

Induction de biomarqueurs du stress oxydatif associé au stress de NPKs chez *Leucodon sciuroides* (Hedw.) Schwägr

Induction of oxidative stress biomarkers associated to NPKs in Leucodon sciuroides (Hedw.) Schwägr.

Fadila KHALDI^{1,2}, Houria BERREBAH² et Mohamed Réda DJEBAR²

1. Département de Biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Mohamed Cherif Messaadia, Souk-Ahras, BP 1553, 41000, Algérie. *(khaldifad@yahoo.fr)

2. Laboratoire de Toxicologie Cellulaire, Département de Biologie, Faculté des Sciences, Université Badji Mokhtar, Annaba, BP 12, 23000, Algérie.

Résumé. L'objectif de ce travail est l'étude du devenir des fertilisants azotés (NPKs) sur des végétaux inférieurs sélectionnés comme modèles biologiques et de la capacité de ces derniers à s'adapter à la présence de concentrations croissantes de xénobiotique. Notre contribution est fondée sur l'utilisation des végétaux inférieurs (mousses) comme bio-indicateurs de la pollution ainsi que l'étude de leur comportement vis-à-vis de molécules, vraisemblablement inoffensives, mais en même temps controversées comme les NPKs. L'objectif principal est l'étude du pouvoir anti-oxydant de ces végétaux à travers le suivi des bio-marqueurs non enzymatiques (MDA) et enzymatiques (CAT, APX) sous un stress causé par ces engrais. Nos résultats montrent une augmentation dose-dépendante de ces biomarqueurs ; les NPKs provoquent une stimulation de la photosynthèse (3 et 7 jours) et de la respiration (3 jours). Cependant, une inhibition de ce dernier métabolisme a été constatée pendant le traitement de 7 jours.

Mots-clés : *Leucodon sciuroides* (Hedw.) Schwägr., Malondialdéhyde, Ascorbate-peroxydase, Catalase; NPKs ; stress oxydatif.

Abstract. This work aims to study the fate of nitrogen fertilizer (NPKs) on living organisms (lower plants) that were selected as biological models and the ability of these plants to adapt to the presence of increasing concentrations of xenobiotics. Our contribution is based on the use of lower plants (mosses) as bioindicators of pollution and study their behavior with molecules probably harmless but at the same time controversial, such as NPKs. The main objective is the study of the antioxidant power of these plants through monitoring biomarkers non-enzymatic (MDA) and enzymatic (CAT, APX) under a stress caused by this fertilizer. Our results show a dose-dependent increase of these biomarkers ; the NPKs causes a stimulation of photosynthesis (3 and 7 days) and respiration (3 days). However, an inhibition of this metabolism was observed during the 7 days treatment.

Keywords : *Leucodon sciuroides* (Hedw.) Schwägr., Malondialdehyde, ascorbate-peroxidase, catalase, NPKs, oxidative stress.

Abridged English version

Introduction

Bryophytes are particularly well suited for the study of metal and organic pollutants (Bargali 1998). They owe this efficiency to their anatomical peculiarities (high surface / volume ratio or surface area / mass, no waxy cuticle, conductive vessels and true root system, easy to identify annual growth) and their physiological characteristics (photosynthetic activity continues throughout the year). They will therefore be subject to the effects of pollutants in both dry and wet deposition. Unlike lichens, they are much less used as bio-indicators or bio-integrators gaseous air pollution, although many studies show their sensitivity to these pollutants (SO₂, NO_x, O₃, F....) (Bargali 1998).

Material

Our used chemical is a NPK (nitrogen-phosphate-potassium-sulfate) NPKs (NP₂O₅K₂O) (15, 15, 15), greyish and granulated presentation, soluble in water. It comes from the fertilizer company of Algeria "FERTIAL". It's dissolved in distilled water at concentrations of 10, 20, 30, 40 and 50 mM (Khalidi *et al.* 2009). Samples of *Leucodon sciuroides* were collected from the Seraidi area, located at 850 m altitude (Annaba, Eastern Algeria). The choice was focused on this region because it's considered unpolluted.

Methods

Lipid peroxidation was estimated by changing the content of Malondialdehyde (MDA) determined according to the method described by Alia *et al.* (1995). The catalase activity (CAT) is performed according to the method of Cakmak & Horst (1991). The ascorbate peroxidase activity (APX) is performed according to the protocol adopted by Nakano & Azada (1987).

Study of respiratory metabolism and photosynthetic

The apparatus used was an oxygen electrode, of HANSATECH-Type, which enables measurement of the production or consumption of oxygen (Djebbar 1989).

Statistical study

Statistical analysis of data was performed by Student's "t" test which compares the average of two populations using data from two independent samples, carried out using a software for data analysis: Minitab (Version 16.0) (Dagnelie 1991). Results are expressed as mean ± standard deviation (n = 3), the differences are considered to be significant for p < 0.05.

Discussion

Bioaccumulation of pollutants in some plant species is an indicator of exposure. The effects of these pollutant

indicators can also be measured; they can be defined, particularly in the form of various biochemical or physiological parameters (biomarkers). On plants, outcome indicators have focused on physiological responses to pollution: germination, growth and photosynthesis. They are often based on enzymatic systems to degrade the xenobiotics (pollutants, pesticides and fertilizers); the most important being the oxidative cytochrome P450 system (Khaldi 2013).

To confirm the state of stress generated in mosses, a biomarker of non-enzymatic lipid peroxidation was assayed Malondialdehyde (MDA), which is an expression of lipid peroxidation (Ben Youssef *et al.* 2002). Using this compound as a biomarker of oxidative stress in general, and especially lipid peroxidation, is widely spread. MDA is a product of lipid peroxidation that forms during the attack of polyunsaturated lipids by reactive oxygen species generated under conditions of stress, especially with organic contaminants (pesticides) and inorganic (fertilizers, metals and metalloids). Thus, the formed hydroperoxides decay into radical intermediates and into aldehydes, where the Malondialdehyde is the most reactive representative among them. The dosage of this compound is therefore of some interest in plants subjected to contamination (Alia *et al.* 1995).

Our results show that the MDA content increases with the addition of the test environment (NPK). Indeed, the content of these substances is the highest with two treatments (3 and 7 days) in presence of NPKs. MDA level cultured in the presence of different concentrations of NPKs and the test shows that in the latter, the sample accumulates less of these substances, unlike the treated samples accumulating many of these substances indicating strong membrane lipid peroxidation. This strong peroxidation is due to a high O_2 -dismutation, an active? of oxygen. The decrease in lipid peroxidation in the tests due to the absence of NPK is resulted to a decrease in oxidative effects of EAOx (reactive oxygen species). This is evidence that the plant has benefited from NPKs to avoid or reduce the damage caused by the accumulation of EAOx. This confirms the genesis of a state of oxidative stress in moss, processed by the NPKs. Indeed, the fertilizer can cause membrane lipid peroxidation by catalyzing the formation of free radicals or reactive oxygen species (1O_2 , O_2^- , OH, H_2O_2 , HOO \cdot). Which attack the unsaturated lipids leading to the release of hydroperoxides (RO \cdot , ROO, RCOO) very harmful to cellular components (Thompson *et al.* 1987, De Vos *et al.* 1993, Weckx & Clijsters 1996). To explain these favorable development forms physiological differences, we hypothesized that they were related to oxidative stress and we analyzed the activity of some antioxidant enzymes in relation to the amount NPKs added to the culture medium. Plant cells are able to protect their lives through the use of enzymatic mechanisms: SOD (Superoxyde-Dismutase), CAT (catalase), APX (Ascorbat Peroxidases) and non-enzymatic via ascorbat glutathione cycle (Call & Hirt 2004). The assumption Modenesi (1993) explains the relationship between oxidative stress and the activity of the peroxidase acrobat in plants, by increasing the activity as first line of defense (Loews 1988).

In our work, we find that the activities of both enzymes

(CAT and APX) increased in a dose-dependent (treatment 3 and 7 days). This could be explained by the fact that at low concentrations of NPKs, there trigger detoxification systems which mostly consist of mainly enzymes "catalase". This allows the plant to tolerate and adapt to xenobiotic thus resulting in increased activity of these enzymes, which can be explained by the fact that detoxification systems are sensitive to the highest concentrations of NPKs. These results agree with those obtained by Dazy *et al.* (2009) where they were exposed for 2 and 7 days, aquatic moss *Fontinalis antipyretica* for five different concentrations of heavy metals (Cu and Zn). The results show maximum activities of CAT and APX with high concentrations.

The increase in APX activity under oxidative stress caused by fertilizer (NPKs) shows its role in the removal of oxygen peroxide (H_2O_2) formed due to the accumulation of atoms NPKs in thalli plant species studied. The APX reduced (H_2O_2) into water (H_2O) using ascorbate as an electron donor of the resulting dehydroascorbate. It is recycled ascorbat using GSH as the electron donor and the oxidized glutathione (GSSG) is converted to GSH by the NADPH-dependent enzyme glutathione reductase (GR) (Kampfenkel *et al.* 1995). Our results are comparable those obtained by Wick & Clysters (1996); Petra & Panda (1998); Prasad *et al.* (1999); Rucińska *et al.* (1999) and Gallego *et al.* (2002). The increase in the activity of this enzyme reflects the establishment, in cells treated plants, a state of stress. Knowing that detoxification mechanisms and/or metabolism of xenobiotics involve enzyme systems using oxygen molecules for their activity as monoxygenases, oxidases and superoxide dismutase (Fournier 1993, Pelmont 1995). We found useful to ask the following question : What is the impact of this molecule (NPKs) on the respiratory and photosynthetic metabolism of our biological models (mosses)?. To answer this question, we used the polarography technique that can help us achieve our goal.

Our results are quite revealing thus the NPKs causes stimulation of photosynthesis in foams, and for the two treatments (3 and 7 days), that is an excessive production of oxygen in the culture medium. While inhibition of respiratory metabolism was observed during the 7 days of treatment, after a marked stimulation of the metabolism during the first treatment (3 days). Our results are in good agreement with our previous work (Khaldi 2013) where we showed a stimulation of photosynthesis and respiration inhibition from these plants. But in higher plants one of the defense mechanisms against air pollution is indeed a decrease in respiratory and photosynthetic activity.

Conclusion

Our study confirms the sensitivity of moss to pollutants, but also highlights the fact that they are also very dependent in this case on the nature of the particular substrate (NPKs). All nitrogen imbalances may make the plant a nutritional stress situation responsible for changes in the internal hormonal balance. Plant metabolism, growth and development may be affected by the genesis of active forms of oxygen (FAOx) (active forms of oxygen) such as superoxide ion O_2^- , the singular form of oxygen O_2^- , hydrogen peroxide (H_2O_2) or the radical-OH hydroxides.

The accumulation of cellular components FAOx alters, thereby causing either a direct inhibition of the enzymes or of oxidative DNA damage and oxidation reactions of RNA or proteins of membrane lipid peroxidation have also been

reported. To cope with the damage, the plant can use its antioxidant defense enzyme system types (SOD, CAT, APX, etc.) and non-enzymatic (MDA, GSH, carotenoids, flavonoids, etc.).

INTRODUCTION

L'industrie produit une multitude de substances non biodégradables sinon indestructibles qui s'accumulent dans l'atmosphère, l'hydrosphère et la lithosphère, perturbant ainsi le fonctionnement de la plupart des écosystèmes. Cette accumulation incessante de résidus des plus variés présente à long terme, de redoutables conséquences sur le plan écologique (Ramade 1995). Aujourd'hui, en Algérie, lorsqu'on s'intéresse à l'environnement ce n'est que pour constater l'état de dégradation avancé dans lequel l'ont précipité nos unités industrielles implantées de manière anarchique dans des zones agricoles ou à forte densité de population. Le rejet de substances d'origine naturelle ou artificielle constitue l'un des plus importants facteurs de dégradation de la biosphère par l'homme. Les premières actions néfastes de celui-ci sur son environnement ont commencé à apparaître lorsque ses activités d'agriculteur et/ou d'éleveur ont modifié les écosystèmes naturels (Lagadic *et al.* 1998).

L'utilisation des engrais pour augmenter les rendements des cultures a récemment été l'objet de préoccupations environnementales. En effet, l'apport d'engrais azoté d'origine industrielle est indispensable pour assurer une production agricole suffisante pour nourrir l'humanité. Excepté les légumineuses, qui sont capables de fixer l'azote moléculaire de l'air, la plupart des plantes d'intérêt agronomique absorbent et assimilent l'azote présent dans le sol ; mais un épandage excessif d'engrais azoté risque de provoquer de graves troubles au sein de l'environnement. L'utilisation optimale des engrais azotés est une importante préoccupation pour assurer conjointement un rendement agronomique raisonnable du point de vue économique et une pollution minimale pour l'environnement. La pollution de l'environnement par l'azote est devenue une préoccupation majeure en agriculture (Bouwer 1990), et en santé publique (Ellen *et al.* 1982). C'est dans ce sens que nous nous sommes intéressés aux NPKs (engrais azoté largement utilisé en agriculture dans notre région – Annaba (Nord-est algérien)- et fabriqué localement par l'entreprise des fertilisants d'Algérie « FERTIAL »). L'utilisation de bioindicateurs végétaux dans le suivi de la pollution par les métaux lourds a déjà fait l'objet de plusieurs travaux (Martinon 1991). Cependant, peu d'études traitent de l'impact d'autres types de pollution : engrais, pesticides (Khaldi *et al.* 2009).

Les bryophytes sont des organismes particulièrement bien adaptés pour l'étude des polluants atmosphériques métalliques et organiques (Bargali 1998). Elles doivent cette efficacité à leurs particularités anatomiques (rapport élevé surface/volume ou surface/masse, absence de cuticule cireuse, de vaisseaux conducteurs et de vrai système racinaire, ainsi qu'une facilité de repérer les croissances annuelles) et leurs caractéristiques physiologiques (activité photosynthétique continue tout au long de l'année). Elles seront, de ce fait, soumises aux retombées des polluants

présents à la fois dans les dépôts secs et dans les dépôts humides. Contrairement aux lichens, elles seront beaucoup moins utilisées comme bio-indicateurs ou bio-intégrateurs de la pollution atmosphérique gazeuse bien que de nombreuses études démontrent leur grande sensibilité à ces différents polluants (SO₂, NO_x, O₃, F....) (Bargali 1998).

MATERIEL ET METHODES

Matériel chimique

Notre matériel chimique est un engrais ternaire : azoté-phosphaté-potassique-sulfaté : NPKs (NP₂O₅K₂O) (15, 15, 15), de couleur grisâtre et de présentation granulé, soluble dans l'eau. Il provient de la société des fertilisants d'Algérie « FERTIAL », il est dissout dans de l'eau distillé à des concentrations de 10, 20, 30, 40 et 50 mM (Khaldi *et al.* 2009).

Méthode d'échantillonnage

Les échantillons de *Leucodon sciuroides* ont été prélevés dans la région de Séraïdi, situé à 850 m au-dessus de la mer (Annaba, Nord-Est algérien). Le choix a été porté sur cette région car elle est considérée comme non polluée.

Test de cytotoxicité

Les solutions préparées avec les différentes concentrations de NPKs sont utilisés pour l'imbibition des échantillons de *Leucodon sciuroides*. Environ 4 g de thalle de mousse a été trempée dans 400 ml de solution au cours de deux périodes de traitement (3 et 7 jours) (Bensoltane *et al.* 2005).

Dosage de Malondialdéhyde

La peroxydation des lipides est estimée par l'évolution de la teneur en Malondialdéhyde (MDA) déterminée selon la méthode décrite par Alia *et al.* (1995), qui consiste en une homogénéisation du tissu végétal dans l'acide trichloroacétique (TCA) à 5 %. La concentration de MDA est calculée en utilisant son coefficient d'extinction molaire $\epsilon = 155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Dosage enzymatique

L'activité catalase (CAT) est réalisée suivant la méthode de Cakmak & Horst (1991). La décroissance de l'absorbance est enregistrée par un spectrophotomètre (JENWAY 6300) pour une longueur d'onde de 240 nm et un coefficient d'extinction molaire $\epsilon = 39400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Concernant l'activité ascorbate-peroxydase (APX), elle est réalisée suivant le protocole adopté par Nakano & Azada (1987). La lecture est effectuée à 290 nm (Spectrophotomètre JENWAY 63000) pendant 1 minute et ce pour un coefficient d'extinction molaire $\epsilon = 2800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Etude du métabolisme respiratoire et photosynthétique

L'appareil utilisé est une électrode à oxygène, de type HANSATECH, qui permet la mesure de la production ou de la

consommation d'oxygène. L'appareil comprend une cathode polarisée (-) en platine et une anode polarisée (+) circulaire en argent. Le contact entre les deux électrodes est établi par un pont de solution saturée de KCl. La suspension cellulaire est constamment remuée par un agitateur magnétique. L'application d'une faible tension électrique va provoquer la réduction électrolytique de l'oxygène présent dans la solution. Le courant qui traverse le circuit des deux électrodes quand la tension appliquée est en moyenne de 0,7mV, varie linéairement en fonction de la concentration en oxygène dissout dans la suspension cellulaire selon la réaction : $\frac{1}{2} O_2 + 2e^- \rightarrow O^{2-}$.

La jaquette est maintenue à une température constante de 25°C. Cet appareil est relié à un ordinateur sur lequel les spectres apparaissent et sont ensuite enregistrés sur une imprimante de type Epson-LQ 1027 (Djebar & Djebar 2000). L'intensité photosynthétique des échantillons isolés est mesurée en les séparant de toute source lumineuse par un épais filtré noir afin d'accélérer le processus métabolique et permettre aussi l'activité photosynthétique (Djebar 1989).

Etude statistique

L'analyse statistique des données a été effectuée par le test "t" de Student qui consiste à comparer les moyennes de 2 populations à l'aide des données de deux échantillons indépendants. Elle a été réalisée à l'aide du logiciel Minitab, version 16.0 (Dagnelie 1991). Les résultats sont exprimés par la moyenne \pm écart type (n = 3), les différences sont considérées significatives pour $p < 0,05$.

RESULTATS

Variations du taux MDA

La figure 1 met en évidence les variations du taux de MDA chez *Leucodon sciuroides*. Nous constatons que ce taux est toujours supérieur à celui des témoins, particulièrement pour les concentrations 40 mM (3j) et 50 mM (7j). L'analyse statistique révèle une différence hautement significative pour la concentration 10 mM ($P \leq 0,01$; 3j) et aucune différence significative entre le taux de MDA chez les témoins et ceux traités par la concentration 10 mM ($P \geq 0,05$; 7j). Cependant, des différences très hautement significatives ont été révélées entre les traités par les concentrations (20, 30, 40 et 50 mM) et les témoins ($P \leq 0,001$).

Effet des concentrations croissantes de NPKs sur les activités APX et CAT

La figure 2A montre que l'activité APX augmente de manière dose-dépendante et ce par rapport aux témoins. Nous constatons que les activités APx sont élevées pendant le traitement 7 jours et ce pour les plus fortes concentrations (30, 40 et 50 mM). L'analyse statistique révèle une différence hautement significative entre les traités par les concentrations (20 mM- 3 jours) et (30 mM- 7 jours) et les témoins avec ($P \leq 0,01$), et des différences très hautement significatives entre les témoins et les traités par les concentrations (10, 30, 40 et 50 mM - 3jours) avec ($P \leq 0,001$). Tandis que, des différences significatives ont été révélées pour les mêmes concentrations avec ($P \leq 0,05$) (traitement 7jours).

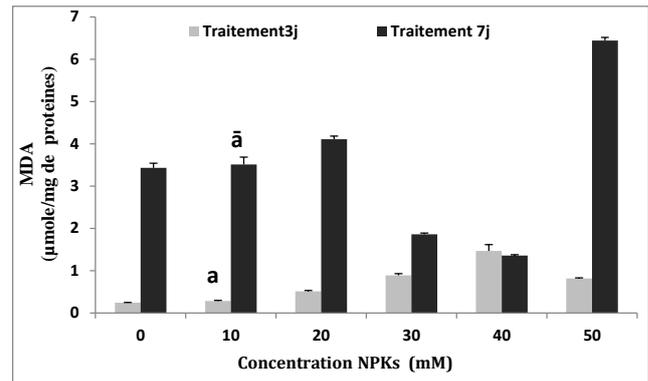


Figure 1. Teneur en Malondialdéhyde de *Leucodon sciuroides* cultivée dans un milieu supplémenté avec différentes concentrations de NPKs. (a) est une différence très significative ($P \leq 0,01$), (ā) est une différence non significative ($p \geq 0,05$). Les lignes verticales au-dessus des barres représentent l'écart-type des valeurs moyennes.

Figure 1. Malondialdehyde content of *Leucodon sciuroides* raised in medium supplemented with various concentration of fertilizer NPKs. (a) is very significantly different at ($P \leq 0,01$), (ā) is not significantly different at ($p \geq 0,05$) Vertical lines above bars represent the standard error of the mean values.

La figure 2B illustre l'effet des différentes concentrations de NPKs sur l'activité CAT des mousses. Cette activité tend à augmenter en fonction des concentrations de NPKs. Concernant le traitement de 3 jours, des différences très hautement significatives ont été révélées entre l'activité catalase chez les témoins et les traités par les concentrations (20, 30, 40 et 50 mM) ($p \leq 0,001$). Tandis qu'une différence significative a été constatée pour les traités par la concentration (10mM) ($P \leq 0,05$). Pour l'autre traitement (7j), l'analyse statistique révèle une différence significative entre les traités par la concentration (40 mM) et les témoins ($P \leq 0,05$), et des différences hautement significatives entre les témoins et les traités par les concentrations (30 et 50 mM) ($P \leq 0,01$). Cependant, cette analyse ne révèle aucune différence entre les témoins et les traités par les concentrations (10 et 20 mM) ($P \geq 0,05$).

Effet des différentes concentrations de NPKs sur le métabolisme photosynthétique

La figure 4 illustre l'effet des différentes concentrations de NPKs sur le métabolisme photosynthétique des mousses où on remarque une libération d' O_2 dans le milieu pour les échantillons témoins ainsi que pour les échantillons traités avec les 5 concentrations choisies. Pendant le traitement de 3 jours, on observe une nette augmentation de la quantité d' O_2 produite dans le milieu dès la 4^{ème} minute d'enregistrement pour les échantillons témoins. Le minimum de cette quantité a été enregistré au temps (10 min) pour l'échantillon traité avec la concentration 30 mM, qui atteint : 10 nmole d' O_2 /100 mg de PF. Tandis que l'échantillon traité avec la concentration 50mM présente la quantité produite la plus élevée jusqu'au temps (10 min), soit : 6.5 nmole d' O_2 /100 mg de PF (traitement 7jours). Concernant les échantillons traités avec les autres concentrations (3 et 7 j) (10, 30, 40 et 50 mM), présentent des quantités d'oxygène produites supérieures à celles du témoin d'où une stimulation de la photosynthèse. L'analyse statistique a révélé des différences très hautement significatives entre la photosynthèse des échantillons témoins et traités (3 et 7 j) ($p < 0,001$).

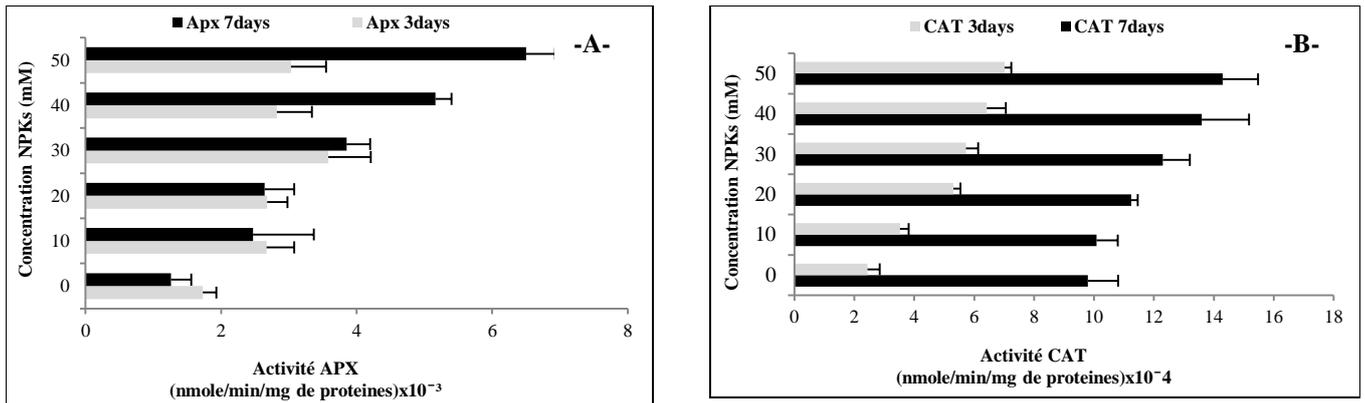


Figure 2. L'activité Ascorbate peroxydase et Catalase de *Leucodon sciurioides* cultivés dans un milieu supplémenté avec différentes concentrations de NPKs. Les lignes verticales au-dessus des barres représentent l'écart-type des valeurs moyennes

Figure 2. Ascorbate-peroxydase and catalase activity of *Leucodon sciurioides* raised in medium supplemented with various concentration of fertilizer NPKs. Vertical lines above bars represent the standard error of the mean values

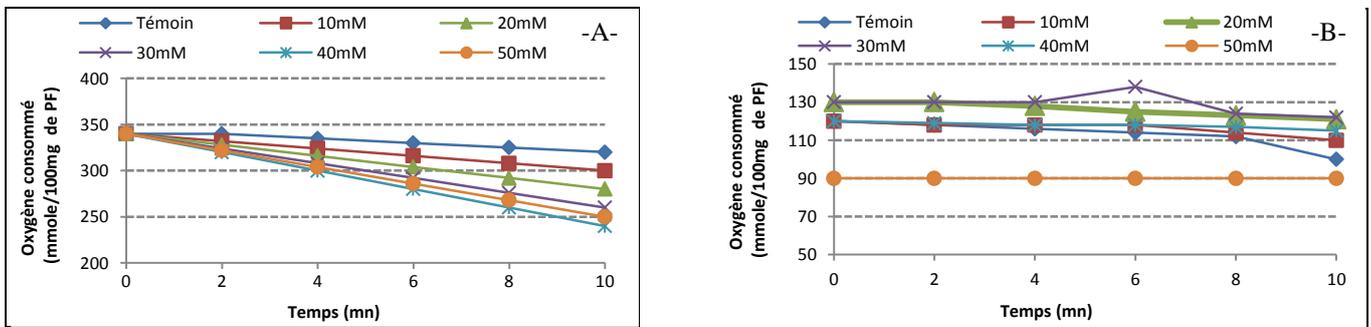


Figure 3. Effet NPKs sur le métabolisme respiratoire chez *Leucodon sciurioides*. A. Traitement 3 jours, B. Traitement 7 jours, PF. poids frais.

Figure 3. NPKs effect on the respiratory metabolism in *Leucodon sciurioides*. A. treatment 3 days, B. Treatment 7 days, PF=FW. Fresh Weight.

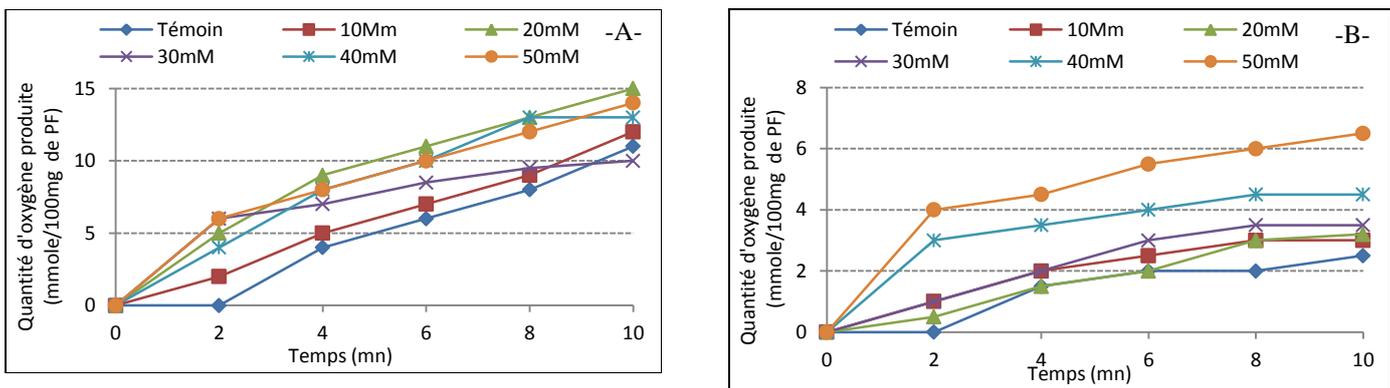


Figure 4. Effet NPKs sur le métabolisme photosynthétique chez *Leucodon sciurioides*. A. Traitement 3 jours, B. Traitement 7 jours, PF. poids frais.

Figure 4. NPKs effect on the photosynthetic metabolism in *Leucodon sciurioides*. A. 3 days treatment, B. treatment 7days, PF. Fresh Weight.

DISCUSSION

La bioaccumulation de certains polluants dans les espèces végétales est un indicateur d'exposition. Des indicateurs d'effets de ces polluants peuvent également être mesurés, ils peuvent être plus définis, notamment sous la forme de divers paramètres biochimiques ou physiologiques (bio-marqueurs). Sur les végétaux, les indicateurs d'effets ont porté sur les réponses physiologiques aux pollutions : germination, croissance et photosynthèse. Ils sont le plus souvent basés sur des systèmes enzymatiques permettant de dégrader les xénobiotiques (polluants, pesticides et engrais) ; le plus important étant le système oxydatif des cytochromes P450 (Khaldi 2013).

Pour confirmer l'état de stress généré chez les mousses, un biomarqueur non enzymatique de la peroxydation des lipides a été dosé, le Malondialdéhyde (MDA) qui est une expression de la lipoperoxydation (Ben Youssef *et al.* 2002). L'utilisation de ce composé comme biomarqueur de stress oxydatif en général, et en peroxydation lipidique en particulier, est largement répandu.

Le MDA est un produit des réactions de peroxydation lipidique qui se forme lors de l'attaque des lipides polyinsaturés par des espèces réactives de l'oxygène générés dans des conditions de stress, en particulier avec contaminants organiques (pesticides) et inorganiques (engrais, métaux et métalloïdes). Les hydroperoxydes ainsi formés se décomposent en intermédiaires radicalaires et en aldéhydes dont un des représentants les plus réactifs est le Malonedialdéhyde. Le MDA est un agent alkylant puissant capable de réagir avec les macromolécules biologiques. Le dosage de ce composé présente donc un intérêt certain chez les végétaux soumis à des contaminations (Alia *et al.* 1995).

Nos résultats indiquent que la teneur en MDA augmente avec l'addition de NPKs dans le milieu témoin. En effet, le contenu des Mousses en ces substances est le plus élevé avec les deux traitements (3 et 7 jours) en présence de NPKs. Le dosage des substances de MDA, au niveau des mousses cultivées en présence de différentes concentrations en NPKs et du témoin montre que, sur ce dernier, l'échantillon accumule moins de ces substances, contrairement aux échantillons traités accumulant beaucoup de ces substances dénotant une forte peroxydation des lipides membranaires. Cette forte peroxydation est due à une grande dismutation des O_2^- , une des formes actives de l'oxygène. La diminution de la peroxydation des lipides chez les témoins suite à l'absence de NPKs est traduite par une diminution des effets oxydatifs des EAOx (espèces réactives de l'oxygène). Ceci constitue une preuve que la plante a bien profité du NPKs pour éviter ou réduire les dégâts occasionnés par l'accumulation des EAOx. Ceci confirme bien la genèse d'un état de stress oxydatif au niveau des thalles des mousses traitées par le NPKs. En effet, l'engrais peut entraîner la peroxydation des lipides membranaires en catalysant la formation de radicaux libres ou espèces oxygénées réactives (1O_2 , O_2 , OH, H_2O_2 , HOO) lesquels s'attaquent aux lipides insaturés conduisant à la libération d'hydroperoxydes (RO \cdot , ROO \cdot , RCOO \cdot) très nocifs pour les constituants cellulaires (Thompson *et al.* 1987, De Vos *et al.* 1993, Weckx & Clijsters 1996).

Afin d'expliquer ces différences physiologiques

favorables au développement des mousses, nous avons émis l'hypothèse qu'elles étaient liées au stress oxydatif et nous avons procédé à l'analyse de l'activité de certaines enzymes anti-oxydantes en rapport avec la quantité de NPKs ajoutée au milieu de culture. Les cellules végétales sont capables de protéger leur vie par l'utilisation des mécanismes enzymatiques: SOD (Superoxyde-Dismutase), CAT (Catalase), APX (Ascorbate Peroxydases) et non enzymatiques via le cycle ascorbat-glutathion (Appel & Hirt 2004). L'hypothèse de Modenesi (1993), explique la relation entre le stress oxydatif et l'activité de l'ascorbat-peroxydase chez les végétaux, par l'augmentation de cette activité comme premier moyen de défense (Keller 1977, Loewus 1988).

Les peroxydases sont des hémoprotéines avec un groupement prosthétique héminique : la ferro proto porphyrine IX, 3 (Bergmeyer 1974, Farago 1994). Ce sont des oxydo-réductases glycoprotéiques qui catalysent l'oxydation des nombreux composés organiques et inorganiques par le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). L'activité APX, enzyme très important dans le système de défense, induit une réponse aux différentes concentrations de NPKs chez les mousses et pendant les deux traitements (3 et 7 jours). L'APX protège la cellule contre les dommages oxydatives par l'élimination d' H_2O_2 toxique, libéré au niveau des chloroplastes, cytosol, mitochondries et peroxysomes des cellules végétales (Mittler *et al.* 2004). La catalase qui est localisé essentiellement dans les peroxysomes et les mitochondries, participe aussi à la dégradation de H_2O_2 généré par la présence en excès de xénobiotiques dans l'environnement de la plante (Farago 1994).

Dans notre travail, on constate que les activités des deux enzymes (CAT et APX) augmentent de façon dose-dépendante, (traitement 3 et 7 jours). Ceci pourrait s'expliquer par le fait qu'aux faibles concentrations de NPKs, il ya déclenchement des systèmes de détoxification qui pour la plupart sont formés d'enzymes dont principalement la catalase. Ceci permet ainsi à la plante de tolérer puis de s'adapter au xénobiotique se traduisant ainsi par une augmentation des activités de ces enzymes, ce qui peut s'expliquer par le fait que les systèmes de détoxification restent sensibles jusqu'aux plus fortes concentrations de NPKs. Ces résultats concordent avec ceux obtenus par Dazy *et al.* (2009) où ils ont exposé, pendant 2 et 7 jours, une mousse aquatique *Fontinalis antipyretica* à cinq différentes concentrations des métaux lourds (Cu et Zn). Ces résultats montrent des activités maximales de CAT et APX avec de fortes concentrations.

L'augmentation de l'activité APX sous stress oxydatif engendré par l'engrais (NPKs), montre bien son rôle dans l'élimination de l'eau oxygéné (H_2O_2) formé suite à l'accumulation des atomes du NPKs dans les thalles des espèces végétales étudiées. L'APX réduit (H_2O_2) en eau (H_2O) en utilisant l'ascorbate comme donneur d'électrons qui résulte de la déshydroascorbate. Il est recyclé en ascorbat qui utilise la GSH comme donneur d'électrons et le glutathion oxydé (GSSG) est converti en GSH par NADPH qui dépend de l'enzyme glutathion réductase (GR) (Kampfenkel *et al.* 1995). Nos résultats sont comparables à ceux obtenus par Weckx & Clijsters (1996); Patra &

Panda (1998); Prasad *et al.* (1999) ; Rucinska *et al.* (1999) et Gallego *et al.* (2002). L'augmentation de l'activité de cette enzyme traduit bien la mise en place, chez les cellules des végétaux traités, un état de stress. Sachant que les mécanismes de détoxification et/ou métabolisation des xénobiotiques mettent en jeu des systèmes enzymatiques utilisant des molécules d'oxygène pour leur activité comme les mono-oxygénases, les oxydases et superoxyde-dismutase (Fournier 1993, Pelmont 1995). Nous avons jugé utile de nous poser la question suivante : quel est l'impact de cette molécule (NPKs) sur les métabolismes respiratoire et photosynthétique de nos modèles biologiques (mousses) ? Pour répondre à cette question, nous avons utilisé la polarographie, technique pouvant nous permettre d'atteindre notre objectif.

Nos résultats sont assez révélateurs, ainsi, le NPKs provoque une stimulation de la photosynthèse chez les mousses et pendant les deux traitements (3 et 7 jours), autrement dit une production excessive d'oxygène dans le milieu de culture. Tandis qu'une inhibition du métabolisme respiratoire a été constatée pendant le traitement de 7 jours, après une nette stimulation de ce métabolisme pendant le premier traitement (3 jours). Nos résultats sont en parfait accord avec nos travaux précédents (Khalidi 2013) où on a mis en évidence une stimulation de la photosynthèse et une inhibition de la respiration chez ces végétaux. Or, chez les végétaux supérieurs l'un des mécanismes de défense contre une pollution atmosphérique c'est en effet une diminution de l'activité respiratoire et photosynthétique.

CONCLUSION

Notre étude confirme la sensibilité des mousses aux polluants, mais souligne aussi le fait qu'ils sont également très dépendants dans le cas présent de la nature du substrat en particulier (NPKs). Tout déséquilibre d'azote peut soumettre la plante à une situation de stress nutritionnel responsable de changements de la balance hormonale interne. Le métabolisme des végétaux, leur croissance et leur développement peuvent être affectés par la genèse de formes actives de l'oxygène (FAOx) telles que l'ion superoxyde O_2^- , la forme singulière de l'oxygène O_2^- , le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou les radicaux hydroxydes OH^- . L'accumulation des FAOx altère les composants cellulaires, provoquant ainsi soit une inhibition directe des enzymes, soit des réactions d'oxydation des protéines ou de peroxydation des lipides membranaires. Des dommages oxydatifs de l'ADN et de l'ARN ont également été signalés. Pour faire face à ces dommages, la plante peut utiliser ses systèmes de défense anti-oxydante de type enzymatique (SOD, CAT, APX, etc.) et non enzymatique (MDA, GSH, caroténoïdes, flavonoïdes, etc.).

REFERENCES

Alia Prasad K.V.S.K & Pardha Saradhi P. 1995. Effect of zinc on free radical and proline in *Brassica juncea* and *Cajanus cajan*. *Phytochemistry*, 39, 45-47.

Appel K. & Hirt H. 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Ann. Rev. Plant Biol.*, 55, 373-399.

Bargali R. 1998. Mosses as passive and active monitors of trace elements. In Bargali R. *Trace elements in terrestrial plants. An*

ecophysiological approach to biomonitoring and biorecovery. Springer, Berlin, 207-236.

Bensoltane S., Khalidi F., Djebbar H. & Djebbar M. R. 2005. Toxicity of the ammonium nitrate NH_4NO_3 on the respiratory metabolism of three biological models : *parmeciums*, mousses and lichens. *Comm. Appl. Biol. Sci.* Ghent University, 70, 4, 1043-1051.

Ben youssef N., Ben Temime S. D., Daoud Ben Miled D., Zarrouk M., Chérif A. & Ghorbal M. H. 2002. Lipid biosynthesis and peroxidation under cadmium stress in *Brassic napus* L. *Proceedings of International Symposium on Environmental Pollution Control and Waste Management*, 7-10 January, Tunis, 59-68.

Bergmeyer U. 1974. *Methods of enzymatic analysis* Ed. Verlag. Chimie G mb H. Weinkein. 1,494-495 et 684-690.

Bouwer H. 1990. Agricultural chemicals and groundwater quality. *Journal of Soil and Water Conservation*, 45, 2, 184-189.

Cakmak I. & Horst W. J. 1991. Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase and peroxidase activities in root tips of soybean (glycine max). *Physiol. Plant*, 83, 463-468.

Dazy M., Masfarau J. F. & Féraud J. F. 2009. Induction of oxidative stress biomarkers associated with heavy metal stress in *Fontinalis antipyretica* Hedw. Elsevier, *Chemosphere*, 75, 297-302.

Dagnelie P. 1999. *Statistiques théoriques et appliquées. T. 2, références statistiques à une et à deux dimensions*. Bruxelles, Univ. de Boeck et Larcier. 659 p.

De Vos C. H. R. Bookum V. M. T., Vooijs R., Schat H. & De Kok L. J. 1993. Effect of copper on fatty acid composition and peroxidation of lipids in roots of copper tolerant and sensitive *Silene cucubalus*. *Plant. Physiol. Biochem*, 31, 2, 151-158.

Djebbar M. R. & Djebbar H. 2000. *Bioénergétique, les mitochondries végétales. Synthèse*. Publications de l'université d'Annaba, 103 p.

Djebbar M.R. 1989. *Compte rendu de l'Académie des sciences*. Paris III, 60 p.

Ellen G., Schuller P. L., Froeling P.G. & Bruijns E. 1982. N-nitrosamines detected in blood and urine from patients ingesting daily large amounts of ammonium nitrate. *Food Chem. Toxicol.*, 20, 6, 879-82.

Farago E. M. 1994. *Plant and Chemical Elements : Biochemistry, Uptake, Tolerance and Toxicity*. Ed. V CH32-231, 200-210.

Fournier E. 1993. *Toxicologie*. Ed. Ellypses, 326-333.

Gallego S. M., Benavides M. P. & Tomaro M. L. 2002. Involvement of antioxidant defense system in the adaptive response to heavy metal ions in *Helianthus annuus* L. cells. *Plant Growth Regul.*, 36, 267-273.

Kampfenkel K., Van Montagu M. & Inze D. 1995. Effects on iron excess on *Nicotiana plumbaginifolia* plants. *Plant Physiol.*, 107, 725-735.

Keller A. A., 1977. Schwager H. Air pollution and ascorbic acid. *European Journal of Forest Pathology*, 7, 338-350.

Khalidi F. 2013. *Mécanismes d'action des polluants chimiques industriels (Engrais et NOx) sur des bioindicateurs de pollution (mousses et lichens)*. Thèse de Doctorat. Université Badji Mokhtar, Annaba. 198 p.

Khalidi F., Rouabhi R., Berrebah H. & Djebbar M. R. 2009. Cellular Response of a Pollution Bioindicator Model (*Ramalina farinacea*) Following Treatment with Fertilizer (NPKs). *Americ-Euras Jour of Toxicol Science*, 1, 2, 69-73.

Lagadic L., Caquet T., Amiard J. C. & Ramade F. 1998. *Utilisation de biomarqueurs pour la surveillance de la qualité*

- de l'environnement*. Ed. Tec & Doc, 320 p.
- Loewus F. A. 1988. Ascorbic acid and its metabolic products. In *The Biochemistry of plants*, New York Academic Press, 14, 85-107.
- Martinon L. 1991. *Etude des émissions de poussières atmosphériques d'un incinérateur d'ordures ménagères*. Thèse de doctorat des sciences, Université Paris 6, 167 p.
- Mittler R., Vanderauwera S., Gollery M. & Van Breusegem F. 2004. Réactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci*, 9, 490-498.
- Modenesi P. 1993. An SEM study of injury symptoms in *Parmotrema reticulatum* treated with paraquat or growing in sulphur dioxide-polluted air. *Lichenol*, 25, 423-433.
- Nakano Y. & Azada K. 1987. Purification of ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts: its inactivation in ascorbate depleted medium and reactivation by monodehydroascorbate radical. *Plant Cell Physiol.*, 28, 131-140.
- Patra J. & Panda B. B. 1998. A comparison of biochemical responses to oxidative and metal stress in seedling of barley, *Hordeum vulgare* L. *Environ. Pollut.* 101, 99-105.
- Pelmont J. 1995. *Bactéries et environnement : Adaptation physiologique*. Ed. O. P. U. V. II. 736-739.
- Prasad K.V. S. K., Saradhi P. P. & Sharmila P. 1999. Concerted action of antioxidant enzymes and curtailed growth under zinc toxicity in *Brassica juncea*. *Environ. Exp. Bot*, 42, 1-10.
- Ramade F. 1995. *Eléments d'écologie. Ecologie Appliquée*. 5^{ème} Edition. Ed. Ediscience International, 89-90.
- Rucinska R., Waplak S. A. & Gwozoz E. A. 1999. Free radical formation and activity of antioxidant enzymes in lupin roots exposed to lead. *Plant Physiol. Biochem.*, 37, 187-194.
- Thompson J. E., Paliyath G., Brown J. H. & Dubury C. L. 1987. The involvement of active oxygen in membrane deterioration during senescence. In *Plant Senescence : its Biochemistry and Physiology*, W.W. Thompson, E.A. Nothnagel & R.C. Huffaker, Ed. *Amer. Soc. of Plant Physiol.*, Rockville, USA, 146-155.
- Weckx J. E. J. & Clijsters H. M. M. 1996. Oxidative damage and defense mechanisms in primary leaves of *phaseolus vulgaris* a result of root assimilation of toxic amounts of copper. *Physiol. Plant.*, 96, 506-512.

Manuscrit reçu le 20/11/2013

Version révisée acceptée le 02/08/2014

Version finale reçue le 09/10/2014

Mise en ligne le 21/10/2014