK Gupta VK Sawhney SK (1992)** Effect of cadmium on enzymes of nitrogen metabolism in pea seedlings. *Phytochemistry* **31**: 395-400
- **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. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 12043-12048
- **Clemens S, Kim EJ, Neumann D, Schroeder JI (1999)** Tolerance to toxic metals by a gene family of phytochelatin synthases from plants and yeast. *EMBO J* **18**: 3325-3333
- **Clemens S, Palmgren MG, Krämer U (2002a)** A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation. *Trends Plant Sci* **7**: 309-315
- **Clemens S, Bloss T, Vess C, Neumann D, Nies DH, Zur Nieden U (2002b)** A transporter in the endoplasmic reticulum of *Schizosaccharomyces pombe* cells mediates zinc storage and differentially affects transition metal tolerance. *J Biol Chem* **277**: 18215-18221
- **Cobbett C, Goldsbrough P (2002)** Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annu Rev Plant Biol* **53**: 159-182
- **Cohen CK, Fox TC, Garvin DF, Kochian LV (1998)** The role of iron deficiency stress responses in stimulating heavy-metal transport in plants. *Plant Physiol* **116**: 1063-1072
- **Connolly EL, Fett JP, Guerinot ML (2002)** Expression of the IRT1 metal transporter is controlled by metals at the levels of transcript and protein accumulation. *Plant Cell* **14**: 1347-1357
- **Corpet F (1988)** Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res* **16**: 10881-10890
- **Cosio C, DeSantis L, Frey B, Diallo S, Keller C (2005)** Distribution of cadmium in leaves of *Thlaspi caerulescens*. *J Exp Bot* **56**: 765-775
- **Costa G, Michaut J, Morel J (1994)** Influence of cadmium on water relations and gas exchanges, in phosphorus deficient *Lupinus albus* L.. *Plant Physiol Biochem* **32**: 105-114

- **Costa G, Morel JL (1994a)** Efficiency of H<sup>+</sup>-ATPase activity on cadmium uptake by four cultivars of lettuce. *J Plant Nutr* **17**: 627-637
- **Costa G, Morel JL (1994b)** Water relation, gaz exchange and amino acid content in Cd-treated lettuce. *J Plant Physiol Biochem* **32**: 561-570
- **Coullery P (1997)** Comportement de métaux lourds en agrosystèmes tempérés à faible taux de pollution. Thèse de Doctorat. Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne, Lausanne
- **Courbot M, Willems G, Motte P, Arvidsson S, Roosens N, Saumitou-Laprade P, Verbruggen N (2007)** A major quantitative trait locus for cadmium tolerance in *Arabidopsis halleri* colocalizes with *HMA4*, a gene encoding a heavy metal ATPase. *Plant Physiol* **144**: 1052-1065
- **Curie C, Cassin G, Couch D, Divol F, Higuchi K, Le Jean M, Misson J, Schikora A, Czernic P, Mari S (2009)** Metal movement within the plant: contribution of nicotianamine and yellow stripe 1-like transporters. *Ann Bot* **103**: 1-11
- **Cutler JM, Rains DW (1974)** Characterization of cadmium uptake by plant tissue. *Plant Physiol* **54**: 67-71
- **Dafré AL, Sies H, Akerboom T (1996)** Protein S-thiolation and regulation of microsomal glutathione transférase activity by the glutathione redox couple. *Arch Biochem Biophys* **332**: 288-294
- **Dahmani-Müller H (2000)** Phytoréhabilitation des sols pollués par des éléments métalliques : facteurs et mécanismes de prélèvement dans les sols et d'accumulation par les espèces métalliques. Thèse de Doctorat, ENGREF, Paris
- **Dahmani-Müller H, van Oort F, Balabane M (2001)** Metal extraction by *Arabidopsis halleri* grown on an unpolluted soil amended with various metal-bearing solids: a pot experiment. *Environ Pollut* **114**: 77-84
- **Dahmani-Müller H, Van Oort F, Gelie B, Balabane M (2000)** Strategies of heavy metal uptake by three plant species growing near a metal smelter. *Environ Pollut* **109**: 1-8
- **DalCorso G, Farinati S, Maistri S, Furini A (2008)** How plants cope with cadmium: staking all on metabolism and gene expression. *J Integr Plant Biol* **50**: 1268-1280
- **Das P, Samantaray S, Rout GR (1997)** Studies on cadmium toxicity in plants: a review. *Environ Pollut* **98**: 29-36
- **Dat J, Vandenabeele S, Vranova E, Van Montagu M, Inze D, Van Breusegem F (2000)** Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cell Mol Life Sci* **57**: 779-795
- **De La Rosa G, Peralta-Videa JR, Montes M, Parsons JG, Cano-Aguilera I, Gardea-Torresdey JL (2004)** Cadmium uptake and translocation in tumbleweed (*Salsola kali*), a potential Cd-hyperaccumulator desert plant species: ICP/OES and XAS studies. *Chemosphere* **55**: 1159-1168
- **De Pieri LA, Buckley WT, Kowalenko CG (1996)** Micronutrient concentrations of commercially grown vegetables and of soils in the Lower Fraser Valley of British Columbia. *Can J Soil Sci* **76**: 173-182
- **De Pieri LA, Buckley WT, Kowalenko CG (1997)** Cadmium and lead concentrations of commercially grown vegetables and soils in the Lower Fraser Valley of British Columbia. *Can J Soil Sci* **77**: 51-57
- **Decloître F (1998)** La part des différents aliments dans l'exposition au plomb, au

- cadmium et au mercure, en France. Cah Nutr Diét **33**: 167-175.
- **Denaix L (2007)** Transfert sol-eau-plante d'éléments traces dans les écosystèmes cultivés contaminés. Mémoire d'Habilitation à Diriger des Recherches. Université de Pau et des Pays de l'Adour
  - **Deneux-Mustin S, Roussel-Debet S, Mustin C, Henner P, Munier-Lamy C, Colle C, Berthelin J, Garnier-Laplace J, Leyval C (2003)**. Mobilité et transfert racinaire des éléments en traces: influence des micro-organismes du sol. Technétium In: Tec&Doc. Lavoisier, Paris, 233-240
  - **Deniau AX, Pieper B, Ten Bookum WM, Lindhout P, Aarts MG, Schat H (2006)** QTL analysis of cadmium and zinc accumulation in the heavy metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. Theor Appl Genet **113**: 907-920
  - **Dietz KJ, Baier M, Krämer U (1999)** Free radical and reactive oxygen species as mediators of heavy metals toxicity in plants. In: Prasad MNV, Hagemeyer J, eds. Heavy metal stress in plants: from molecules to ecosystems. Berlin: Springer-Verlag, pp: 73-97
  - **Djebali W, Zarrouk M, Brouquise R, El Kahoui S, Limam F, Ghorbel MH, Chaibi W (2005)** Ultrastructure and lipid alterations induced by cadmium in tomato (*Lycopersicon esculentum*) chloroplast membranes. Plant Biol (Stuttg) **7**: 358-368
  - **Ebbs S, Uchil S (2008)** Cadmium and zinc induced chlorosis in Indian mustard [*Brassica juncea* (L.) Czern] involves preferential loss of chlorophyll *b*. Photosynthetica **46**: 49-55
  - **Elmayan T, Tepfer M (1994)** Synthesis of a bifunctional metallothionein/beta-glucuronidase fusion protein in transgenic tobacco plants as a means of reducing leaf cadmium levels. Plant J **6**: 433-440
  - **Faller P, Kienzler K, Krieger-Liszkay A (2005)** Mechanism of Cd<sup>2+</sup> toxicity: Cd<sup>2+</sup> inhibits photoactivation of photosystem II by competitive binding to the essential Ca<sup>2+</sup> site, BBA-Bioenergetics **1706**: 158-164
  - **Fediuc E, Lips SH, Erdei L (2005)** O-acetylserine (thiol) lyase activity in Phragmites and Typha plants under cadmium and NaCl stress conditions and the involvement of ABA in the stress response. J Plant Physiol **162**: 865-872
  - **Felsenstein J (1985)** Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. Evolution **39**: 783-791
  - **Florijn PJ, Nelemans JA, Van Beusichem ML (1991)** Cadmium uptake by lettuce varieties. Neth J Agric Sci **39**: 103-114
  - **Florijn PJ, Van Beusichem ML (1993)** Uptake and Distribution of Cadmium in Maize Inbred Lines. Plant Soil **150**: 25-32
  - **Fox TC, Guerinot ML (1998)** Molecular biology of cation transport in plants. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol. **49**: 669-696
  - **Frery N, Nessmann C, Girard F, Lafond J, Moreau T, Blot P, Lellouch J, Huel G (1993)** Environmental exposure to cadmium and human birthweight. Toxicology **79**:109-118
  - **Garate A, Ramos I, Manzanares M, Lucena JJ (1993)** Cadmium uptake and distribution in three cultivars of *Lactuca* sp. Bull Environ Contam Toxicol **50**: 709-716
  - **Ghnaya T, Nouairi I, Slama I, Messedi D, Grignon C, Abdely C, Ghorbel MH (2005)** Cadmium effects on growth and mineral nutrition of two halophytes: *Sesuvium portulacastrum* and *Mesembryanthemum crystallinum*. J Plant Physiol **162**: 1133-1140

- **Ghnaya T, Slama I, Messedi D, Grignon C, Ghorbel MH, Abdelly C (2007)** Cd-induced growth reduction in the halophyte *Sesuvium portulacastrum* is significantly improved by NaCl. *J Plant Res* **120**: 309-316
- **Girling CA, Peterson PJ (1981)** The significance of the cadmium species in uptake and metabolism of cadmium in crop plants. *J Plant Nutr* **3**: 707-720
- **Godt J, Scheidig F, Grosse-Siestrup C, Esche V, Brandenburg P, Reich A and Groneberg D (2006)** The toxicity of cadmium and resulting hazards for human health. *J Occup Med Toxicol* **1**: 22-27
- **Goldsbrough P (2000)** Metal tolerance in plants: the role of phytochelatins and metallothioneins. In: Terry N, Banuelos G, eds. *Phytoremediation of contaminated soil and water*. CRC Press LLC, pp: 221-233
- **Gong JM, Lee DA, Schroeder JI (2003)** Long-distance root-to-shoot transport of phytochelatins and cadmium in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 10118-10123
- **Goyer RA, Liu J, Waalkes MP (2004)** Cadmium and cancer of prostate and testis. *Biometals* **17**: 555-558
- **Gravot A, Lieutaud A, Verret F, Auroy P, Vavasseur A, Richaud P (2004)** AtHMA3, a plant P<sub>1B</sub>-ATPase, functions as a Cd/Pb transporter in yeast. *FEBS Lett* **561**: 22-28
- **Gray CW, McLarren RC, Roberts AHC, Condron LM (1999)** Cadmium phytoavailability in some New Zealand soils. *Aust J Soil Res* **37**: 461-477
- **Greger M, Brammer E, Lindberg S, Larsson G, Idestam-Almquist J (1991)** Uptake and physiological effects of cadmium in sugar beet (*Beta vulgaris*) related to mineral provision. *J Exp Bot* **42**: 729-737
- **Greger M, Lindberg S (1986)** Effect of cadmium and EDTA on young sugar beets (*Beta vulgaris*). In cadmium uptake and sugar accumulation. *Physiol Plant* **66**: 69-74
- **Grill E, Winnacker EL, Zenk MH (1985)** Phytochelatins: the principal heavy-metal complexing peptides of higher plants. *Science* **230**: 674-676
- **Grotz N, Fox T, Connolly E, Park W, Guerinot ML, Eide D (1998)** Identification of a family of zinc transporter genes from *Arabidopsis* that respond to zinc deficiency. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 7220-7224
- **Guedry O, Lazard M, Delort F, Dauplais M, Grigoras I, Blanquet S, Plateau P (2003)** Ycf1p-dependent Hg(II) detoxification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem* **270**: 2486-2496
- **Guerinot ML (2000)** The ZIP family of metal transporters. *Biochim Biophys Acta* **1465**: 190-198
- **Guo TR, Zhang GP, Zhou MX, Wu FB, Chen JX (2007)** Influence of aluminum and cadmium stresses on mineral nutrition and root exudates in two barley cultivars. *Pedosphere* **17**: 505-512
- **Gussarsson M (1994)** Cadmium-induced alterations in nutrient composition and growth of *Betula pendula* seedlings: the significance of fine roots as primary target for cadmium toxicity. *J Plant Nutr* **17**: 2151-2163
- **Ha SB, Smith AP, Howden R, Dietrich WM, Bugg S, O'Connell MJ, Goldsbrough PB, Cobbett CS (1999)** Phytochelatin synthase genes from *Arabidopsis* and the yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Plant Cell* **11**: 1153-1164
- **Haghir F (1974)** Plant uptake of cadmium as influenced by cation exchange capacity,

- organic matter, zinc and soil temperature. *J Env Qual* **3**: 180-183
- **Hall JL (2002)** Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *J Exp Bot* **53**: 1-11
  - **Halliwell B, Gutteridge JMC (1999)** Free radicals in biology and medicine. 3rd ed. New York, Oxford University Press, 936 pp
  - **Hamer DH (1986)** Metallothionein. *Annu Rev Biochem* **55**: 913-951
  - **Hanikenne M (2003)** *Chlamydomonas reinhardtii* as a eukaryotic photosynthetic model for studies of heavy metal homeostasis and tolerance, *New Phytol* **159**: 331-340
  - **Hanikenne M, Talke IN, Haydon MJ, Lanz C, Nolte A, Motte P, Kroymann J, Weigel D, Kramer U (2008)** Evolution of metal hyperaccumulation required *cis*-regulatory changes and triplication of *HMA4*. *Nature* **453**: 391-395
  - **Hardiman RT, Jacoby B (1984)** Absorption and translocation of Cd in bush beans (*Phaseolus vulgaris*). *Physiol Plant* **61**: 670-674
  - **Hart JJ, Norvell WA, Welch RM, Sullivan LA, Kochian LV (1998a)** Characterization of zinc uptake, binding, and translocation in intact seedlings of bread and durum wheat cultivars. *Plant Physiol* **118**: 219-226
  - **Hart JJ, Welch RM, Norvell WA, Sullivan LA, Kochian LV (1998b)** Characterization of cadmium binding, uptake, and translocation in intact seedlings of bread and durum wheat cultivars. *Plant Physiol* **116**: 1413-1420
  - **Hasenstein KH, Evans ML, Stinemetz CL, Moore R, Fondren WM, Koon EC, Higby MA, Smucker AJ (1988)** Comparative effectiveness of metal ions in inducing curvature of primary roots of *Zea mays*. *Plant Physiol* **86**: 885-889
  - **Hayes A, Kudithipudi C, Van der Hoeven R (2009)** Transgenic plants modified for reduced cadmium transport, derivative products, and related methods. WO 2009/074325 A1
  - **He ZL, Yang XE, Stoffella PJ (2005a)** Trace elements in agroecosystems and impacts on the environment. *J Trace Elem Med Biol* **19**: 125-140
  - **He Z, Li J, Zhang H, Ma M (2005b)** Different effects of calcium and lanthanum on the expression of phytochelatin synthase gene and cadmium absorption in *Lactuca sativa*. *Plant Sci* **168**: 309-318
  - **Henson MC, Chedrese PJ (2004)** Endocrine disruption by cadmium, a common environmental toxicant with paradoxical effects on reproduction. *Exp Biol Med (Maywood)* **229**: 383-392
  - **Higgins CF (1992)** ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu Rev Cell Biol* **8**: 67-113
  - **Hinkle PM, Shanshala ED, 2nd, Nelson EJ (1992)** Measurement of intracellular cadmium with fluorescent dyes. Further evidence for the role of calcium channels in cadmium uptake. *J Biol Chem* **267**: 25553-25559
  - **Hirschi KD, Korenkov VD, Wilganowski NL, Wagner GJ (2000)** Expression of arabidopsis *CAX2* in tobacco. Altered metal accumulation and increased manganese tolerance. *Plant Physiol* **124**: 125-133
  - **Hovmand MF, Tjell JC, Mosbaek H (1983)** Plant uptake of airborne cadmium. *Environ Poll* **30**: 27-38
  - **Hsu YT, Kao CH (2004)** Cadmium toxicity is reduced by nitric oxide in rice leaves. *Plant Growth Regul* **42**: 227-238

- **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
- **Il'yasova D, Schwartz GG (2005)** Cadmium and renal cancer. *Toxicol Appl Pharmacol* **207**: 179-186
- **Inoue H, Nojima H, Okayama H (1990)** High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**: 23-28
- **Jarvis SC, Jones LHP, Hopper MJ (1976)** Cadmium uptake from solution by plants and its transport from roots to shoots. *Plant Soil* **44**: 179-191
- **Johnson MD, Kenney N, Stoica A, Hilakivi-Clarke L, Singh B, Chepko G, Clarke R, Sholler PF, Lirio AA, Foss C, Reiter R, Trock B, Paik S, Martin MB (2003)** Cadmium mimics the in vivo effects of estrogen in the uterus and mammary gland. *Nat Med* **9**: 1081-1084
- **Johnson WC, Jackson LE, Ochoa O, Peleman J, van Wijk R, St.Clair DA, Michelmore RW (2000)** A shallow-rooted crop and its wild progenitor differ at loci determining root architecture and deep soil water exploitation. *Theor Appl Genet* **101**: 1066-1073
- **Kabata-Pendias A, Pendias H (2001)** Trace elements in soils and plants. Third Edition. CRC Press Press, Boca Raton, Florida
- **Kazantzis G (1979)** Renal tubular dysfunction and abnormalities of calcium metabolism in cadmium workers. *Environ Health Perspect* **28**: 155-159
- **Kennedy CD, Gonsalves FAN (1987)** The action of divalent zinc cadmium, mercury, copper and lead on the trans-root potential and H<sup>+</sup> efflux of excised roots. *J Exp Bot* **38**: 800-817
- **Kesseli RV, Paran I, Michelmore RW (1994)** Analysis of a detailed genetic linkage map of *Lactuca sativa* (lettuce) constructed from RFLP and RAPD markers. *Genetics* **136**: 1435-1446
- **Kesseli RV, Witsenboer H, Stanghellini M, Vandermark G, Michelmore RW (1993)** Recessive resistance to *Plasmopara lactucae-radialis* maps by bulked segregant analysis to a cluster of dominant disease resistance genes in lettuce. *Mol Plant Microbe In* **6**: 722-728
- **Kim CG, Bell JNB, Power SA (2003)** Effects of soil cadmium on *Pinus sylvestris* L. seedling. *Plant Soil* **257**: 443-449
- **Kim DY, Bovet L, Maeshima M, Martinoia E, Lee Y (2007)** The ABC transporter AtPDR8 is a cadmium extrusion pump conferring heavy metal resistance. *Plant J* **50**: 207-218
- **Kim YY, Yang YY, Lee Y (2002)** Pb and Cd uptake in rice roots. *Physiol Plant* **116**: 368-372
- **Kirkham MB (2006)** Cadmium in plants on polluted soils: Effects of soil factors, hyperaccumulation, and amendments. *Geoderma* **137**: 19-32
- **Kolonel LN (1976)** Association of cadmium with renal cancer. *Cancer* **37**: 1782-1787
- **Kondo N, Imai K, Isobe M, Goto T, Murasugi A, Wada-Nakagawa C, Hayashi Y (1984)** Cadystin A and B, major unit peptides comprising cadmium binding peptides induced in a fission yeast - separation, revision of structures and synthesis. *Tetrahed Lett* **25**: 3869-3872

- **Korshunova YO, Eide D, Clark WG, Guerinot ML, Pakrasi HB (1999)** The IRT1 protein from *Arabidopsis thaliana* is a metal transporter with a broad substrate range. *Plant Mol Biol* **40**: 37-44
- **Krämer U, Talke IN, Hanikenne M (2007)** Transition metal transport. *FEBS Lett* **581**: 2263-2272
- **Kuboi T, Noguchi A, Yazaki J (1986)** Family-dependent cadmium accumulation characteristics in higher plants. *Plant Soil* **92**: 405-415
- **Lamoreaux R, Chaney W (1977)** Growth and water movement in silver maple seedlings affected by cadmium. *J Environ Qual* **6**: 201-204
- **Landry BS, Kesseli RV, Farrara B, Michelmore RW (1987)** A Genetic Map of Lettuce (*Lactuca sativa* L.) with Restriction Fragment Length Polymorphism, Isozyme, Disease Resistance and Morphological Markers. *Genetics* **116**: 331-337
- **Lanquar V, Lelievre F, Bolte S, Hames C, Alcon C, Neumann D, Vansuyt G, Curie C, Schroder A, Kramer U, Barbier-Brygoo H, Thomine S (2005)** Mobilization of vacuolar iron by AtNRAMP3 and AtNRAMP4 is essential for seed germination on low iron. *EMBO J* **24**: 4041-4051
- **Larbi A, Morales F, Abadía A, Gogorcena R, Lucena J, Abadía J (2002)** Effects of Cd and Pb in sugar beet plants grown in nutrient solution: induced Fe deficiency and growth inhibition. *Funct Plant Biol* **29**: 1453-1464
- **Leblanc JC, Verger P, Guérin T, Volatier JL (2004)** Etude de l'alimentation totale française: mycotoxines, minéraux et éléments traces. INRA
- **Li L, Kaplan J (1997)** Characterization of two homologous yeast genes that encode mitochondrial iron transporters. *J Biol Chem* **272**: 28485-28493
- **Li YM, Chaney RL, Schneiter AA, Miller JF, Elias EM, Hammond JJ (1997a)** Screening for low grain cadmium phenotypes in sunflower, durum wheat and flax. *Euphytica* **94**: 23-30
- **Liu XF, Supek F, Nelson N, Culotta VC (1997)** Negative control of heavy metal uptake by the *Saccharomyces cerevisiae* *BSD2* gene. *J Biol Chem* **272**: 11763-11769
- **Lombi E, Zhao FJ, Dunham SJ, McGrath SP (2000)** Cadmium accumulation in populations of *Thlaspi caerulescens* and *Thlaspi goesingense*. *New phytol* **145**: 11-20
- **Lombi E, Zhao FJ, McGrath SP, Young SD, Sacchi GA (2001)** Physiological evidence for a high-affinity cadmium transporter highly expressed in a *Thlaspi caerulescens* ecotype. *New Phytol* **149**: 53-60
- **Lopez-Chuken UJ, Young SD (2005)** Plant screening of halophyte species for cadmium phytoremediation. *Z Naturforsch C* **60**: 236-243
- **Lozano-Rodriguez E, Hernandez LE, Bonay P, CarpenaRuiz RO (1997)** Distribution of cadmium in shoot and root tissues of maize and pea plants: Physiological disturbances. *J Exp Bot* **48**: 123-128
- **Lugon-Moulin N, Zhang M, Gadani F, Rossi L, Koller D, Krauss M, Wagner GJ (2004)** Critical review of the science and options for reducing cadmium in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) and other plants, *Advances in Agronomy* **83**: 111-180

- **Mackenzie B, Hediger MA (2004)** SLC11 family of H<sup>+</sup>-coupled metal-ion transporters NRAMP1 and DMT1. *Pflugers Arch* **447**: 571-579
- **MacRobbie EA, Kurup S (2007)** Signalling mechanisms in the regulation of vacuolar ion release in guard cells. *New Phytol* **175**: 630-640
- **Maier EA, Matthews RD, McDowell JA, Walden RR, Ahner BA (2003)** Environmental cadmium levels increase phytochelatin and glutathione in lettuce grown in a chelator-buffered nutrient solution. *J Environ Qual* **32**: 1356-1364
- **Maisonneuve B, Bellec Y, Anderson P, Michelmore RW (1994)** Rapid mapping of two genes for resistance to downy mildew from *Lactuca serriola* to existing clusters of resistance genes. *Theor Appl Genet* **89**: 96-104
- **Marchiol L, Leita L, Martin M, Peterssotti A, Zerbi G (1996)** Physiological responses of two soybean cultivars to cadmium. *J Environ Qual* **25**: 562-566
- **Martínez Domínguez D, Córdoba García F, Canalejo Raya A, Torronteras Santiago R (2010)** Cadmium-induced oxidative stress and the response of the antioxidative defense system in *Spartina densiflora*. *Physiol Plant*
- **Mäser P, Thomine S, Schroeder JI, Ward JM, Hirschi K, Sze H, Talke IN, Amtmann A, Maathuis FJ, Sanders D, Harper JF, Tchieu J, Gribskov M, Persans MW, Salt DE, Kim SA, Guerinot ML (2001)** Phylogenetic relationships within cation transporter families of Arabidopsis. *Plant Physiol* **126**: 1646-1667
- **McBride MB (1980)** Chemisorption of Cd on calcite surfaces. *Soil Sci Soc Am J* **44**: 26-33
- **McBride MB (2004)** Molybdenum, sulfur, and other trace elements in farm soils and forages after sewage sludge application. *Commun Soil Sci Plant Anal* **35**: 517
- **McLaughlin MJ, Andrew SJ, Smart MK, Smolders E (1998a)** Effects of sulfate on cadmium uptake by Swiss chard: I. Effects of complexation and calcium competition in nutrient solutions. *Plant Soil* **202**: 211-216
- **McLaughlin MJ, Lambrechts RM, Smolders E, Smart MK (1998b)** Effects of sulfate on cadmium uptake by Swiss chard: II. Effects due to sulfate addition to soil. *Plant Soil* **202**: 217-222
- **McLaughlin MJ, Singh BR (1999)** Cadmium in soils and plants, eds. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands, pp 273
- **McLaughlin MJ, Williams CMJ, McKay A, Kirkham R, Gunton J, Jackson KJ, Thompson R, Dowling B, Partington D, Smart MK, Tiller KG (1994)** Effect of cultivar on uptake of cadmium by potato tubers. *Aust J Agric Res* **45**: 1483-1495
- **Meharg AA, Macnair MR (1992)** Genetic correlation between arsenate tolerance and the rate influx of arsenate and phosphate in *Holcus lamatus*. *Heredity* **69**: 336-341
- **Mendoza-Cózatl DG, Butko E, Springer F, Torpey JW, Komives EA, Kehr J, Schroeder JI (2008)** Identification of high levels of phytochelatin, glutathione and cadmium in the phloem sap of *Brassica napus*. A role for thiol-peptides in the long-distance transport of cadmium and the effect of cadmium on iron translocation. *Plant J* **54**: 249-259
- **Mensch M et Baize D (2004)** Contamination des sols et de nos aliments d'origine végétale par les éléments en trace, mesures pour réduire l'exposition. *Courrier de l'Environnement de l'INRA* **52**: 31-54

- **Metwally A, Finkemeier I, Georgi M, Dietz KJ (2003)** Salicylic acid alleviates the cadmium toxicity in barley seedlings. *Plant Physiol* **132**: 272-281
- **Michaelson MJ, Price HJ, Ellison JR, Johnston JS (1991)** Comparison of plant DNA contents determined by feulgen microspectrophotometry and laser flow cytometry. *Am J Bot* **78**: 183-188.
- **Mills RF, Francini A, Ferreira da Rocha PS, Baccarini PJ, Aylett M, Krijger GC, Williams LE (2005)** The plant P<sub>1B</sub>-type ATPase AtHMA4 transports Zn and Cd and plays a role in detoxification of transition metals supplied at elevated levels. *FEBS Lett* **579**: 783-791
- **Milone MT, Sgherri C, Clijsters H, Navari-Izzo F (2003)** Antioxidative responses of wheat treated with realistic concentration of cadmium. *Environ Exp Bot* **50**: 265-276
- **Mobin M, Khan NA (2007)** Photosynthetic activity, pigment composition and antioxidative response of two mustard (*Brassica juncea*) cultivars differing in photosynthetic capacity subjected to cadmium stress. *J Plant Physiol* **164**: 601-610
- **Morel M, Crouzet J, Gravot A, Auroy P, Leonhardt N, Vavasseur A, Richaud P (2009)** AtHMA3, a P<sub>1B</sub>-ATPase allowing Cd/Zn/Co/Pb vacuolar storage in Arabidopsis. *Plant Physiol* **149**: 894-904
- **Mortvedt JJ, Beaton JD (1995)** Heavy metal and radionuclide contaminants in phosphate fertilizers. In: Tiessen H, editor. Phosphorus in the global environment: transfer, cycles and management. New York: Wiley p 93-106.
- **Nussbaum S, Schmutz D, Brunold C (1988)** Regulation of Assimilatory Sulfate Reduction by Cadmium in *Zea mays* L. *Plant Physiol* **88**: 1407-1410
- **Oborn I, Jansson G, Johnson L (1995)** A field study on the influence of soil pH on trace element levels in spring wheat (*Triticum aestivum*), potatoes (*Solanum tuberosum*) and carrots (*Daucus carota*). *Water Air Soil Poll* **85**: 835-840
- **Oomen RJ, Wu J, Lelievre F, Blanchet S, Richaud P, Barbier-Brygoo H, Aarts MG, Thomine S (2009)** Functional characterization of NRAMP3 and NRAMP4 from the metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *New Phytol* **181**: 637-650
- **Ouzounidou G, Moustakas M, Eleftheriou EP (1997)** Physiological and ultrastructural effects of cadmium on wheat (*Triticum aestivum* L.) leaves. *Arch Environ Contam Toxicol* **32**: 154-160
- **Padmaja K, Prasad DDK, Prasad ARK (1990)** Inhibit of chlorophyll synthesis in *Phaseolus vulgaris* L. seedlings by cadmium acetate. *Photosynthetica* **24**: 399-405
- **Palmgren MG, Clemens S, Williams LE, Krämer U, Borg S, Schjørring JK, Sanders D (2008)** Zinc biofortification of cereals: problems and solutions. *Trends Plant Sci* **13**: 464-473
- **Pence NS, Larsen PB, Ebbs SD, Letham DL, Lasat MM, Garvin DF, Eide D, Kochian LV (2000)** The molecular physiology of heavy metal transport in the Zn/Cd hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 4956-4960
- **Perfus-Barbeoch L, Leonhardt N, Vavasseur A, Forestier C (2002)** Heavy metal toxicity: cadmium permeates through calcium channels and disturbs the plant water status. *Plant J* **32**: 539-548

- **Pietrini F, Iannelli MA, Pasqualini S, Massace A (2003)** Interaction of cadmium with glutathione and photosynthesis in developing leaves and chloroplasts of *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steudel. *Plant Physiol* **133**: 829-837
- Pitrat M, Foury C (2004) Histoires de légumes - Des origines à l'orée du XXI<sup>e</sup> siècle - Chapitre 12: Laitues (Maisonnette B). INRA, Paris
- **Pittman JK, Shigaki T, Marshall JL, Morris JL, Cheng NH, Hirschi KD (2004)** Functional and regulatory analysis of the *Arabidopsis thaliana* CAX2 cation transporter. *Plant Mol Biol* **56**: 959-971
- **Poitras E, Houde A (2002)** La PCR en temps réel: principes et applications. *Rev Biol Biotech* **2**: 2-11
- **Pokorny B, Al Sayegh-Petkovsek S, Ribaric-Lasnik C, Vrtacnik J, Doganoc DZ, Adamic M (2004)** Fungi ingestion as an important factor influencing heavy metal intake in roe deer: evidence from faeces. *Sci Total Environ* **324**: 223-234
- **Polle A, Schützendübel A (2003)** Heavy metal signalling in plants: linking cellular and organismic responses. In H Hirt, K Shinozaki, eds. *Plant Responses to Abiotic Stress*, Vol 4. Springer-Verlag, Berlin, pp 187-215
- **R Development Core Team (2008)** a language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. <http://www.r-project.org>.
- **Ramos I, Esteban E, Lucena JJ, Garate A (2002)** Cadmium uptake and subcellular distribution in plants of *Lactuca* sp Cd-Mn interaction. *Plant Sci* **162**: 761-767
- **Rausser WE (1999)** Structure and function of metal chelators produced by plants: the case for organic acids, amino acids, phytin, and metallothioneins. *Cell Biochem Biophys* **31**: 19-48
- **Rausser WE, Ackerly CA (1987)** Localisation of cadmium in granules within differentiating and mature root cells. *Can J Bot* **65**: 643-646
- **Razinger J, Dermastia M, Koce JD, Zrimec A (2008)** Oxidative stress in duckweed (*Lemna minor* L.) caused by short-term cadmium exposure. *Environ Pollut* **153**: 687-694
- **Rengel Z (1999)** Heavy metals as essential nutrients. In M.N.V. Prasad and J. Hagemeyer (ed.) *Heavy metal stress in plants: From molecules to ecosystems*. Springer, Berlin. pp. 231-252
- **Robbins MA, Witsenboer H, Michelmore RW, Laliberte JF, Fortin M (1994)** Genetic mapping of turnip mosaic virus resistance in *Lactuca sativa*. *Theor Appl Genet* **89**: 583-589
- **Ros R, Cooke DT, Martinez-Cortina C, Picazo I (1992)** Nickel and cadmium-related changes in growth, plasma membrane lipid composition, ATPase hydrolytic activity and oration pumping of rice (*Oryza sativa* L. CV. Bahia) shoots. *J Exp Bot* **43**: 1475-1481
- **Sadana US, Bijay S (1989)** Effect of cadmium-zinc interaction on yield and cadmium and zinc content of maize (*Zea mays* L.). *Curr Sci* **58**: 194-196
- **Salt DE, Kato N, Krämer U, Smith RD, Raskin I (2000)** The role of root exudates in nickel hyperaccumulation and tolerance in accumulator and nonaccumulator species of *Thlaspi*. In: Terry N, Banuelos G, eds. *Phytoremediation of contaminated soil and water*. CRC Press LLC, 189-200

- **Salt DE, Prince RC, Pickering IJ, Raskin I (1995a)** Mechanisms of Cadmium Mobility and Accumulation in Indian Mustard. *Plant Physiol* **109**: 1427-1433
- **Salt DE, Smith RD, Raskin I (1998)** Phytoremediation. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **49**: 643-668
- **Salt DE, Wagner GJ (1993)** Cadmium transport across tonoplast of vesicles from oat roots. Evidence for a  $Cd^{2+}/H^{+}$  antiport activity. *J Biol Chem* **268**: 12297-12302
- **Sandalio LM, Dalurzo HC, Gomez M, Romero-Puertas MC, del Rio LA (2001)** Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. *J Exp Bot* **52**: 2115-2126
- **Sanità di Toppi L, Gabbrielli R (1999)** Response to cadmium in higher plants. *Environ Exp Bot* **41**: 105-130
- **Sappin-Didier V, Brayette S, Jadé C, Baize D, Masson P, Mench M (2002)** Phytodisponibilité du cadmium pour le blé. Rôle des paramètres pédologiques et agronomiques. In: Baize D and Tercé Ms. Les éléments traces métalliques dans les sols. Approches fonctionnelles et spatiales, INRA Editions,
- **Sarwar N, Malhi SS, Zia MH, Naeem A, Bibi S, Farid G (2010)** Role of mineral nutrition in minimizing cadmium accumulation by plants. *J Sci Food Agric* **90**: 925-937
- **Sauvé S, Manna S, Turmel MC, Roy AG, Courchesne F (2003)** Solid-solution partitioning of Cd, Cu, Ni, Pb, and Zn in the organic horizons of a forest soil. *Environ Sci Technol* **37**: 5191-5196
- **Schenker M, Fan TWM, Crowley DE (2000)** Phytosiderophores influence on cadmium mobilization and uptake by wheat and barley plants. *J Environ Qual* **30**: 2091-2098
- **Seidal K, Jorgensen N, Elinder CG, Sjogren B, Vahter M (1993)** Fatal cadmium-induced pneumonitis. *Scand J Work Environ Health* **19**: 429-431
- **Sela M, Garty J, Tel-Or E, (1989)** The accumulation and the effect of heavy metals on the water fern *Azolla filiculoides*. *New Phytol* **112**: 7-12
- **Senden MHMN, Van Der Meer AJGM, Verburg TG, Wolterbeek HT (1995)** Citric acid in tomato plant roots and its effect on cadmium uptake and distribution. *Plant Soil* **171**: 333-339
- **Sharma RK, Agrawal M (2006)** Single and combined effects of cadmium and zinc on carrots: Uptake and bioaccumulation. *J Plant Nutr* **29**: 1791-1804
- **Sharma SS, Dietz KJ (2006)** The significance of amino acids and amino-derived molecules in plant responses and adaptation to heavy metal stress. *J Exp Bot* **57**: 711-726
- **Sharma SS, Kaul S, Metwally A, Goyal KC, Finkemeier I, Dietz KJ (2004)** Cadmium toxicity to barley (*Hordeum vulgare*) as affected by varying Fe nutritional status. *Plant Sci* **166**: 1287-1295
- **Sharma SS, Kumar V (2002)** Responses of wild type and abscisic acid mutants of *Arabidopsis thaliana* to cadmium. *J Plant Physiol* **159**: 1323-1327
- **Sigfridsson KG, Bernat G, Mamedov F, Styring S (2004)** Molecular interference of  $Cd^{2+}$  with Photosystem II. *Biochim Biophys Acta* **1659**: 19-31
- **Singh R, Tripathi RD, Dwivedi S, Singh M, Trivedi PK, Chakrabarty D (2010)** Cadmium-induced biochemical responses of *Vallisneria spiralis*. *Protoplasma*

- **Siripornadulsil S, Traina S, Verma DP, Sayre RT (2002)** Molecular mechanisms of proline-mediated tolerance to toxic heavy metals in transgenic microalgae. *Plant Cell* **14**: 2837-2847
- **Smolders E, McLaughlin MJ (1996a)** Chloride increases cadmium uptake in Swiss chard in a resinbuffered nutrient solution. *Soil Sci Soc Am J* **60**: 1443-1447
- **Smolders E, McLaughlin MJ (1996b)** Effect of Cl on Cd uptake by Swiss chard in nutrient solutions. *Plant Soil* **179**: 57-64
- **Sposito G (1989)** The chemistry of soils. Oxford Univ Press, 277 p
- **Stobart AK, Griffiths WT, Ameen-Bukhari I, Sherwood RP (1985)** The effect of Cd<sup>2+</sup> on the biosynthesis of chlorophyll in leaves of barley. *Physiol Plant* **63**: 293-298
- **Svartengren M, Elinder CG, Friberg L, Lind B (1986)** Distribution and concentration of cadmium in human kidney. *Environ Res* **39**: 1-7
- **Szöllösi R, Varga IS, Erdei L, Mihalik E (2009)** Cadmium-induced oxidative stress and antioxidative mechanisms in germinating Indian mustard (*Brassica juncea* L.) seeds. *Ecotoxicol Environ Saf* **72**: 1337-1342
- **Tang YT, Qiu RL, Zeng XW, Ying RR, Yu FM, Zhou XY (2009)** Lead, zinc, cadmium hyperaccumulation and growth stimulation in *Arabis paniculata* Franch. *Environ Exp Bot* **66**: 126-134
- **Tezuka K, Miyadate H, Katou K, Kodama I, Matsumoto S, Kawamoto T, Masaki S, Satoh H, Yamaguchi M, Sakurai K, Takahashi H, Satoh-Nagasawa N, Watanabe A, Fujimura T, Akagi H (2010)** A single recessive gene controls cadmium translocation in the cadmium hyperaccumulating rice cultivar Cho-Ko-Koku. *Theor Appl Genet* **120**: 1175-1182
- **Thomine S, Lelievre F, Debarbieux E, Schroeder JI, Barbier-Brygoo H (2003)** AtNRAMP3, a multispecific vacuolar metal transporter involved in plant responses to iron deficiency. *Plant J* **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. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 4991-4996
- **Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994)** CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**: 4673-4680
- **Thys C, Vanthomme P, Schrevens E, De Proft M (1991)** Interactions of Cd with Zn, Cu, Mn and Fe for lettuce (*Lactuca sativa* L.) in hydroponic culture. *Plant Cell Environ* **14**: 713-717
- **Truco MJ, Antonise R, Lavelle D, Ochoa O, Kozik A, Witsenboer H, Fort SB, Jeuken MJ, Kesseli RV, Lindhout P, Michelmore RW, Peleman J (2007)** A high-density, integrated genetic linkage map of lettuce (*Lactuca* spp.). *Theor Appl Genet* **115**: 735-746
- **Tsadiras CD, Karaivazoglou NA, Tsotsolis NC, Stamatidis S, Samaras V (2005)** Cadmium uptake by tobacco as affected by liming, N form, and year of cultivation. *Environ Pollut* **134**: 239-246
- **Tudoreanu L, Phillips CJV (2004)** Empirical models of cadmium accumulation in maize,

- rye grass and soya bean plants. *J Sci Food Agr* **84**: 845-852
- **Turner MA (1973)** Effect of cadmium treatment on cadmium and zinc uptake by selected vegetable species. *J Environ Qual* **2**:118-119
  - **Tyler LD, McBride MB (1982)** Influence of Ca, pH and humic acid on cadmium uptake. *Plant Soil* **64**: 259-262
  - **Ueno D, Iwashita T, Zhao FJ, Ma JF (2008)** Characterization of Cd Translocation and Identification of the Cd Form in Xylem Sap of the Cd-Hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *Plant Cell Physiol* **49**: 540-548
  - **Van Assche F, Clijsters H (1985)** Inhibition of photosynthesis by heavy metals. *Photosynth Res* **7**: 31-40
  - **Van Kauwenbergh SJ (1997)** Cadmium and other minor elements in world resources of phosphate rock. *Proceedings of the Fertilizer Society No. 400*, London.
  - **Vassilev A, Yordanov I (1997)** Reductive analysis of factors limiting growth of cadmium-treated plants: a review. *Bulg J Plant Physiol* **23**: 114-133
  - **Vassilev A, Yordanov I, Tsonev T (1997)** Effects of Cd<sup>2+</sup> on the physiological state and photosynthetic activity of young barley plants. *Photosynthetica* **34**: 293-302
  - **Vatamaniuk OK, Bucher EA, Ward JT, Rea PA (2001)** A new pathway for heavy metal detoxification in animals. Phytochelatin synthase is required for cadmium tolerance in *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem* **276**: 20817-20820
  - **Vatamaniuk OK, Mari S, Lu YP, Rea PA (2000)** Mechanism of heavy metal ion activation of phytochelatin (PC) synthase: blocked thiols are sufficient for PC synthase-catalyzed transpeptidation of glutathione and related thiol peptides. *J Biol Chem* **275**: 31451-31459
  - **Vazquez MD, Poschenrieder C, Barcelo J (1992)** Ultrastructural effects and localization of low cadmium concentrations in bean roots. *New Phytol* **120**: 215-226
  - **Verret F, Gravot A, Auroy P, Leonhardt N, David P, Nussaume L, Vavasseur A, Richaud P (2004)** Overexpression of AtHMA4 enhances root-to-shoot translocation of zinc and cadmium and plant metal tolerance. *FEBS Lett* **576**: 306-312
  - **Vert G, Grotz N, Dedaldechamp F, Gaymard F, Guerinot ML, Briat JF, Curie C (2002)** IRT1, an Arabidopsis transporter essential for iron uptake from the soil and for plant growth. *Plant Cell* **14**: 1223-1233
  - **Vinkel B (2001)** Analyse de la composition en éléments traces dans le grain de variétés de blé - Programme QUASAR. Institut de Santé Publique, d'Epidémiologie et de Développement
  - **Wagner GJ (1993)** Accumulation of cadmium in crop plants and its consequences to human health. *Adv Agron* **51**: 173-212
  - **Waisberg M, Black WD, Waisberg CM, Hale B (2004)** The effect of pH, time and dietary source of cadmium on the bioaccessibility and adsorption of cadmium to/from lettuce (*Lactuca sativa* L. cv. *Ostinata*). *Food Chem Toxicol* **42**: 835-842
  - **Wallace A, Berry WL (1989)** Dose-response curves for zinc, cadmium and nickel in combinations of one, two, or three. *Soil Sci* **147**: 422-425

- **WBG (1998)** Cadmium. Pollution prevention and abatement handbook. World Bank Group, 212-214
- **Weggler K, McLaughlin MJ, Graham RD (2004)** Effect of chloride in soil solution on the plant availability of biosolid-borne cadmium. *J Environ Qual* **33**: 496-504
- **Weggler-Beaton K, McLaughlin MJ, Graham RD (2000)** Salinity increases cadmium uptake by wheat and Swiss chard from soil amended with biosolids. *Aust J Soil Res* **38**: 37-45
- **Weigel HJ, Jager HJ (1980)** Subcellular distribution and chemical form of cadmium in bean plants. *Plant Physiol* **67**: 480-482
- **WHO (2000)** Air Quality Guidelines for Europe, chapter 6.2, WHO Regional Office for Europe, Copenhagen, Denmark, pp 11
- **Williams LE, Mills RF (2005)** P<sub>(1B)</sub>-ATPases - an ancient family of transition metal pumps with diverse functions in plants. *Trends Plant Sci* **10**: 491-502
- **Wojcik M, Vangronsveld J, D'Haen J, Tukiendorf A (2005)** Cadmium tolerance in *Thlaspi caerulescens*. II. Localization of cadmium in *Thlaspi caerulescens*. *Environ Exp Bot* **53**: 163-171
- **Wolterbeek HT, van der Meer A, de Bruin M (1988)** The uptake and distribution of cadmium in tomato plants as affected by ethylenediaminetetraacetic acid and 2,4-dinitrophenol. *Environ Pollut* **55**: 301-315
- **Wong CK, Cobbett CS (2009)** HMA P-type ATPases are the major mechanism for root-to-shoot Cd translocation in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol* **181**: 71-78
- **Wong CK, Jarvis RS, Sherson SM, Cobbett CS (2009)** Functional analysis of the heavy metal binding domains of the Zn/Cd-transporting ATPase, HMA2, in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol* **181**: 79-88
- **Xu J, Yin H, Liu X, Li X (2010)** Salt affects plant Cd-stress responses by modulating growth and Cd accumulation. *Planta* **231**: 449-459
- **Yanai J, Zhao FJ, McGrath SP, Kosaki T (2006)** Effect of soil characteristics on Cd uptake by the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Environ Pollut* **139**: 167-175
- **Zhu YL, Pilon-Smits EAH, Jouanin L, Terry N (1999a)** Overexpression of Glutathione Synthetase in Indian Mustard Enhances Cadmium Accumulation and Tolerance. *Plant Physiol* **119**: 73-79
- **Zhu YL, Pilon-Smits EAH, Tarun AS, Weber SU, Jouanin L and Terry N (1999b)** Cadmium Tolerance and Accumulation in Indian Mustard Is Enhanced by Overexpressing  $\gamma$ -Glutamylcysteine Synthetase. *Plant Physiol* **121**: 1167-1177
- **Zornoza P, Sanchez-Pardo B, Carpena RO (2010)** Interaction and accumulation of manganese and cadmium in the manganese accumulator *Lupinus albus*. *J Plant Physiol*
- **Zornoza P, Vázquez S, Esteban E, Fernández-Pascual M, Carpena R (2002)** Cadmium-stress in nodulated white lupin: strategies to avoid toxicity. *Plant Physiol Biochem* **40**:1003-1009
- **Zorrig W, Rouached A, Shahzad Z, Abdelly C, Davidian JC, Berthomieu P (2010)** Identification of three relationships linking cadmium accumulation to cadmium tolerance and zinc and citrate accumulation in lettuce. *J Plant Physiol* **167**: 1239-1247

## Annexes



**Tableau I: Amorces utilisées pour le clonage des gènes de laitue**

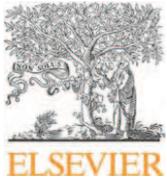
<b>Gene</b>	<b>F/R</b>	<b>Amorces</b>
<i>LsActin</i>	F	5'- TTTGCTGGAGATGATGCTCC -3'
	R	5'- GTGGTACGACCACTGGCATA -3'
<i>LsTPI</i>	F	5'- GTTAAGAAGGGTGGTGCATT -3'
	R	5'- CTTATATCACCCATCTCATA -3'
<i>LsγGCS</i>	F	5'- TTCCCGTGGTACAACCTCCA -3'
	R	5'- GGTGATTGAACAGGTGAGACTG -3'
<i>LsGS</i>	F	5'- TGGCTGCTCGATAGCATTG -3'
	R	5'- GTGCAACCCTCACTGAAAGA -3'
<i>LsHMAa et b</i>	F	5'- GTAGACTCCATCGTTTATGCAGGG -3'
	R	5'- CTGTGCATAGTCCACAAGTGTCGC -3'
<i>LsHMAa</i>	F	5'- TGCTCTTGCTGACGATTGTGTG -3'
	R	5'- CCCTTATCAAATTAAATGAGTC -3'
<i>LsHMAb</i>	F	5'- ACAGCTTTAGCTGAAGCTTGTGTA -3'
	R	5'- CAGATGCTTCAAATGAATAGGC -3'
<i>LsIRTa</i>	F	5'- GCTGAAGGTGGTGGTGCAGTCGGTC -3'
	R	5'- ATACCAAATGGAGTCGTTATCG -3'
<i>LsIRTb</i>	F	5'- GCTGATAAGGTGGTAGTTGCC -3'
	R	5'- GCAATCCCAAAGGAGTCGTC -3'
<i>LsPDRa</i>	F	5'- TTATCTATGCAGGACCCTTAGGC -3'
	R	5'- CAACCGGCTGCACTGTTTGTG -3'
<i>LsPDRb</i>	F	5'- GTTGTTTGCACCATTCATCAGCC -3'
	R	5'- CCAGAATACAGTTCCAACCATG -3'
<i>LsPDRc</i>	F	5'- GTTGTTTGCACCATTCATCAGCC -3'
	R	5'- CCAGAATACGGTTCCAACCAACAGC -3'

Tableau II: Amorces utilisées pour l'expérience PCR quantitative

Gene	F/R	Amorces
<i>LsActin</i>	F	5'- TGCTCCTTACAGAGGCACCC -3'
	R	5'- GACACACCGTCTCCGGAATC -3'
<i>LsTPI</i>	F	5'- GTTGCATCTCCAGCTCAGGC -3'
	R	5'- CCTTGCAATTGGAACCACTCA -3'
<i>LsyGCS</i>	F	5'- GGAGGACCATGGAGGAGGTT -3'
	R	5'- CAATCAGCCGTCATGTCCAA -3'
<i>LsGS</i>	F	5'- AGAGCCGGATATGCACCTAACG -3'
	R	5'- GGTTTTGCAAGCTCCTGCTGA -3'
<i>LsHMAa</i>	F	5'- GGGAAAGCTTGTTGAAGAGGC -3'
	R	5'- ACCAAAACAACCAATGCCAAA -3'
<i>LsHMAb</i>	F	5'- GGCAAAACTCGTTGAAGAGGC -3'
	R	5'- GAACTCGCATAGCAGCTGGG -3'
<i>LsIRTa</i>	F	5'- ACCATCATGGCCCAAAGAGC -3'
	R	5'- TTTGAGGCCCAACTCCAAG -3'
<i>LsIRTb</i>	F	5'- GGCTCAATCGGAACACAACCTG -3'
	R	5'- CAGCTGGTGGAAACAAAGGG -3'
<i>LsPDRa</i>	F	5'- GGATGTTGGAAGTCAGCTCTGC -3'
	R	5'- CAGTAGCTCCACCACATCTTCCAT -3'
<i>LsPDRb</i>	F	5'- GGGCATTGACTTTGCTGACC -3'
	R	5'- AAGACGTGAATTGTCCCCACAT -3'
<i>LsPDRc</i>	F	5'- AGAGTTGCGACTTGGCATTGAT -3'
	R	5'- GCACTTGGTGGAGGCACACT -3'

## Publications





Contents lists available at ScienceDirect

## Journal of Plant Physiology

journal homepage: [www.elsevier.de/jplph](http://www.elsevier.de/jplph)

## Identification of three relationships linking cadmium accumulation to cadmium tolerance and zinc and citrate accumulation in lettuce

Walid Zorrig<sup>a,b</sup>, Aïda Rouached<sup>a</sup>, Zaigham Shahzad<sup>a</sup>, Chedly Abdelly<sup>b</sup>,  
Jean-Claude Davidian<sup>a</sup>, Pierre Berthomieu<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Biochimie & Physiologie Moléculaire des Plantes, Unité Mixte de Recherche CNRS-INRA-Université Montpellier II-Montpellier SupAgro,

Place Viala, 34060 Montpellier Cédex 2, France

<sup>b</sup> Laboratoire des Plantes Extrêmophiles, Centre de Biotechnologie, BP 901, Hammam-Lif 2050, Tunisia

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 8 January 2010

Received in revised form 6 April 2010

Accepted 15 April 2010

## Keywords:

Lettuce

Cadmium accumulation

Zinc

Mineral nutrition

Growth

Citrate

## ABSTRACT

Lettuce (*Lactuca sativa*) is a plant species that shows high accumulation of cadmium, a toxic heavy metal. Lettuce is therefore a good model both for identifying determinants controlling cadmium accumulation in plant tissues and for developing breeding strategies aimed at limiting cadmium accumulation in edible tissues. In this work, 14-day-old plants from three lettuce varieties were grown for 8 days on media supplemented with cadmium concentrations ranging from 0 to 50  $\mu\text{M}$ . Growth, as well as  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{Cl}^-$ , phosphate, malate and citrate root and shoot contents were analyzed. The three lettuce varieties Paris Island Cos, Red Salad Bowl and Kordaat displayed differential abilities to accumulate cadmium in roots and shoots, Paris Island Cos displaying the lowest cadmium content and Kordaat the highest. From the global analysis of the three varieties, three main trends were identified. First, a common negative correlation linked cadmium tissue content and relative dry weight reduction in response to cadmium treatments in the three varieties. Second, increasing cadmium concentration in the culture medium resulted in a parallel increase in zinc tissue content in all lettuce varieties. A common strong positive correlation between cadmium and zinc contents was observed for all varieties. This suggested that systems enabling zinc and cadmium transport were induced by cadmium. Finally, the cadmium treatments had a contrasting effect on anion contents in tissues. Interestingly, citrate content in shoots was correlated with cadmium translocation from roots to shoots, suggesting that citrate might play a role in cadmium transport in the xylem vessels. Altogether, these results shed light on three main strategies developed by lettuce to cope with cadmium, which could help to develop breeding strategies aimed at limiting cadmium accumulation in lettuce.

© 2010 Elsevier GmbH. All rights reserved.

### Introduction

The impact of industrial and agricultural activities on the environment has not stopped growing since the industrial revolution. While many organic molecules can be degraded, heavy metals remain in the environment. Hence, heavy metal concentrations are continuously increasing, particularly in the upper horizons of soils and in water resources. Anthropogenic activities contribute markedly to this increase, for instance as a consequence of urban traffic or of the use of electrical batteries and heating systems. Cadmium is one of the most broadly dispersed heavy metals. Not only it is not essential for the development of living organisms, but it is actually a major problem for human health, inducing a large

number of noxious effects, with kidney lesions and cancer figuring among the most serious ones (Godt et al., 2006). Plants, which are at the base of the food chain, can take up cadmium from the soil solution. This absorption occurs through non-specific pathways. Cadmium, which is an analogue of zinc (Palmgren et al., 2008), was shown to be transported into or between plant cells through zinc membrane transport systems (Verret et al., 2004; Clemens, 2006). However, iron or calcium transporters were also proposed to be involved in cadmium transport (Connolly et al., 2002; Hirschi et al., 2000; Thomine et al., 2000; Clemens, 2006). Once in plant tissues, cadmium displays a large panel of toxic effects: restriction of photosynthesis, decrease in chlorophyll contents, induction of oxidative stress, or alteration of plant water status (Mobin and Khan, 2007; López-Millán et al., 2009; Razinger et al., 2008; Szóllósi et al., 2009; Perfus-Barbeoch et al., 2002). Cadmium has also been shown to have a detrimental effect on the micro- and macro-element balance in plant tissues (Ghnaya et al., 2007; López-Millán et al., 2009).

\* Corresponding author. Tel.: +33 499 613 158; fax: +33 467 525 737.

E-mail address: [berthomieu@supagro.inra.fr](mailto:berthomieu@supagro.inra.fr) (P. Berthomieu).

Among cultivated plant species, lettuce is known for its comparatively high accumulation of cadmium in leaves (Kim et al., 1988). It has thus been proposed as an indicator crop for testing the potential human dietary risk associated with ingesting food crops grown on cadmium polluted soils (Brown et al., 1996). In this context, lettuce is a good model both to study the mechanisms responsible for cadmium accumulation in tissues and to develop breeding strategies aimed at decreasing cadmium accumulation in crop plants. Research has mainly focused on the effects of cadmium on growth of lettuce plants, as well as on the mechanisms of cadmium absorption by roots and cadmium distribution within different organs (Costa and Morel, 1994; Monteiro et al., 2009; Ramos et al., 2002; Thys et al., 1991). In these studies, the partitioning of cadmium within the plant was analyzed. Also, modeling of cadmium uptake in lettuce was attempted (Chen et al., 2008). The synthesis of the different studies is that, as far as growth is concerned, cadmium at very low concentrations (~0.1 ppm) may favor growth depending on the composition of the culture medium, while cadmium at concentrations higher than 1 ppm generally induced growth reduction. The influence of the composition of the culture medium (macro- and micro-mineral composition, pH, etc.) has also been analyzed. Cadmium absorption was shown to be reduced by the presence of iron, and induced by calcium or by the replacement of  $\text{NO}_3^-$  with  $\text{NH}_4^+$  (Florijn et al., 1992; He et al., 2005; Thys et al., 1991). The presence of cadmium also displayed an effect on nutrient uptake, with differing results. For instance, some experiments showed that cadmium treatment had an impact on manganese or zinc contents of tissues (Ramos et al., 2002; Thys et al., 1991), while others did not (Monteiro et al., 2009). This might be due to the fact that different lettuce varieties, different growing conditions and/or different cadmium treatments were used. From all these analyses, it appears that robust generic trends linking different characters have still not been established in lettuce.

The present study aimed at establishing such trends through the analysis of the impact of cadmium both on growth and on the accumulation of other cations and anions in three lettuce varieties exhibiting contrasting features for the characters of cadmium accumulation and cadmium translocation from roots to shoots.

## Materials and methods

### Plant material and growth conditions

Three lettuce varieties were analyzed: Paris Island Cos, Kordaat and Red Salad Bowl. Seeds were kindly provided by Dr. B. Maison-neuve (INRA Avignon, France). Seeds were germinated on sterile Whatmann paper humidified first with distilled water for 5 days and then with nutrient solution for 5 additional days. The nutrient solution contained 2.5 mM  $\text{KNO}_3$ , 0.5 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 2.5 mM  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , 0.5 mM  $\text{MgSO}_4$ , 0.1 mM  $\text{Fe}_{\text{III}}\text{NaEDTA}$ , 0.05 mM  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 0.05 mM  $\text{MnSO}_4$ , 15  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4$ , 3  $\mu\text{M}$   $\text{Na}_2\text{MoO}_4$ , 2.5  $\mu\text{M}$   $\text{KI}$ , 0.05  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  and 0.044  $\mu\text{M}$   $\text{CoCl}_2$ . Ten-day-old plantlets were transferred to hydroponic conditions, with 24 plantlets grown in 8 L of aerated nutrient solution. Four days later, different cadmium ( $\text{CdCl}_2$ ) treatments were applied for 8 additional days. Growth conditions were adjusted to 20 °C, 70% relative humidity and a 16:8 h light–dark cycle with a light intensity of 150  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Nutrient solutions were changed every 4 days over the course of the entire experiment. At the end of the experiment, roots were repeatedly dipped for 12 s in three ice-cold 0.5 mM  $\text{CaCl}_2$  solutions to remove the cadmium adsorbed at the root surface. Then roots were gently dried between two layers of filter paper. Analyses were performed on individual plants, with roots and shoots analyzed separately.

### Cation assays

After fresh weight measurement, plant samples were dried at 80 °C for 48 h; dry weight was then measured. Dried plant samples were incubated in 1N  $\text{H}_2\text{SO}_4$  at 80 °C for 30 min to extract cations. Concentrations of Cd, Zn, Ca and K in the extracts were determined by atomic absorption spectrophotometry (SpectrAA 220, Varian, Australia).

### Anion assays

After fresh weight measurement, plant samples were incubated in ultrapure water at 70 °C for 30 min. Samples were then centrifuged 3 times at 16,000  $\times g$  at 4 °C for 5 min. The concentration of anions in the supernatant was determined by High Performance Ionic Chromatography (ICS-2500 apparatus; Dionex) using the IonPac AS11 anion exchange column and a NaOH gradient. NaOH concentration was raised linearly from 3.5 to 5 mM over 3 min, then from 5 to 35.4 mM over 8 min. Identification and quantification of each anion were performed by comparison of the retention times and peak areas – integrated using Chromeleon software (Dionex) – with the standards.

### Statistical analyses

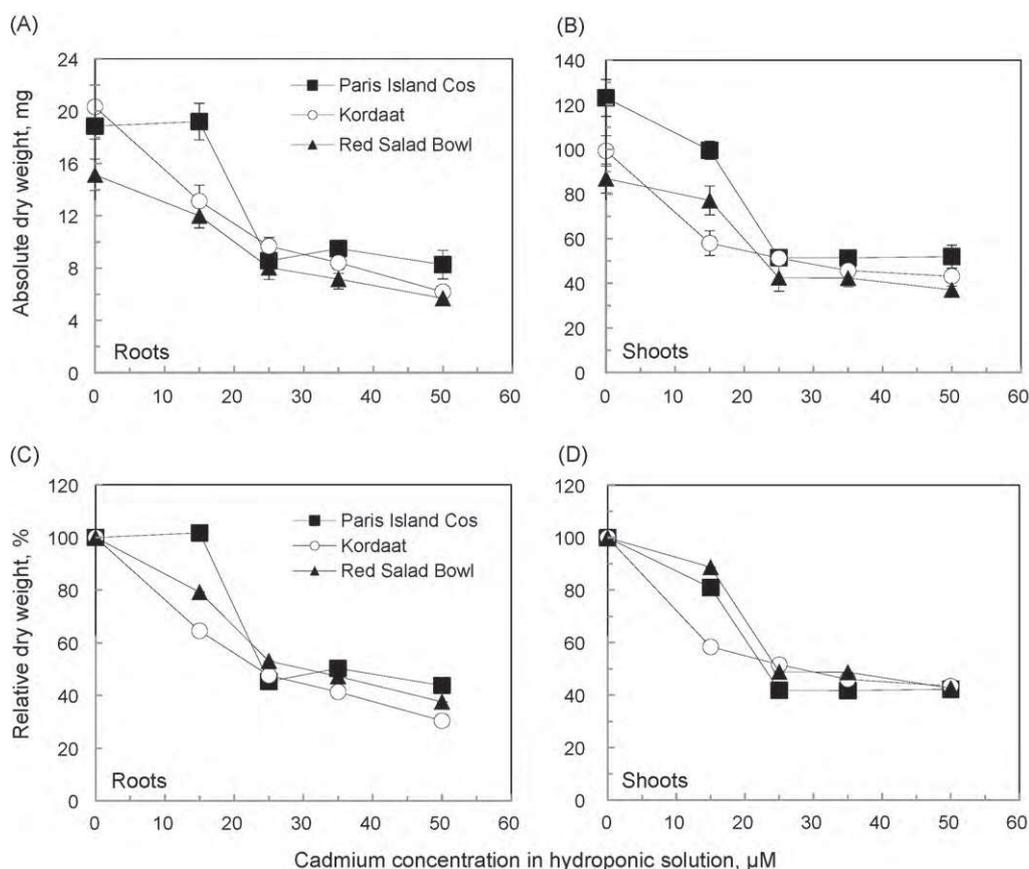
One-way ANOVA was used for parametric or nonparametric comparison of means. Significant differences were further analyzed using Tukey's parametric or nonparametric tests to identify differences between treatments and/or varieties. All these tests used an alpha of 0.05 and were performed with the R software (R Development Core Team, 2008).

## Results

### Cadmium effects on lettuce growth and relative water content

In order to analyze the effects of cadmium on lettuce growth, 14-day-old plantlets of the Paris Island Cos, Kordaat and Red Salad Bowl lettuce varieties were exposed over 8 days to 0, 15, 25, 35 and 50  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  (that is 0, 1.7, 2.8, 3.9 and 5.6  $\text{mg L}^{-1}$  Cd). The three varieties displayed similar overall responses with respect to cadmium toxicity symptoms. All the plants submitted to 35 and 50  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  exhibited symptoms of chlorosis. At 15 or 25  $\mu\text{M}$  cadmium, chlorosis was far less pronounced; it was visible only on some of the Kordaat and Red Salad Bowl plants. Exposure to increasing cadmium concentrations resulted in both shoot and root biomass reduction (Fig. 1). The three varieties displayed different vigor (see biomasses observed when no cadmium was added in the medium in Fig. 1A and B). However, this had no major impact on the comparative cadmium tolerance among the three varieties. With respect to growth, the only marked difference among the three varieties was observed at 15  $\mu\text{M}$  cadmium: Paris Island Cos was the most cadmium-tolerant variety, while Kordaat was the least tolerant (Fig. 1C and D).

Cadmium displayed an effect on the relative water content, but only in shoots (Fig. 2). Interestingly, this effect was different depending on the lettuce variety considered. For Paris Island Cos, the presence of cadmium in the medium induced no significant change in the relative water content. In contrast, in shoots of Kordaat plants, the relative water content dropped from ~95.5% to ~91% when cadmium concentration increased from 0 to 50  $\mu\text{M}$  in the medium. Red Salad Bowl displayed an intermediate phenotype. Decreases in relative water content were, however, not associated with visible alterations of the tissue hydration and no wilting was observed.



**Fig. 1.** Cadmium treatment significantly alters growth. Absolute root (A) and shoot (B) dry weight and relative root (C) and shoot (D) dry weight measured in response to increasing cadmium concentrations in the culture medium are reported for the Kordaat, Paris Island Cos and Red Salad Bowl lettuce varieties. For a given lettuce variety, relative dry weights are expressed in percentage. Measurements were performed on samples coming from individual plants. Mean  $\pm$  S.E.;  $n = 7$ .

#### Cadmium accumulation and translocation

Cadmium contents were measured in roots and shoots of the three lettuce varieties. Unsurprisingly, root and shoot cadmium contents increased almost linearly in response to increasing concentrations of cadmium in the growth medium (Fig. 3A and B). However, the three varieties displayed a differential ability to accumulate cadmium in their roots as well as in their shoots. Paris Island Cos displayed the lowest cadmium contents in roots and in shoots under all conditions. In contrast, Kordaat displayed the highest cadmium contents in nearly all conditions. Red Salad Bowl displayed a different pattern; it displayed mainly low cadmium contents in roots, close to those of Paris Island Cos, while showing generally high cadmium contents in shoots, close to those of Kordaat (Fig. 3A and B). We then examined whether these intervarietal differences in root and shoot cadmium contents could be related to different strategies with respect to cadmium translocation from roots to shoot. Cadmium translocation from roots to shoots was very stable in Kordaat and Paris Island Cos across all cadmium treatments: 60% of the cadmium present in Kordaat plants was in the shoot, and ~70% for Paris Island Cos (Fig. 3C). In contrast, for Red Salad Bowl, cadmium translocation from roots to shoots markedly decreased from 75% to 60% in response to increases in external cadmium concentration. This may indeed reveal different strategies developed by the three lettuce varieties to cope with cadmium.

#### Relationship between cadmium accumulation and growth

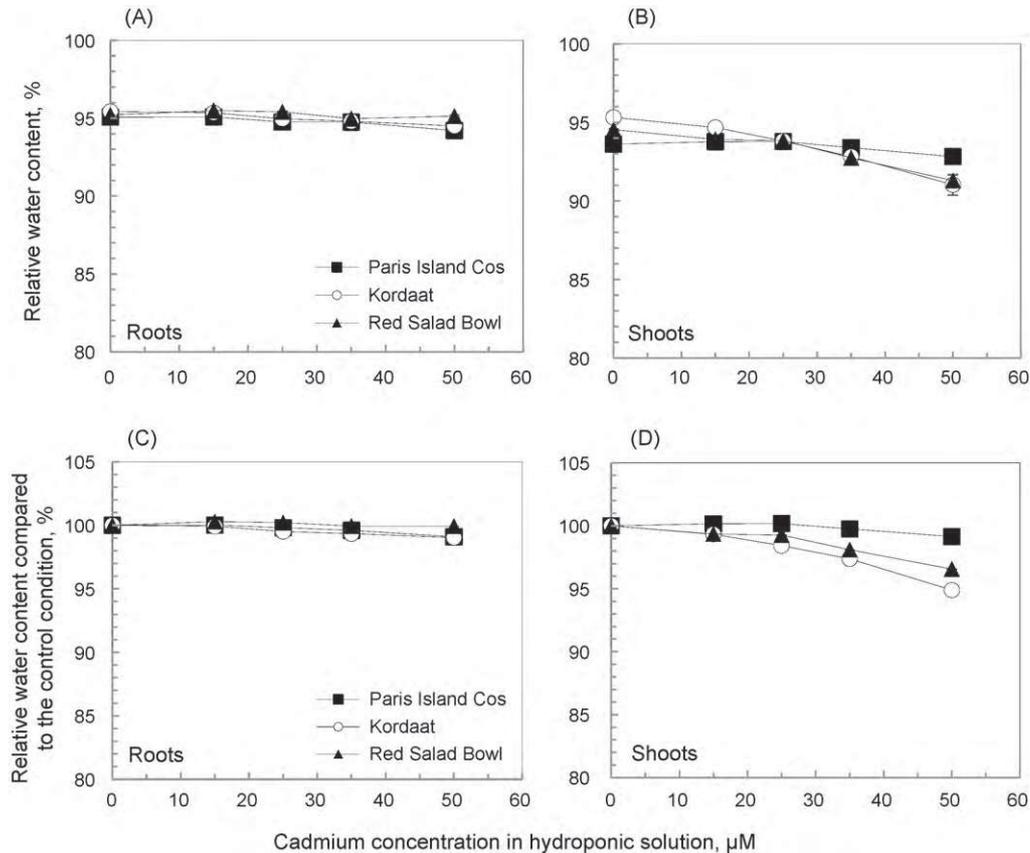
Whether there is a relationship between the ability of a variety to accumulate cadmium and the effect of cadmium on growth has been discussed (Clemens, 2006). Remarkably, as far as the Paris

Island Cos, Kordaat and Red Salad Bowl varieties are concerned, a strong common negative correlation was observed between cadmium content and cadmium tolerance – measured as the relative growth of cadmium treated plants compared to controls – both for roots and for shoots (Fig. 4). In roots, the correlation explained 89% of the observed variation between cadmium content and relative growth ( $R^2 = 0.89$ ), while in shoots, the correlation explained 64% of the observed variation ( $R^2 = 0.64$ ). In this context, the intervarietal differences in cadmium tolerance, concerning plants grown in 15  $\mu\text{M}$  cadmium, are most likely due to the differential ability of the three lettuce varieties to absorb cadmium.

#### Effect of cadmium on zinc, calcium and potassium accumulation

We next wanted to examine whether external cadmium could impair mineral nutrition. Attention was focused on the analysis of potassium and calcium, which are the most abundant essential cations in plant tissues, and also on zinc because it is an essential heavy metal structurally closely related to cadmium. Calcium content was analyzed only in shoots.

Potassium content (expressed relative to dry weight) slightly decreased in both roots and shoots of all varieties in response to increases in the external cadmium concentration (Fig. 5A and B). However, when expressed relative to the fresh weight,  $\text{K}^+$  concentration was stable or increased in response to increases in the external cadmium concentration (Fig. 5C). The increase in the  $\text{K}^+$  concentration was observed only in shoots of Kordaat and Red Salad Bowl plants, which showed decreases in relative water content in response to cadmium (Fig. 2B and D). The apparent contradiction between the cadmium-induced changes in  $\text{K}^+$  concentration and



**Fig. 2.** Cadmium treatment differentially alters the relative water content among the lettuce varieties. (A and B) Absolute values of the relative water content ((FW – DW)/FW) in roots (A) and in shoots (B). Measurements were performed on samples coming from individual plants. Mean  $\pm$  S.E.;  $n = 7$ . (C and D) Relative water content, expressed in percentage of the relative water content obtained for plants grown in the absence of cadmium.

$K^+$  content results from the fact that potassium is a soluble cation mainly accumulated in cytoplasm and vacuole. The increase in the  $K^+$  concentration is likely a consequence of the decrease in the relative water content, and the very limited decrease in the  $K^+$  content is likely a sign that potassium nutrition is not markedly affected by the presence of cadmium in the culture medium.

In contrast to the  $K^+$  content, the  $Ca^{2+}$  content increased in shoots of all varieties in response to increases in the external cadmium concentration (Fig. 5C). Calcium is located mainly in cell walls, where cadmium has been proposed to be stored in lettuce (Ramos et al., 2002). The increase in  $Ca^{2+}$  content in response to the cadmium treatment may therefore be a sign of a protective strategy taking place in lettuce to counteract the toxic effects of cadmium.

Analysis of zinc contents produced surprising results. Indeed, zinc and cadmium are known to be in competition for numerous transporters (Verret et al., 2004; Clemens, 2006). Consequently, we expected that increasing the cadmium to zinc concentration ratio from 0:15 to 50:15 in the culture medium would lead to a decrease in zinc tissue content. However, we observed the reverse (Fig. 6). For all three lettuce varieties, increasing cadmium concentration in the medium induced increases in zinc content in both roots and shoots. Increase in zinc content was very high, particularly in roots; compared to the control condition, addition of 50 μM cadmium to the culture medium resulted in a 2.5–4 times increase in zinc content, depending on the variety considered (Fig. 6B). Similar results were obtained in an independently repeated experiment.

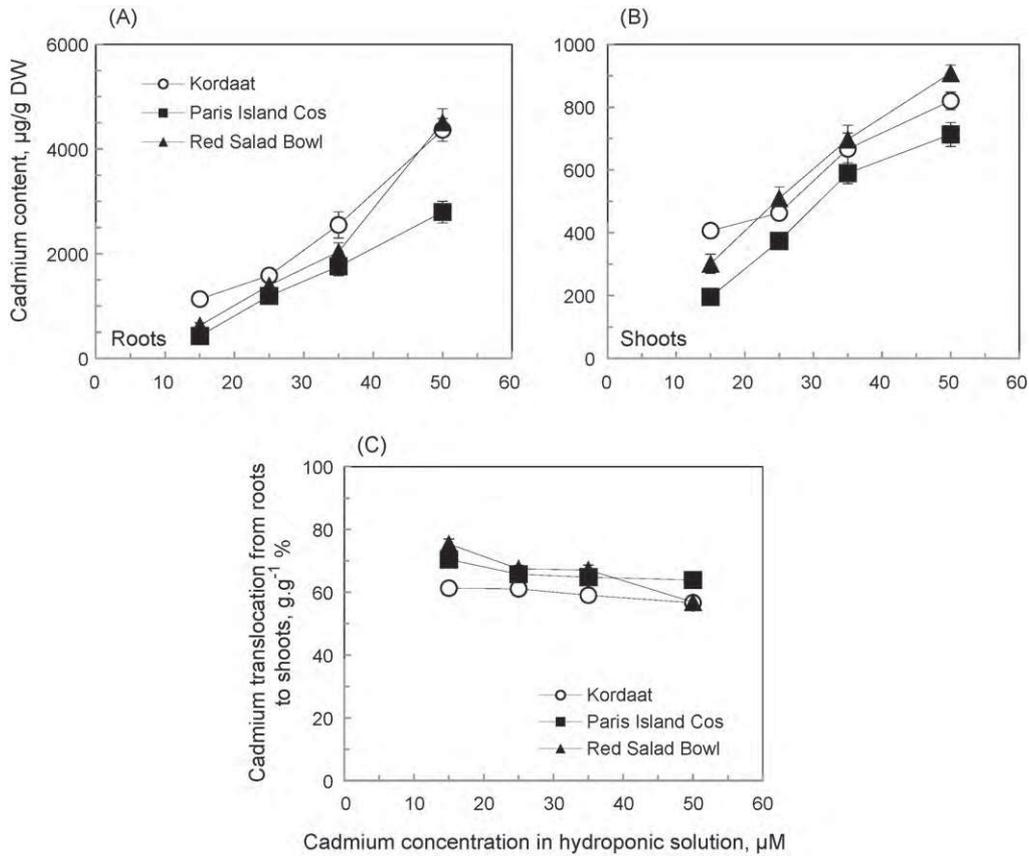
Increase in zinc content was actually parallel to the increase in cadmium content (Fig. 7). A common relationship linking zinc and cadmium contents was observed for all varieties in roots (Fig. 7A) as well as in shoots (Fig. 7B). Accordingly, it was observed that Paris

Island Cos, which displayed the lowest cadmium contents in roots and in shoots (Fig. 3), also displayed the lowest zinc contents in roots and shoots (Fig. 6). Also, translocations of cadmium and zinc from roots to shoots were similar for each variety (compare Fig. 6C to Fig. 3C). These results establish that there is a tight link between cadmium and zinc accumulation in lettuce.

#### Effects of cadmium on accumulation of anions

Cell sap constituents are mainly potassium on the one side (cations) and inorganic salts (nitrate, phosphate, sulphate and chloride) and organic acids (malate and citrate) on the other side (anions). Concentrations of these anionic constituents have been shown to vary both between and within plant species and also in response to nutritional environmental fluctuations. Thus, anionic profiling was performed for the roots and shoots of Kordaat, Paris Island Cos and Red Salad Bowl lettuce plants submitted or not submitted to 15 μM  $CdCl_2$ , expecting an intervarietal differential inhibitory effect of cadmium either on inorganic anion uptake or on organic acid metabolism, affecting therefore the corresponding anionic tissue contents.

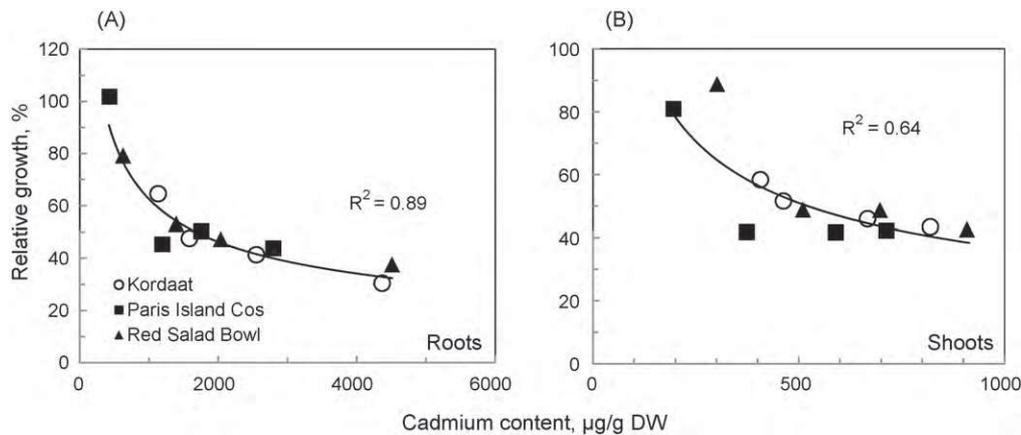
In the control condition, the three lettuce varieties displayed comparable anion contents, except for sulphate, chloride, and to a lesser extent, nitrate in shoots (Table 1 and Supplementary Table 1). As expected, accumulation of anions differed significantly between roots and shoots (Supplementary Table 1). Root sulphate content was at least twice as high as shoot sulphate one, while chloride and citrate contents were more than twice as high in shoots than in roots, and malate content 4 times higher in shoots than in roots (Table 1).



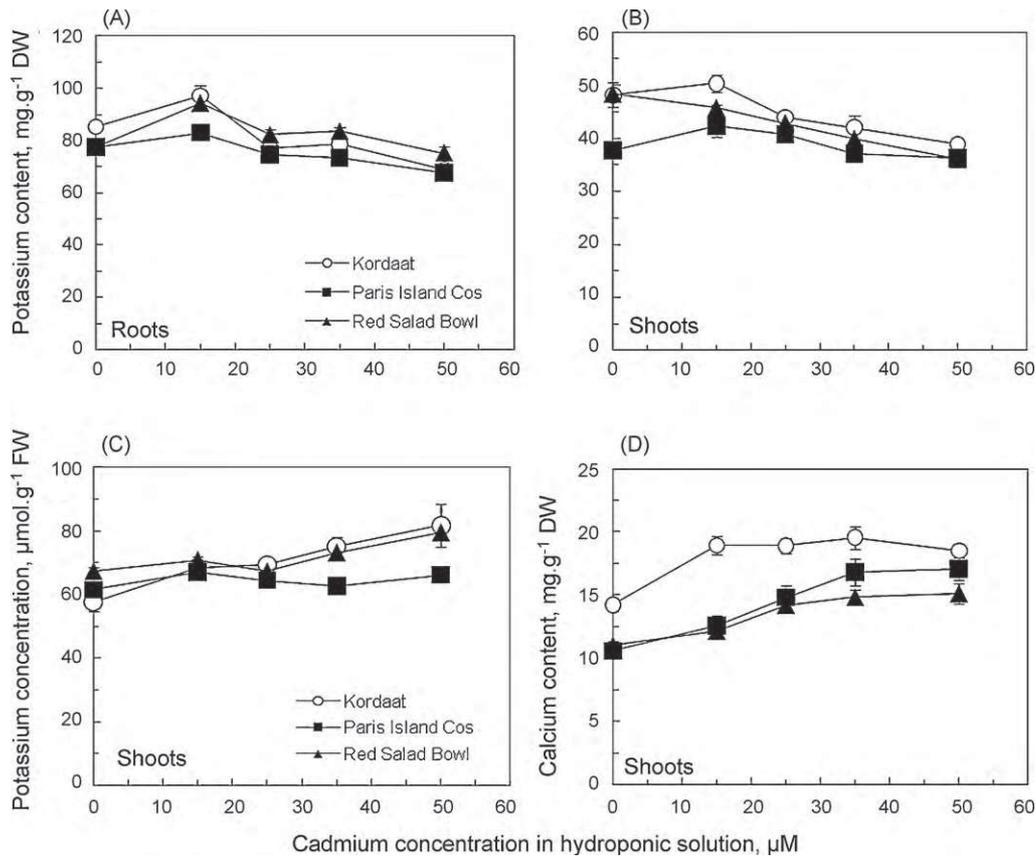
**Fig. 3.** The three lettuce varieties differentially accumulate cadmium. Changes in cadmium content ( $\mu\text{g/g DW}$ ) in roots (A) and shoots (B) and in the cadmium translocation from roots to shoots (C) in response to increasing cadmium concentrations in the culture medium are reported for the Korlaat, Paris Island Cos and Red Salad Bowl lettuce varieties. Cadmium translocation from roots to shoots corresponds to the amount of cadmium in shoots relative to the total amount of cadmium accumulated in the plants. It is expressed in percentage. Measurements were performed on samples coming from individual plants. Mean  $\pm$  S.E.;  $n = 7$ .

Submitting plants to  $15 \mu\text{M CdCl}_2$  resulted both in great changes in chloride and citrate contents, and in significant changes in sulphate and malate contents (Supplementary Table 2). Changes in chloride content were expected since only traces of chloride were present in the culture medium ( $0.044 \mu\text{M}$ ) before  $15 \mu\text{M CdCl}_2$  was added. In the presence of cadmium in the culture solution, sulphate content mainly increased in roots while malate content mainly decreased in shoots (Table 1), these changes being observed

in all varieties. The only differential effect of cadmium on anion contents among the three lettuce varieties affected citrate content (Supplementary Table 2). Korlaat plants displayed no change in their citrate content in response to cadmium treatment, while Red Salad Bowl plants displayed both a decrease in root citrate content and an increase in shoot citrate content (Table 1). Paris Island Cos plants displayed an intermediate phenotype: citrate content increased in shoots and remained unchanged in roots in response



**Fig. 4.** Relative growth and cadmium content are correlated in the three lettuce varieties. In roots (A) as well as in shoots (B), relative growth was determined as the ratio between dry weight of cadmium treated plants relative to dry weight of control plants. Measurements were performed on samples coming from individual plants. Average values for every variety  $\times$  cadmium treatment condition are presented ( $n = 7$ ). Lines represent fitted hyperbolic regression curves obtained from the least square adjustment of the data. Equations of the curves are  $Y = 1300X_{-0.44}$  for roots and  $Y = 900X_{-0.46}$  for shoots. For each regression, the square of Pearson's correlation coefficient ( $R^2$ ) is reported.



**Fig. 5.** Potassium and calcium contents are differentially altered in lettuce plants submitted to cadmium treatments. Potassium (A and B) and calcium (D) contents and potassium concentration (C) were measured in roots (A) and shoots (B–D) of the Kordaat, Paris Island Cos and Red Salad Bowl lettuce varieties in response to increasing cadmium concentrations in the culture medium. Measurements were performed on samples coming from individual plants. Mean  $\pm$  S.E.;  $n=7$ .

to cadmium treatment. This observation should be connected to the observation that Kordaat plants grown in 15  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  displayed the least cadmium translocation from roots to shoots, while Red Salad Bowl plants displayed the highest value, with Paris Island Cos plants being intermediate (Fig. 3C). This positive correlation between cadmium translocation from roots to shoots and the relative level of citrate content in shoot vs. in roots suggests that citrate might be involved in the root to shoot transport of cadmium.

## Discussion

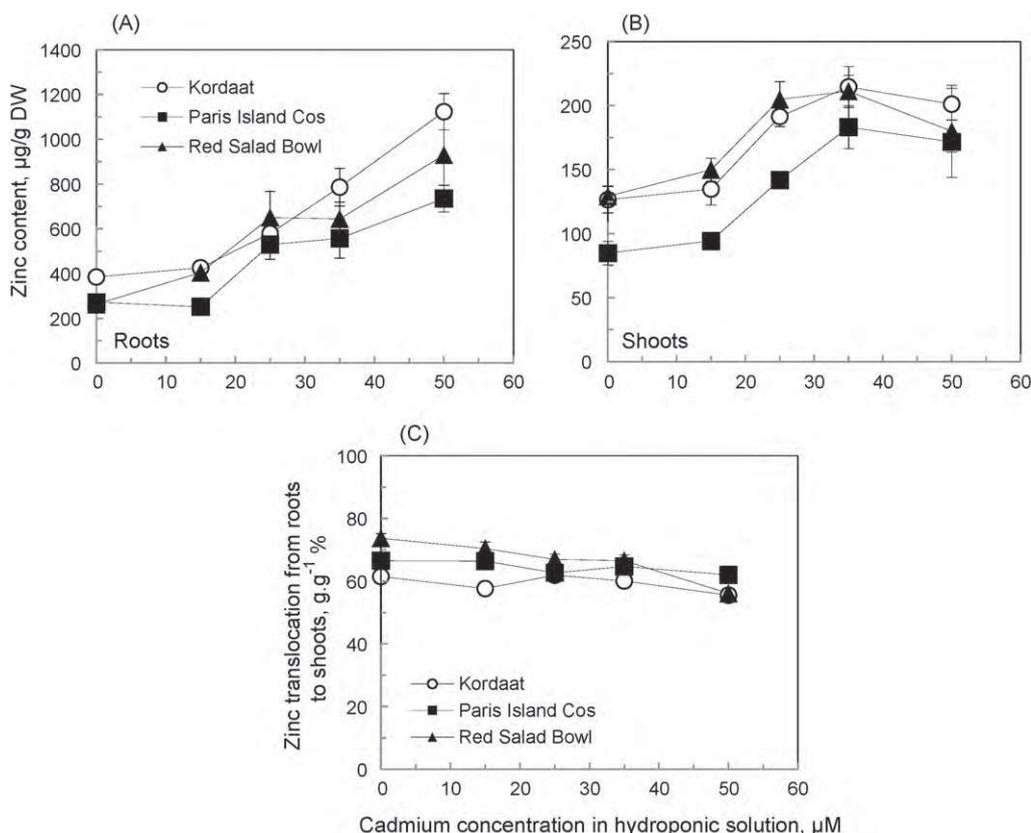
In the present study, we aimed to identify robust trends linking different characters related to the cadmium response of lettuce plants. To identify such trends, we comparatively analyzed three varieties, Paris Island Cos, Red Salad Bowl and Kordaat, which showed contrasting performance in terms of cadmium accumulation in a preliminary study (Zorrig et al., in preparation). In that study, 16 lettuce varieties were grown in the presence of

**Table 1**  
Effect of cadmium on anionic contents in shoots and roots.

CdCl <sub>2</sub> ( $\mu\text{M}$ )	Kordaat		Paris Island Cos		Red Salad Bowl	
	0	15	0	15	0	15
<b>A: shoots</b>						
Cl	1.1 $\pm$ 0.1 <sup>a**</sup>	7.5 $\pm$ 0.2b	1.9 $\pm$ 0.1ca	10.3 $\pm$ 0.4d	2.5 $\pm$ 0.1c	14.1 $\pm$ 0.4e
NO <sub>3</sub>	39.3 $\pm$ 3.9a	30.2 $\pm$ 1.3ab	24.9 $\pm$ 3.5ab	22.5 $\pm$ 1.3b	29.1 $\pm$ 2.3ab	30.9 $\pm$ 2.2a
SO <sub>4</sub>	2.1 $\pm$ 0.2a	1.7 $\pm$ 0.05a	1.8 $\pm$ 0.2ab	1.4 $\pm$ 0.1be	1.0 $\pm$ 0.05c	1.3 $\pm$ 0.1be
PO <sub>4</sub>	9.0 $\pm$ 0.9ab	6.5 $\pm$ 0.3b	11.2 $\pm$ 1.6a	7.9 $\pm$ 0.7ab	8.1 $\pm$ 0.6ab	9.9 $\pm$ 0.5ab
Malate	32.7 $\pm$ 2.6ab	27.8 $\pm$ 0.7a	38.3 $\pm$ 3.8b	26.9 $\pm$ 1.7a	30.4 $\pm$ 1.3ab	29.3 $\pm$ 1.6ab
Citrate	3.1 $\pm$ 0.1a	2.9 $\pm$ 0.1a	2.7 $\pm$ 0.2a	4.5 $\pm$ 0.2b	2.6 $\pm$ 0.1a	4.2 $\pm$ 0.5b
<b>B: roots</b>						
Cl	0.4 $\pm$ 0.02a	2.6 $\pm$ 0.2b	0.7 $\pm$ 0.1a	2.6 $\pm$ 0.2b	0.7 $\pm$ 0.03a	2.4 $\pm$ 0.2b
NO <sub>3</sub>	29.6 $\pm$ 2.2a	28.3 $\pm$ 2.6a	26.5 $\pm$ 1.6a	27.3 $\pm$ 1.6a	28.4 $\pm$ 2.0a	23.0 $\pm$ 2.2a
SO <sub>4</sub>	4.6 $\pm$ 0.2a	6.3 $\pm$ 0.6b	3.8 $\pm$ 0.4a	4.7 $\pm$ 0.3a	3.5 $\pm$ 0.3a	4.8 $\pm$ 0.5ab
PO <sub>4</sub>	11.1 $\pm$ 0.6ab	12.1 $\pm$ 1.1ab	11.7 $\pm$ 0.8ab	13.1 $\pm$ 1.0a	9.3 $\pm$ 0.6b	8.1 $\pm$ 0.8b
Malate	4.1 $\pm$ 0.2a	4.7 $\pm$ 0.4ab	7.1 $\pm$ 0.7b	6.4 $\pm$ 0.5b	4.2 $\pm$ 0.4a	3.5 $\pm$ 0.4a
Citrate	1.2 $\pm$ 0.1ab	1.1 $\pm$ 0.1ab	1.3 $\pm$ 0.2ab	1.4 $\pm$ 0.1a	1.0 $\pm$ 0.1ab	0.7 $\pm$ 0.1b

<sup>a</sup> Data are given in  $\mu\text{mol g}^{-1}$  FW. Mean  $\pm$  S.E.,  $n=8$ .

<sup>\*\*</sup> In each line, values marked with same letters are not significantly different at  $p=0.05$ .

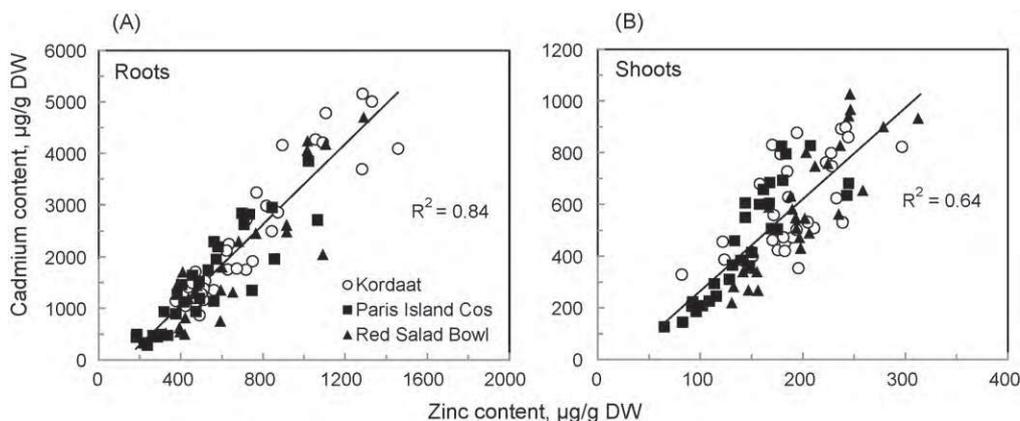


**Fig. 6.** Increasing cadmium concentration in the culture medium induces increased zinc uptake in lettuce plants. Zinc content in roots (A) and in shoots (B) and zinc translocation from roots to shoots (C) were measured for the Kordaat, Paris Island Cos and Red Salad Bowl lettuce varieties in response to increasing cadmium concentrations in the culture medium. Zinc translocation from roots to shoots corresponds to the amount of zinc in shoots relative to the total amount of zinc accumulated in the plants. It is expressed in percentage. Measurements were performed on samples coming from individual plants. Mean  $\pm$  S.E.;  $n=7$ .

15 µM cadmium. Paris Island Cos displayed the lowest cadmium content in roots and in shoots, and Kordaat displayed the highest content. The specific characteristic of Red Salad Bowl was that it translocated cadmium to the shoots with the greatest efficiency, showing shoot cadmium contents similar to that of Kordaat, and root cadmium content only slightly higher than that of Paris Island Cos. The results shown in Fig. 3 are in agreement with the preliminary data. Except for Red Salad Bowl plants grown on 50 µM cadmium, which showed the least ability to translocate cadmium to their shoots, results from the present study extend the validity of our preliminary observations

to plants submitted to higher external cadmium concentrations.

From this study, we identified three main trends linking different characters impacted by cadmium to each other. First, we observed that root and shoot cadmium tolerance was closely related to root and shoot cadmium content, respectively (Fig. 4). The important point here is that a common relationship linking relative growth and cadmium content was found for all three lettuce varieties. To our knowledge, this is the first report demonstrating such a relationship. This relationship needs to be validated through the analysis of a larger panel of lettuce varieties. However, our results



**Fig. 7.** Zinc and cadmium contents are highly correlated. Cadmium and zinc contents were determined in shoots (A) and in roots (B) of lettuce plants grown in the presence of cadmium. Every point corresponds to the analysis of a single plant belonging to any of the three varieties and subjected to 15, 25, 35 or 50 µM cadmium. Lines correspond to linear regression obtained using least square adjustment for all the data. For each regression, the square of Pearson's correlation coefficient ( $R^2$ ) is reported.

suggest that a major factor controlling cadmium tolerance in lettuce is the ability to reduce the tissue cadmium content. Indeed, the varieties that showed the highest shoot cadmium content (Kordaat and Red Salad Bowl) particularly exhibited typical cadmium toxicity symptoms such as chlorosis and a decrease in relative water content.

A second main trend emerging from this study is that in both roots and shoots, cadmium and zinc contents were highly correlated. Increasing cadmium concentration in the medium resulted in a parallel increase in root and shoot zinc contents. Importantly, for each organ, the linear relationship linking cadmium and zinc contents was common for all three lettuce varieties. These results do not offer obvious support to the hypothesis that cadmium might use zinc transport mechanisms for its accumulation in lettuce. Indeed, if the two elements were competing for the same transporter, increasing the cadmium/zinc concentration ratio in the culture medium should have led to a reduction in the zinc content in plant cells. However, the situation might be more complex. Induction of zinc absorption in response to addition of cadmium to the culture medium has been reported previously in lettuce (Turner, 1973; Thys et al., 1991), although not in all experiments (Kim et al., 1988; Ramos et al., 2002). If cadmium competes with zinc for the same uptake transporters, it may be that cadmium exposure could induce the perception of zinc starvation. In this context, lettuce plants may respond to this status by increasing their zinc uptake capacity. The iron concentration in the culture solution may also be of great importance, as induction of zinc absorption in response to cadmium was only observed in the presence of low iron concentration in the culture medium (Thys et al., 1991). This is reminiscent of results obtained with pea seedlings showing a sevenfold higher cadmium influx rate into roots under iron deficiency than under iron sufficiency (Cohen et al., 1998). In *Arabidopsis*, the high-affinity iron transport protein IRT1, which makes the predominant contribution to iron uptake by the roots, is known to have a broad substrate range (Korshunova et al., 1999; Connolly et al., 2002). Root cells expressing IRT1 display high uptake of transition metal ions such as Zn<sup>2+</sup> and Cd<sup>2+</sup>. IRT1 is not the only transporter shown to transport both zinc and cadmium. The tonoplast NRAMP4 transporter displays similar characteristics and plays a role in regulating zinc and cadmium contents in plant cells (Thomine et al., 2000; Oomen et al., 2009). Amazingly, IRT1 and NRAMP4 are upregulated under iron deficiency (Connolly et al., 2002; Thomine et al., 2000). In this context, the correlation that we observed between cadmium and zinc contents may result from the fact that the presence of cadmium can directly or indirectly trigger the over-expression of systems transporting both zinc and cadmium such as IRT1 or NRAMP3–4.

The third main trend emerging from this study is that cadmium translocation from roots to shoots was linked to the relative level of citrate content in shoot vs. in roots. Cadmium translocation from roots to shoots is known to depend mainly on the activity of the HMA4 P<sub>1B</sub>-type ATPase, which controls cadmium loading into, and unloading from, the xylem sap (Verret et al., 2004). However, cadmium cannot move freely in cells or in xylem vessels. Phytochelatin–cadmium complexes have been found in the xylem sap, and phytochelatin is considered to be involved in the long distance root to shoot transport of cadmium (Gong et al., 2003). Other compounds might also play a role, including cadmium–citrate complexes, which have been reported to be present in the xylem sap of cadmium treated tomato plants (Senden et al., 1995). Our results indicate that cadmium–citrate complexes could play a particular role in cadmium translocation from roots to shoots in lettuce.

In summary, we identified three different trends linking important characters such as cadmium tolerance, relative dry mass and/or cadmium, zinc and citrate tissue contents. These trends, which

should still be validated through the analysis of a larger panel of lettuce varieties, represent a good basis to better understand mechanisms involved in the plant response to cadmium and, to some extent, to develop breeding strategies aimed at limiting cadmium accumulation in lettuce leaves.

### Acknowledgements

WZ was supported by a scholarship from the Tunisian Ministry of Higher Education and Scientific Research (LR02CB02), and then by a scholarship from the “Agence Universitaire de la Francophonie” (AUF). This work was supported by the Agropolis Foundation (grant no. 07010). We thank Dr. B. Maisonneuve from INRA Avignon (France) for the lettuce seeds, and A. Adiveze, H. Afonso, C. Baracco, H. Baudot, F. Bourgeois, C. Dasen, G. Doucet, C. Gagneré, S. Gélén, F. Lecocq, V. Rafin, G. Ruiz and C. Zicler, for technical and administrative supports.

### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.jplph.2010.04.012.

### References

- Brown SL, Chaney RL, Lloyd CA, Angle JS, Ryan JA. Relative uptake of cadmium by garden vegetables and fruits grown on long-term biosolid-amended soils. *Environ Sci Technol* 1996;30:3508–11.
- Chen W, Li L, Chang AC, Wu L, Kwon S, Bottoms R. Modeling uptake kinetics of cadmium by field-grown lettuce. *Environ Pollut* 2008;152:147–52.
- Clemens S. Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. *Biochimie* 2006;88:1707–19.
- Cohen CK, Fox TC, Garvin DF, Kochian LV. The role of iron-deficiency stress responses in stimulating heavy-metal transport in plants. *Plant Physiol* 1998;116:1063–72.
- Connolly EL, Fett JP, Guerinot ML. Expression of the IRT1 metal transporter is controlled by metals at the levels of transcript and protein accumulation. *Plant Cell* 2002;14:1347–57.
- Costa G, Morel JL. Efficiency of H<sup>+</sup>-ATPase activity on cadmium uptake by four cultivars of lettuce. *J Plant Nutr* 1994;14:627–37.
- Florijn PJ, Nelemans JA, van Beusichem ML. The influence of the form of nitrogen nutrition on uptake and distribution of cadmium in lettuce varieties. *J Plant Nutr* 1992;15:2405–16.
- Ghnaya T, Slama I, Messedi D, Grignon C, Ghorbel MH, Abdely C. Effects of Cd<sup>2+</sup> on K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> and N uptake in two halophytes *Sesuvium portulacastrum* and *Mesembryanthemum crystallinum*: consequences on growth. *Chemosphere* 2007;67:72–9.
- Godt J, Scheidig F, Grosse-Siestrup C, Esche V, Brandenburg P, Reich A, et al. The toxicity of cadmium and resulting hazards for human health. *J Occup Med Toxicol* 2006;1:22–7.
- Gong JM, Lee DA, Schroeder JL. Long-distance root-to-shoot transport of phytochelatin and cadmium in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:10118–23.
- He Z, Li J, Zhang H, Ma M. Different effects of calcium and lanthanum on the expression of phytochelatin synthase gene and cadmium absorption in *Lactuca sativa*. *Plant Sci* 2005;168:309–18.
- Hirschi KD, Korenkov VD, Wilganowski NL, Wagner GJ. Expression of *Arabidopsis* CAX2 in tobacco altered metal accumulation and increased manganese tolerance. *Plant Physiol* 2000;124:125–33.
- Kim SJ, Chang AC, Page AL, Warneke JE. Relative concentrations of cadmium and zinc in tissue of selected food plants grown on sludge-treated soils. *J Environ Qual* 1988;17:568–73.
- Korshunova YO, Eide D, Clark WG, Guerinot ML, Pakrasi HB. The IRT1 protein from *Arabidopsis thaliana* is a metal transporter with a broad substrate range. *Plant Mol Biol* 1999;40:37–44.
- López-Millán A-F, Sagardoy R, Solanas M, Abadía A, Abadía J. Cadmium toxicity in tomato (*Lycopersicon esculentum*) plants grown in hydroponics. *Environ Exp Bot* 2009;65:376–85.
- Mobin M, Khan NA. Photosynthetic activity, pigment composition and antioxidative response of two mustard (*Brassica juncea*) cultivars differing in photosynthetic capacity subjected to cadmium stress. *J Plant Physiol* 2007;164:601–10.
- Monteiro MS, Santos C, Soares AMVM, Mann RM. Assessment of biomarkers of cadmium stress in lettuce. *Ecotoxicol Environ Safety* 2009;72:811–8.
- Oomen RJ, Wu J, Lelièvre F, Blanchet S, Richaud P, Barbier-Brygoo H, et al. Functional characterisation of NRAMP3 and NRAMP4 from the metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *New Phytol* 2009;181:637–50.
- Palmgren MG, Clemens S, Williams LE, Krämer U, Borg S, Schjørring JK, Sanders D. Zinc biofortification of cereals: problems and solutions. *Trends Plant Sci* 2008;13:464–73.

- Perfus-Barbeoch L, Leonhardt N, Vavasour A, Forestier C. Heavy metal toxicity: cadmium permeates through calcium channels and disturbs the plant water status. *Plant J* 2002;32:539–48.
- R Development Core Team. R: a language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2008. <http://www.R-project.org>.
- Ramos I, Esteban E, Lucena JJ, Garate A. Cadmium uptake and subcellular distribution in plants of *Lactuca* sp. Cd–Mn interaction. *Plant Sci* 2002;162:761–7.
- Razinger J, Dermastia M, Koce JD, Zrimec A. Oxidative stress in duckweed (*Lemna minor* L.) caused by short-term cadmium exposure. *Environ Pollut* 2008;153:687–94.
- Senden MHMN, Van Der Meer AJGM, Verburg TG, Wolterbeek HT. Citric acid in tomato plant roots and its effect on cadmium uptake and distribution. *Plant Soil* 1995;171:333–9.
- Szöllősi R, Varga IS, Erdei L, Mihalik E. Cadmium-induced oxidative stress and antioxidative mechanisms in germinating Indian mustard (*Brassica juncea* L.) seeds. *Ecotoxicol Environ Safety* 2009;72:1337–42.
- Thomine S, Wang B, Ward JM, Crawford NM, Schroeder JI. Cadmium and iron transport by members of a plant metal transporter family in Arabidopsis with homology to Nramp genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:4991–6.
- Thys C, Vanthomme P, Schrevens E, De Proft M. Interactions of Cd with Zn, Cu, Mn and Fe for lettuce (*Lactuca sativa* L.) in hydroponic culture. *Plant Cell Environ* 1991;14:713–7.
- Turner MA. Effect of cadmium treatment on cadmium and zinc uptake by selected vegetable species. *J Environ Qual* 1973;2:118–9.
- Verret F, Gravot A, Auroy P, Leonhardt N, David P, Nussaume L, et al. Overexpression of AthMA4 enhances root-to-shoot translocation of zinc and cadmium and plant metal tolerance. *FEBS Lett* 2004;576:306–12.

Supplementary Table 1: One-way ANOVA of anion contents in plants from the Kordaat, Paris Island Cos and Red Salad Bowl lettuce varieties grown on control medium

	df <sup>a</sup>	chloride			nitrate			malate			sulphate			phosphate			citrate								
		SS	MS	F	p <sup>b</sup>	SS	MS	F	p	SS	MS	F	p	SS	MS	F	p	SS	MS	F	p				
Variety	2	4.9	2.4	43	***	581	290	5.4	**	244	122	3.9	NS	7.8	3.9	9.2	***	56	28	4.2	NS	0.85	0.42	2.8	NS
Organ	1	16	16	288	***	94	94	1.7	NS	9008	9008	291	***	58	58	135	***	16	16	2.4	NS	30	30	201	***
Variety*organ	2	2.3	1.1	20	***	261	131	2.4	NS	47	23	0.76	NS	0.61	0.31	0.72	NS	4.4	2.2	0.33	NS	0.29	0.15	0.98	NS
Error	38	2.2	0.06			2047	54			1176	31			16	0.43			255	6.7			5.7	0.15		
Total	43	26				2970				10582				82				332				37			

<sup>a</sup> df: degree of freedom, SS: sum of squares, MS: mean square, F: F value,

<sup>b</sup> p: p value; NS: p>0.01, \*\*: p<0.01, \*\*\*: p<0.001

Supplementary Table 2: One-way ANOVA of anion contents in plants from the Kordaat, Paris Island Cos and Red Salad Bowl lettuce varieties grown on medium supplemented with either 15µM CdCl<sub>2</sub> or not

	df	chloride			nitrate			malate			sulphate			phosphate			citrate								
		SS	MS	F	p	SS	MS	F	p	SS	MS	F	p	SS	MS	F	p	SS	MS	F	p				
Variety (V)	2	57	28	88	***	725	362	8.8	***	135	67	3.6	NS	16.4	8.2	11.3	***	67	33	5.4	**	2.5	1.3	6.1	**
Organ (O)	1	477	477	1485	***	118	118	2.9	NS	14709	14709	783	***	206	206	284	***	97	97	16	***	108	108	521	***
Treatment (T)	1	632	632	1966	***	151	151	3.7	NS	199	199	11	**	7.3	7.3	10	**	4.7	4.7	0.8	NS	5.2	5.2	25	***
V*O	2	54	27	84	***	382	191	4.6	NS	0.1	0.05	0.003	NS	3.3	1.6	2.3	NS	63	31	5	**	2	1	4.7	NS
V*T	2	20	10	31	***	86	43	1	NS	109	55	2.9	NS	1.1	0.5	0.8	NS	5.8	2.9	0.5	NS	5.2	2.6	12	***
O*T	1	260	260	809	***	8	8	0.2	NS	167	167	8.9	**	13	13	18	***	17	17	2.8	NS	7.1	7.1	34	***
V*O*T	2	28	14	43	***	197	98	2.4	NS	93	47	2.5	NS	1.2	0.6	0.8	NS	55	28	4.4	NS	4.1	2	9.8	***
Error	80	26	0.3			3301	41			1503	19			58	0.7			497	6.2			16.6	0.2		
Total	91	1432				4812				17375				334				884				150			

<sup>a</sup> df: degree of freedom, SS: sum of squares, MS: mean square, F: F value,

<sup>b</sup> p: p value; NS: p>0.01, \*\*: p<0.01, \*\*\*: p<0.001



