

ANTIOXYDANTS ET PHYTOCHELATINES DANS LA TOLERANCE ET L'ACCUMULATION DU MANGANESE CHEZ L'*HIBISCUS SABDARIFFA* LINN.

Mavoungou Ange Younes, PhD

Académie de Strasbourg, France.

Lepengue Alexis Nicaise, Dr

M'batchi Bertrand, Pr

Université des Sciences et Techniques de Masuku (USTM). Laboratoire de
Physiologie Végétale et Protection des plantes,
Unité de recherche agrobiologie, Gabon

Abstract

After 12 days of culture seeds roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) growth chamber, seedlings are subject to the effect of manganese concentration (2,9µM) to study the accumulation of Mn and its toxicity for 24 hours (1 day). The results show that Mn accumulates extensively in the shoot than in the roots, photosynthetic pigments (chloro (a) and carotenoids) and the enzyme system (SOD, CAT and GPOX) increase during 24 hours of experience. In shoot, SOD and CAT enzyme activity is higher than that APX, GR and GPOX. In roots, SOD enzyme activity and GPOX is higher than APX, GR and CAT. The amount of glutathione (GSH) and phytochelatin (PCs) are measured to monitor their responses detoxification under exposure levels of Mn in the plant. The maximum synthesis PCs rise to 24 hours of exposure to Mn. This correlates with reduced GSH. This shows that a protective mechanism that chelate excess Mn out of the metabolic center is set up by the plant. *Hibiscus sabdariffa* Linn therefore has the ability to accumulate and tolerate concentrations of Mn in the first hour of exposure by controlling the rate of GSH and PCs.

Keywords: *Hibiscus sabdariffa*, manganese, chlorophyll (a, b, a+b) and carotenoids, antioxydants, Phytochelatin

Introduction

Le manganèse (Mn) de numéro atomique Z=25 et de masse atomique 54.938, appartient au groupe VII de la classification périodique des éléments.

Le manganèse à faible dose est un oligoélément indispensable à la vie de la plante. Il intervient notamment dans la phase lumineuse de la photosynthèse. Ce minerai exerce un effet toxique dans une plante lorsque sa concentration dans le sol augmente. Le système foliaire des plantes est plus affecté que le système racinaire (Gilbert, 1957). Les symptômes de toxicité du Mn sont habituellement similaires à ceux d'une déficience en Mn. Ce dernier est souvent absorbé sous la forme bivalente Mn^{2+} . Cet ion est retenu par le complexe absorbant. Il est « échangeable » contre d'autres cations, et par conséquent devient plus ou moins assimilable par la plante. L'accumulation du Mn a lieu dans le petiolule et dans les cellules du parenchyme palissadique spongieux. Cette tendance de cloisonnement du Mn est probablement un mécanisme de protection séparant les excès de Mn du centre métabolique (Memon et al, 1981). La toxicité du Mn est aussi associée à une assimilation abondante de l'oxygène et au dérèglement des systèmes enzymatiques (Sharma, 1991).

Au travers de la fluorométrie, les pigments photosynthétiques comme la chlorophylle (a), (b), (a+b) et les caroténoïdes permettent d'élucider le rôle de la photosynthèse (Papageorgiou, 2011). Ces pigments sont influencés par une émission fluorescente c'est-à-dire qu'une molécule dans le centre réactionnel du photosystème PSII (trempe photochimique) active la chlorophylle redox par le déséquilibre électrochimique à travers la membrane du thylakoïde (trempe à haute énergie) et par la taille des antennes périphériques de PSI et PSII, qui sont respectivement faiblement et fortement fluorescentes en réponse aux changements des conditions normales (Govindjee, 2011).

Les enzymes antioxydantes telles que le superoxyde dismutase (SOD EC 1.15.1.1), l'ascorbate peroxydase (APX, EC 1.11.1.11), la catalase (CAT, EC 1.11.1.6) et le guaïcol peroxydase (GPOX, EC 1.11.1.7) sont les lignes de défense contre les espèces réactives de l'oxygène (ROS). Le GSH est un antioxydant ubiquitaire formé à partir du glutamate, la cystéine et la glycine. Il participe à la conjugaison et à l'élimination des molécules toxiques (Meister, 1983). Les phytochélatines (PCs) sont de petites liaisons métal-peptide de structure $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$, où la valeur de (n) varie de 2 à 11, et dont la synthèse est induite par plusieurs métaux, comme le Mn (Grill et al, 1985; Yao et al, 2012). Elles sont considérées comme des éléments importants pour la chélation/ détoxification des métaux toxiques dans les plantes supérieures. La biosynthèse de PC implique des enzymes comme la PC synthase (γ -glutamyl cysteine dipeptidyl transpeptidase) (PCS; EC 2.3.2.15) 431564 avec le GSH comme substrat. La signification fonctionnelle de PC peut être attribuée à la présence de thiol (-SH). Celle-ci étant responsable de la coordination des métaux (Chaturvedi, 2007).

La roselle ou Oseille de Guinée (*Hibiscus sabdariffa* L. var *sabdariffa*, *Malvaceae*) est une plante touffue annuelle qui atteint 1,5 m de hauteur (Lépengué et *al*, 2012). Cette plante se compose généralement d'un calice rouge avec cinq grands sépales. Elle est originaire des plantes tropicales de l'Inde et de la Malaisie, mais elle se développe largement dans les régions tropicales et subtropicales des deux hémisphères. Les feuilles de roselle sont très consommées en Afrique comme complément alimentaire pour les sauces. Elles sont bonnes au goût et elles ont une haute valeur nutritionnelle. Celles-ci contiennent 5% de protéines, mais aussi beaucoup de vitamines A et C, du calcium ainsi que des quantités assez importantes de fer (Lufuta, 2011). A Moanda, au Gabon cette plante est souvent cultivée sur des sols riches en Mn. Les concentrations en manganèse dans ces sols sont supérieures à 10000 mg kg⁻¹. Ceci suggère que les apports quotidiens en Mn dans la roselle sont élevés et que la consommation de ces plantes pourraient présenter un risque pour la santé parce que les apports journaliers recommandés ont été dépassés (Biyogo, 2013).

Dans cette perspective, la présente étude se concentre sur l'hyperaccumulation en Mn par la roselle au première heure d'exposition. L'accumulation de ce métal dans les racines et les feuilles est évaluée, de même le contenu en pigments photosynthétiques. Par ailleurs, le niveau de GSH et de PC est estimé afin de connaître la capacité de l'oseille à résister au stress oxydatif induit par le Mn ainsi que sa détoxification par les PCs.

Méthodes

Condition de culture et échantillonnage des plantules.

Toutes les expériences sont réalisées à partir des graines de roselle rouge (*Hibiscus Sabdariffa* L.) sur deux échantillons: (1) sable de fontaine bleu et (2) extrait aqueux riche en manganèse. Pour ces travaux nous réalisons trois réplicats par échantillon. L'échantillon aqueux saturé en manganèse à une teneur de 0,16mg/L (2,9µM) (teneur évaluée au laboratoire du Ministère des Mines, du Pétrole et des hydrocarbures au Gabon). Les graines de roselle conservées à l'obscurité en chambre froide à 4°C sont mises à hydrater pendant 24 h dans de l'eau à température ambiante. Elles sont rincées à l'eau puis plongées dans 1dm³ d'une solution hypochlorite de sodium à 1% pendant dix minutes pour éliminer toutes contaminations fongiques (Lépengué et *al*, 2011). Après plusieurs rinçage à l'eau déminéralisée, les graines sont mises à germer dans des pots contenant les deux milieux. Les pots de germination contiennent quatre graines de roselle. Ces pots sont placés pendant 3 à 4 jours dans l'armoire à germination, à l'obscurité, à 22°C et avec un taux d'humidité de 100%. Au 5ème jour les pots sont mis en salle de culture pour une croissance optimale des plantules. Les conditions de culture dans cette salle sont contrôlées: luminosité (14

heures de jour / 10 heures de nuit), température (24°C le jour / 20°C la nuit) et l'hydrogrométrie 70% d'humidité la nuit. Toutes les 24 h, la nutrition minérale des plantules, est assurée par une solution nutritive de Hoagland (Tab.1). Après 12 jours de culture, les jeunes plantes au cinquième étage foliaire sont récoltées. Un échantillonnage est effectué à la fois sur les feuilles et sur les racines immédiatement congelé dans l'azote liquide. Les feuilles de chaque culture sont pesées. Les racines récoltées qui présentent une longueur minimale de 3 cm ont également été pesées (Fig.1).

Techniques Analytiques

Préparation de l'extrait aqueux saturé en Mn:

Le sol manganifère est échantillonné à la Moulili qui est une ancienne rivière du Haut-Ogooué, au Gabon. Il n'est plus possible de pêcher dans cette rivière en raison de l'envasement dont les impacts sont visibles jusqu'à son embouchure avec l'Ogooué (Lebas, 2010). L'extrait aqueux de ce prélèvement est obtenu comme suit: agitation (eau + sol manganifère), décantation (liquide saturé en manganèse et sol manganifère). Le liquide issu de cette décantation est l'extrait aqueux riche en manganèse. C'est à partir de ce liquide que nous obtenons la teneur en manganèse.

Tableau 1: Composition de la solution nutritive de Hoagland.

Sels	Teneur (mg)
(NO ₃) ₂ Ca, 4H ₂ O	5
NO ₃ K	5
SO ₄ Mg, 7H ₂ O	1
PO ₄ H ₂ K	1
Tartrate ferrique 0,5%	1
H ₂ O	1000

Tableau 2: Concentration en manganèse dans les différents sols.

Sol			
Sable	Argileux	Manganifère	
teneur en Mn	0*	0**	0,16
solution nutritive Hoagland	Eau	Eau	Eau

*: teneur en Mn mg/L. **:non fourni.

Absorption du Manganèse.

Les racines et les feuilles récoltées sont séchées au four à 65°C pendant une semaine. Les tissus des plantes séchés sont digérés dans le mélange contenant de l'acide nitrique (HNO₃) et de l'acide perchlorique (HClO₄) par le système de réaction en micro-onde d'Anton Paar. Le contenu en Mn dans les racines et les feuilles est estimé en utilisant un spectrophotomètre d'absorption atomique à flamme avec une limite de détection de 0.004 ppm (Seth, 2007).

Extraction, Dosage et Séparation des Pigments Chlorophylliens.

Pour chaque échantillon, 5g de feuilles finement découpées en petits morceaux sont broyées dans un mortier avec une pincée de sable et 60mL d'acétone pure refroidie. Après le broyage total, la solution est ensuite filtrée à l'aide d'un morceau de tissu. Le filtrat récupéré est à nouveau broyé

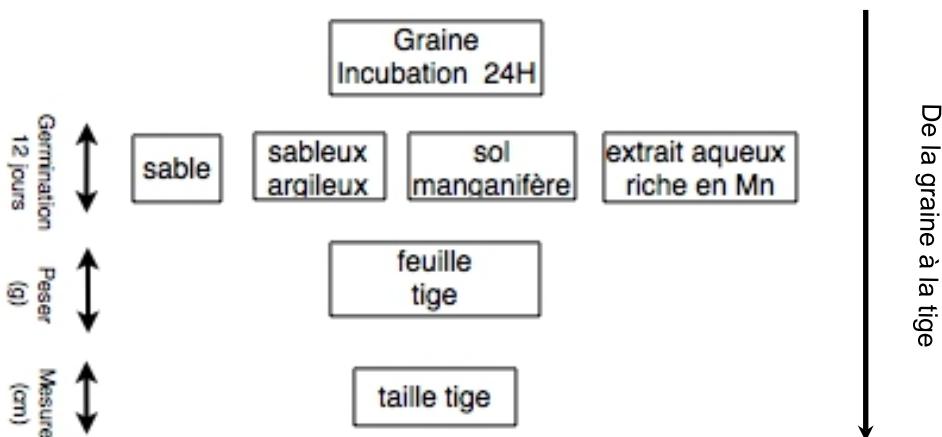


Figure 1: Processus expérimental de culture des graines de roselle sur quatre milieux de croissance (sable, sableux argileux, sol manganifère et extrait aqueux riche en manganèse). Chaque milieu contient 4 graines de roselle qui germent pendant 12 jours. Les résultats des expérimentations sur les milieux «sableux-argileux» et «sol manganifere» ne sont pas montré dans ce travail.

en présence de 80mL d'acétone à 80%. Les deux filtrats sont réunis, homogénéisés par agitation puis séparés en 2 flacons. Pendant 45min, l'un (15mL) est mis dans des boîtes noires afin d'éviter l'oxydation des chlorophylles par la lumière pour le dosage des pigments chlorophylliens, et l'autre (50mL) est exposé à la lumière pour la séparation. Après étalonnage de l'appareil avec la solution témoin d'acétone à 80%. L'absorption des extraits des pigments des feuilles est mesurée aux longueurs d'onde de 470, 645 et 663 nm. Les concentrations en chlorophylle a, b, en chlorophylle total (a + b) et en caroténoïdes totaux sont calculés en fonction des coefficients d'extinction et des équations de Mac Kinney.

Extraction et Dosage enzymatique

L'extraction enzymatique est faite à partir des feuilles et des racines des échantillons (3g) qui ont subi un traitement au Mn pendant un jour. Elles sont broyées à froid dans un mortier avec 10mL de tampon phosphate (80mM, pH 7,5). Le broyage permet d'éviter les variations dans la réponse des organes au stress due à leur différence d'âge (Pourrut, 2008). L'homogénat est ensuite filtré à l'aide d'une toile adéquate avant de procéder à la centrifugation à froid à 15000 tr/min pendant 10min (centrifugeuse Sigma 3–

16 K). Le surnageant obtenu est utilisé comme extrait pour la détermination des différentes activités enzymatiques (Sbartai, 2012). Il est placé dans un tube à essai et conservé à -80°C .

Dosages enzymatiques:

Le Guaicol Peroxydase (GPOX)

Les GPOXs (EC1.11.1.7), sont des homoprotéines à noyau tétrapyrrolique ferrique. Ils sont capables d'oxyder un très grand nombre de composés phénoliques en présence de peroxydes d'hydrogène (H_2O_2). L'activité des GPOXs est mesurée à partir d'un spectrophotomètre à 470 nm en suivant la consommation du peroxyde d'hydrogène. Elle est exprimée en μmoles de protéines dégradées d' H_2O_2 en min/mg.

Tableau 3: Dosage des DO des GPOXs.

Tubes	1	2	3
TMB substrat (mL)	2	2	2
Eau oxygénée (mL)	2	2	2
Enzyme (mL)	1*	1	1
Lire la DO toutes 30 secondes pendant 5 minutes			

1*: 1mL de tampon

Dosage de l'activité Catalase:

Le dosage de l'activité catalase est déterminé suivant la méthode de Chaoui *et al*, (1997). La décroissance de l'absorbance est enregistrée pendant 5 mn pour une longueur d'onde de 240 nm et un coefficient d'extinction molaire $e=36,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Pour un volume final de 5 mL, le mélange réactionnel contient : 1 mL de l'extrait enzymatique brut, 2 mL de peroxyde d'hydrogène H_2O_2 à 0,3 % et 2 mL de tampon phosphate (50 mM, $\text{pH}=7,2$). L'étalonnage de l'appareil se fait en l'absence de l'extrait enzymatique. La réaction est déclenchée par l'addition d'eau oxygénée (Djebar, 2012).

Dosage de l'activité ascorbate peroxydase (APX, EC 1.11.1.11).

Le dosage de l'activité APX est réalisé suivant le protocole de Limones *et al*, (2002). Le volume réactionnel final de 5 mL contient : 1 mL d'extrait enzymatique, 2 mL d' H_2O_2 à 0,3 % et 2 mL de tampon phosphate de sodium et de potassium 50 mM, $\text{pH}=7,2$ contenant 0,5 mM d'ascorbate. L'étalonnage de l'appareil se fait en l'absence de l'extrait enzymatique. La lecture est effectuée à 290 nm pendant 5 minutes et pour un coefficient d'extinction linéique molaire $e=2800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. L'activité APX est exprimée en nmol/min/mg de protéines (Berrabbah, 2012).

Dosage de l'activité Glutathion reductase (GSH, EC 1.6.4.2)

Le GSH est estimé en suivant la méthode de Gutter et *al*, (2002). Le mélange réactionnel composé de 1.0 mL de 0.2 M du tampon phosphate de potassium (pH=7.5) qui contient 1 mM EDTA, 0.5 mL de 3 mM 5,5-dithiobis (2-nitrobenzoïque acide) dans 0.01 M de tampon phosphate (pH=7.5), 0.25 mL H₂O, de 0.1 mL de 2 mM NADPH, 0.05 mL d'extrait d'enzyme et 0.1 mL de 20 mM GSSG (GSH oxydé). Les composants sont ajoutés suivant l'ordre listé ci-dessus directement dans la cuvette et la réaction commence à l'ajout du GSSG dans la cuve. Le contenu en GSH est évalué en suivant l'augmentation de l'absorbance à 412 nm pendant 5 minutes. Le taux de l'activité de l'enzyme est calculé en utilisant la préparation standard connue de la concentration en GR et exprimé en micromole de GSSH réduit.min⁻¹.g⁻¹.

Dosage de l'activité totale superoxyde dismutase (SOD)

L'activité SOD est évaluée en suivant le procédé de Ries et *al*, (1977) qui mesure sa capacité à inhiber la réduction photochimique du nitro-bleu de tétrazolium (NBT). Une unité d'activité de la SOD est définie comme la quantité d'enzyme nécessaire pour provoquer une inhibition de 50% de réduction NBT (Pourrut, 2008).

Estimation des Phytochélatines (PCs)

Les PCs sont mesurées en suivant la méthode de Courbort et *al*, 2004 et de Bhargava et *al*, 2005. Après le passage de la quantité totale de thiols à l'état réduit, des courbes d'étalonnage sont réalisées à l'aide de gammes de glutathion, γ -glutamyl-cystéine et cystéine commerciaux dans du SSA-DTPA pour le dosage de chaque PC. Les quantités de PCs sont exprimées en mole par gramme de poids frais (Beraud et *al*, 2007).

Analyse statistique

Les expériences sont effectuées en trois répétitions par échantillon pour vérifier la précision de la méthode. Les résultats sont analysés statistiquement à partir d'une ANOVA à sens unique et par la méthode de comparaison multiple de Tukey, pour confirmer la variabilité des données et la validité des résultats (Kepel et *al*, 1973; Seth et *al*, 2008).

Résultats

Accumulation du Manganèse

Les concentrations en Mn dans les racines et les feuilles de la roselle augmentent durant les 24 heures d'exposition (Fig.1). De la première heure à la 24^{ème} heure, les résultats montrent une accumulation abondante disproportionnée du Mn dans les feuilles que dans les racines. Dans les

feuilles, la vitesse d'absorption à la première heure est de $V_f=5,5 \cdot 10^{-3} \mu\text{g/g/s}$ et $V_r=2,8 \cdot 10^{-3} \mu\text{g/g/s}$ dans les racines. A la 3^{ème} heure, la cinétique d'absorption du Mn augmente nettement dans les feuilles et dans les racines ($V_f=1,9 \cdot 10^{-2}$ et $V_r=6,6 \cdot 10^{-3}$). Celle-ci ralenti pendant quelques heures suivi par une nouvelle augmentation.

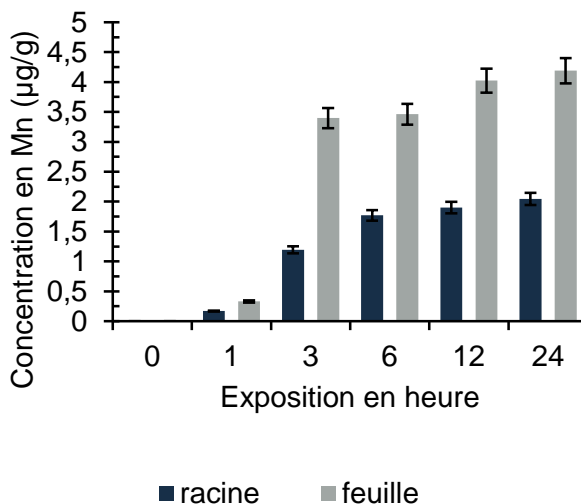


Figure1: Accumulation du manganèse dans les feuilles et les racines de l'*Hibiscus sabdariffa* Linn avec $2,9 \mu\text{M}$ en Mn. Les résultats sont les moyennes des trois replicats indépendants \pm SD (n = 3). La barre représente la moyenne des différents paramètres et les valeurs indiquées sont la moyenne \pm écart-type (n = 3) (P<0,05).

Les Pigments Photosynthétiques

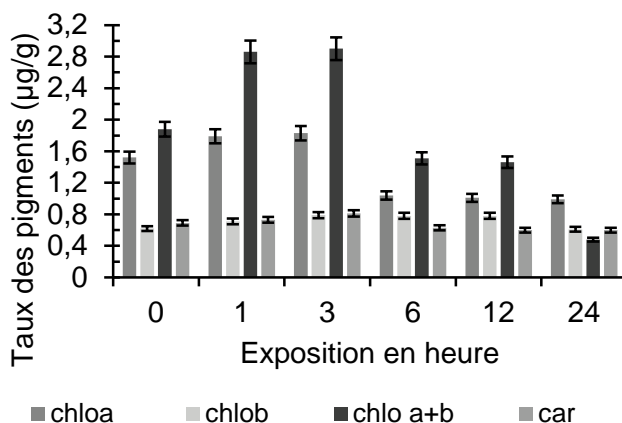


Figure2: Effets du manganèse sur la chlorophylle a, b, (a+b) et sur les caroténoïdes contenus dans les feuilles de l'*Hibiscus sabdariffa*. La barre représente la moyenne des différents paramètres et les valeurs indiquées sont la moyenne \pm écart-type (n = 3) (P<0,05).

D’après la Figure 2, la teneur du manganèse provoque une augmentation significative des pigments chlorophylliens de la 1 ère à la 3 ème heure du traitement. Les taux en chlorophylle (a), (b), (a+b) et en caroténoïdes atteignent respectivement près de 15,08%; 8,82%; 34,26% et 5,48% d’augmentation. Par contre de la 6 ème à la 24 ème heure, le taux de pigments chlorophylliens est sensible au traitement au Mn. Les résultats montrent une baisse très marquée de 43,17% en chlorophylle (a) et de 22,22% en caroténoïde au regard du taux en chlorophylle des témoins.

Enzyme antioxydant dans les feuilles et les racines

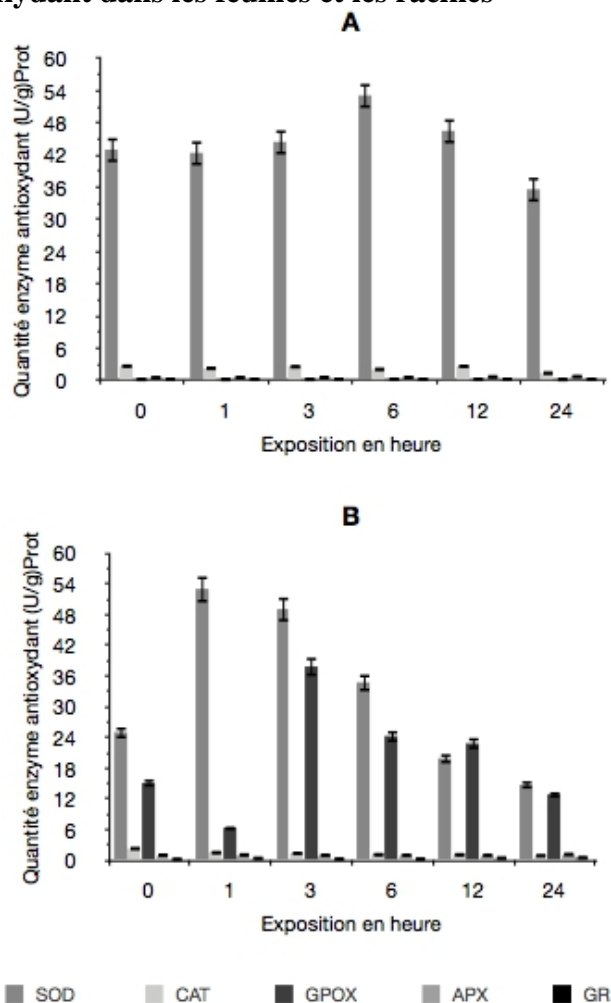


Figure3: Effet du traitement du manganèse sur les capacités des enzymes antioxydantes dans les feuilles (A) et dans les racines (B) de l’*Hibiscus sabdariffa* Linn. La barre représente la moyenne des différents paramètres et les valeurs indiquées sont la moyenne ± écart-type (n = 3) (P<0,05).

D'après la figure 3A, le traitement au manganèse provoque une augmentation des SODs jusqu'à la 6^{ème} heure (53,13 U/g protéine) et une baisse de la 12^{ème} à la 24^{ème} heure (35,65 U/g protéine). La catalase est stimulée jusqu'à la 12^{ème} heure (~2,6 U/g Prot) de traitement. Son activité baisse à la 24^{ème} heure (1,43 U/g Prot). L'activité enzymatique GPOX, APX et GR présentent une très faible activité à la 24^{ème} heure. Ceci est en accord avec les résultats de la figure 1 car le Mn s'accumule plus dans les feuilles que dans les racines. Le stress oxydatif dans les feuilles produit plus de ROS et donc plus de SODs. Dans les racines le GPOX présente une baisse à la 1^{ère} heure (t=0H 15,12 U/g Prot; t=1H 6,39 U/g Prot) et une augmentation à la 3^{ème} heure (37,87 U/g Prot) suivi à nouveau d'une baisse de la 6^{ème} à la 24^{ème} heure (12,89 U/g Prot). L'activité enzymatique CAT, APX et GR sont faible dans les racines. A la différence de GR qui augmente de la 3^{ème} à la 24^{ème} heure de 0,044 à 0,432 U/gProt. L'activité CAT décroît faiblement alors que l'APX semble constante durant l'exposition avec une légère augmentation à la 24^{ème} heure.

Glutathion (GSH) et Induction des Phytochélatines (PCs).

Durée d'exposition (h)	PCs (µg/g)		PCs (R/F)
	Racines (R)	Feuilles (F)	
0	0,24 +/- 0,13	0,44 +/- 0,12	PC2
1	1,15 +/- 0,51	0,9 +/- 0,21	PC2
3	0,79 +/- 0,43	0,75 +/- 0,37	PC2
6	0,84 +/- 0,28	0,78 +/- 0,31	PC2
12	1 +/- 0,11	0,79 +/- 0,34	PC2
		0,5 +/- 0, 21	PC3
24	0,98 +/- 0,17	2 +/- 0,24	PC2
	0,45 +/- 0,13	1,83 +/- 0,72	PC3/PC5
	0,44 +/- 0,16	0,02 +/- 0,01	PC4
	0,18 +/- 0,09	0,014 +/- 0,08	PC5
	0,7 +/- 0,04	0,013 +/- 0,01	PC6

Tableau1: Induction des phytochélatines exposées à 2,9µM dans les feuilles et dans les racines de l'*Hibiscus sabdariffa* Linn. Valeurs des moyennes des expériences ± déviation standard (SD).

Le GSH

D'après la figure 4, le taux de GSH dans les racines baisse à la 1^{ère} heure (t=0, 8.75 nmol/g; t=1, 2.3 nmol/g). Celui-ci augmente de la 3^{ème} à la 12^{ème} heure et baisse à nouveau jusqu'à la 24^{ème} heure. Le taux de GSH dans les feuilles augmente faiblement (t=0, 7.1 nmol/g; t=24, 7.9 nmol/g) jusqu'à la 24^{ème} heure. Ces résultats montrent qu'à la première heure

d'exposition au Mn, les racines sont sensibles tandis que les feuilles sont tolérantes à ce métal lourd. Celui-ci induit donc la production de composé dit non-protéine-SH (NP- SH) autre que le glutathion total (GSH-GSSH) c'est-à-dire les phytochélatines « PCs » (Ric De Vos, 1991).

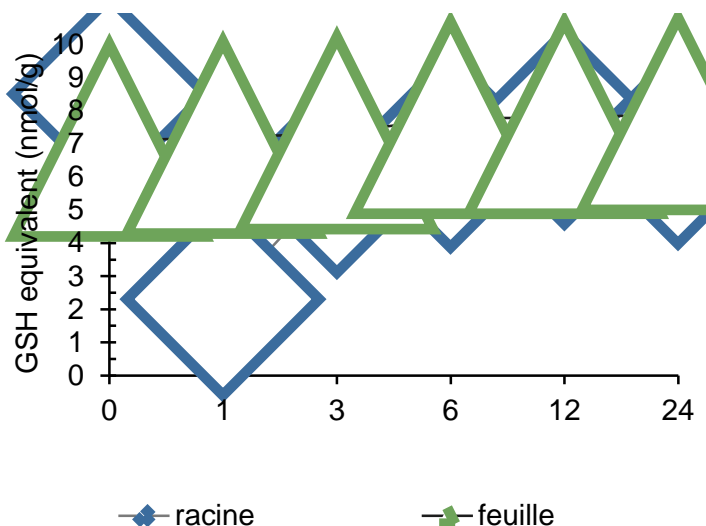


Figure4: Impact du traitement en manganèse sur les changements du contenu en PCs chez l'*Hibiscus sabdariffa* Linn. La barre représente la moyenne des différents paramètres et les valeurs indiquées sont la moyenne \pm écart-type (n = 3). Corrélation du taux de GSH à la concentration en Mn dans les feuilles ($R^2=0,9429$).

Induction des Phytochélatines

Le tableau 4 montre une rapide induction des PCs en l'absence du Mn (à t=0) dans les racines comme dans les feuilles. Vatamaniuk en 2000 affirme qu'à l'absence de métal lourd, la synthèse de PCs pourrait être un mécanisme d'adaptation de la plante pour faire face aux métaux. Les résultats montrent 70% de synthèse de PC2 (PCn) de t=0 à t=24 h contre 30% de PCs de type PCn+1 dans les feuilles, avec cependant une forte induction de PC2 (2 ug/g) et de PC5 (1,83 ug/g) à la 24 ème heure. A contrario dans les racines, à la 24 ème heure, il y'a une induction et une teneur élevée de PCn+1 (n=2, 3, 4, 5). Les PC2 sont abondantes dans les racines et dans les feuilles. Ceci marque l'affinité de la chaîne de PC2 au Mn.

Discussion

Les travaux réalisés montrent que la majeure partie du Mn absorbé est accumulé au niveau des feuilles chez la roselle (*Hibiscus sabdariffa* L. var. *sabdariffa*). Ces résultats sont accord avec ceux de EBA et al, en 2007 et ceux de Yao et al, en 2012. Ces observations permettent de confirmer l'hypothèse selon laquelle les racines de ces plantes ne servent pas d'organe

piège qui s'interpose à l'exportation du Mn vers les parties aériennes (Sbartai, 2012). Les racines de roselle ont une certaine capacité de rétention du Mn, mais celle-ci est temporaire car des quantités importantes de Mn s'accumulent dans les feuilles. Le flux de Mn dans les feuilles s'accorde à la description de Bartlett. Il décrit le Mn comme la clef de la vie à cause de son importance dans la photosynthèse. Le Mn est le lien essentiel dans un grand nombre de processus se produisant dans les organismes humains et animaux (Ondo, 2013). Le taux utilisé en Mn pour ces travaux ne présente pas les symptômes de nécrose manganifère: feuilles panachées de plages gaufrées blanchâtres, marginales ou centrales (Ontod et *al*, 2013). Baker et Brooks en 1989 précisent que certaines espèces de plante peuvent accumuler du Mn dans les racines à de grande quantité sans présenter des signes de toxicité.

Le traitement du Mn sur les pigments photosynthétiques induit des perturbations très marquées sur la chl (a) et sur le caroténoïde. En général, il existe une équivalence entre la chl(a) et le caroténoïde. Cette équivalence est due à la photooxydation de la chlorophylle quand le carotène est déficient. LI Mei en 2007 ajoute qu'une augmentation des caroténoïdes et du ratio chlorophylle/caroténoïde a un effet protecteur car les caroténoïdes sont des potentiels désactivateurs des espèces réactives de l'oxygène (ROS) précisément de l'oxygène singulet. Les SODs attirent les molécules d'O₂ dans leur site chargé positivement d'acides aminés. Le manganèse présent dans ce site donne un électron à O₂ réduisant ainsi une molécule d'O₂. Cette molécule forme à son tour le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) en réagissant avec un proton (Alscher, 2002). La catalase intervient à son tour dans la dégradation de H₂O₂ généré par le Mn.

Les travaux de Fecht-christoffers en 2006 sur la tolérance du Mn dans l'apoplaste des feuilles de niébé sont en accord avec les précédents résultats. Il montre que l'activité du guaicol peroxydase est faible pour la tolérance au Mn mais forte pour la sensibilité de ce dernier. L'auteur pense que cela est due à l'amélioration de la concentration en protéine (protéine non déterminée) dans le liquide de lavage apoplastique. Rama et *al* en 2009 en utilisant le cadmium, présentent un modèle en deux étapes qui illustre la fonction de la PC synthase chez des eucaryotes. A l'étape I de la catalyse de la PC synthase, l'ion Cd²⁺ est indépendant au premier site d'acylation. Celui-ci se fait à Cys56 avec γ -EC qui est transféré au GSH. Puis l'ion Cd²⁺ devient dépendant du second site d'acylation qui se fait dans la région C-terminale. A l'étape II, γ -EC acylés à C56 est transféré au donneur (GSH) ou à PC_n pour générer PC_{n+1}, avec une sortie simultanée de γ -EC acylés en deuxième place. Ces auteurs précisent que dans le cytosol, l'ion Cd²⁺ chélaté à la PCs forme le complexe LMW lequel est transporté dans la vacuole par les transporteurs ABC où il forme le complexe HMW avec l'incorporation des ions sulfides. Le stress oxydatif créé par l'ion Cd²⁺

active la sur-expression de la glutathion reductase (GR) qui réduit le glutathion oxydé (GSSH).

Conclusion

A faible dose, le Mn est un oligoélément indispensable à la vie de la plante. Il exerce un effet toxique quand sa concentration augmente dans la plante. Le niveau d'absorption du Mn n'est pas le même dans les différents organes de la roselle. Le système foliaire absorbe plus de Mn que la partie racinaire. L'effet du traitement en Mn sur les pigments photosynthétiques montre que ceux-ci contrôlent l'effet toxique du Mn chez la roselle. Dans les feuilles et les racines la SOD est très présente alors que la CAT est préférentiellement accumulée dans les feuilles et la GPOX dans les racines. Ce phénomène montre d'une part que la SOD contrôle le stress oxydatif chez la roselle (destruction de l'ion O²⁻) et d'autre part que la CAT et le GPOX sont chargés de la dégradation de H₂O₂. La présence et l'accumulation du Mn dans les feuilles et les racines de la roselle induit la synthèse du GSH et des PCs. Le substrat GSH génère les non-protéines-SH ou PCs. Ces dernières chélatent le Mn. Elles séparent ainsi les excès de Mn du centre métabolique de la plante.

References:

- Y Yao, G Xu, D Mou, J Wang, J Ma. Subcellular Mn compartation, anatomic and biochemical changes of two grape varieties in response to excess manganese. *Chemosphere* 89 (2012) 150-157.
- J.A.Ondo, R M Biyogo, F Eba, P Prudent, D Fotio, M Ollui-Mbouloua, J Omva-Zue. Accumulation of soil-borne aluminium, iron, manganese and zinc in plants cultivated in the region of Moanda (Gabon) and nutritional characteristics of the edible parts harvested. *JSciFoodAgric* (2013).
- H Sbartai, M R Djebar, I Sbartai, H Berrabbah. Bioaccumulation du Cd et du Zn chez les plants de tomates (*Lycopersicon esculentum* L.). *C.R.Biologies* 335 (2012) 585-593.
- R Pal, J. P. N. Rai. Phytochelatins: Peptides Involved in Heavy Metal Detoxification. *Appl Biochem Biotechnol* (2010) 160:945–963.
- B Pourrut, E Béraud, S Prouet, S Cotelle, C Dumat, E Pinelli. Phytochelatin synthesis and antioxidative defense in *Vicia faba* following short-term exposure to lead. *Chemosphere* (2008).
- R G Alscher, N Erturk, L S Heath. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany* (2002), Vol. 53, No. 372.
- R. BÉNAC. Action de la concentration en manganèse de la solution nutritive sur le comportement

de l'arachide (*Arachis hypogaea* L.). Oléagineux, Vol. 31, no 12 - Décembre 1976.

H V SCHELLER, B HUANG, E HATCH, P B. GOLDSBROUGH. Phytochelatin Synthesis and Glutathione Levels in Response to Heavy Metals in Tomato Cells. *Plant Physiol* (1987)85, 1031-1035.

H M. Habermann. Reveal of copper Inhibition in chloroplast Reactions by Manganèse. *Plant Physiol.* (1969) 4, 331-336.

C H Ric De Vos, W, Marjolein, J. Vonk, R Vooijs, Henk Schat. Glutathione Depletion Due to Copper-induced Phytochelatin Synthesis Causes Oxidative Stress in *Silene cucubalus*. *Plant Physiol* (1992) 98 853-858.

M L Mendum, C S Gupta, P B. Goldsbrough. Effect of Glutathione on Phytochelatin Synthesis in Tomato Cells. *Plant Physiol* (1990) 93 484-488.

Ph. Duchaufour, L.-Z. Rousseau. Les phénomènes d'intoxication des plantules de résineux par le manganèse dans les humus forestiers.

L Mei, Z Qin, H Chang-wei, C Li, L Zhi-li, K Zhi-ming. Cobalt and manganese stress in the microalga *Pavlova viridis* (Prymnesiophyceae): Effects on lipid peroxidation and antioxidant enzymes. *Journal of Environmental Sciences* 19(2007) 1330–1335.

M M Fecht-Christoffers, H Fuhrs, H-P Braun, W J Horst. The Role of Hydrogen Peroxide-Producing and Hydrogen Peroxide-Consuming Peroxidases in the Leaf Apoplast of Cowpea in Manganese Tolerance.

RE Wilkinson, Kennethohki.

Influence of Manganese Deficiency and Toxicity on Isoprenoid Syntheses. *Plant Physiol* (1988) 87 841-846.

S C. Gupta, P B Goldsbrough. Phytochelatin Accumulation and Cadmium Tolerance in Selected Tomato Cell Lines. *Plant Physiol* (1991) 97 306-312.

S Lee, J S Moon, T-S Ko, D Petros, P B Goldsbrough, S S Korban. Overexpression of Arabidopsis Phytochelatin Synthase Paradoxically Leads to Hypersensitivity to Cadmium Stress. *Plant Physiology*, February 2003, Vol. 131, pp. 656–663.

Z B Doganlar, S Cakmak, T Yanik. Metal Uptake and Physiological Changes in *Lemna gibba* Exposed to Manganese and Nickel. *International Journal of Biology*; Vol. 4, No. 3; 2012.

Y Lei, K Chen, X Tian, H Korpelainen, C Li. Effect of Mn toxicity on morphological and physiological changes in two *Populus cathayana* populations originating from different habitats. *Trees* (2007) 21:569–580.

M J Mukhopadhyay, A Sharma. Manganese in Cell Metabolism of Higher Plants. *Botanical Review*, Vol. 57, No. 2 (Apr. - Jun., 1991), pp. 117-149.

C S Seth, P K Chaturvedi, V Misra. The role of phytochelatins and antioxidants in tolerance to Cd accumulation in *Brassica juncea* L. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 71 (2008) 76–85.

C.Cobbett, P.Goldsbrough. PHYTOCHELATINS AND METALLOTHIONEINS: Roles in Heavy Metal Detoxification and Homeostasis. *Plant Biol.* 2002. 53:159–82.

F J Alarcon-Aguilar, A Zamilpa, M D Perez-Garcia, J C Almanza-Perez, E Romero-Nunez, E A Campos-Sepulveda, L I Vazquez-Carrillo, R Roman-Ramos. Effect of *Hibiscus sabdariffa* on obesity in MSG mice. *Journal of Ethnopharmacology* 114 (2007) 66–71.