

Faculté des bioingénieurs

L'impact de l'arsenic, du bore, du sel et de leurs différentes combinaisons sur *Atriplex atacamensis* et ses capacités d'accumulation

Auteur : Raphaël SERCKX

Promoteur(s) : Prof. Stanley Lutts (UCL / ELIA)

Lecteur(s) : Prof. Muriel Quinet (UCL / ELIA)

Prof. Richard Lambert (UCL / ELIA)

Année académique 2020-2021

Mémoire de fin d'études présenté en vue de l'obtention du diplôme de Bioingénieur en sciences agronomiques

Table des matières

1	Introduction	1
2	Revue bibliographique	3
2.1	Problématique des métaux lourds	3
2.2	Toxicité de l'arsenic	5
2.2.1	Généralités	5
2.2.2	Origine anthropomorphique de l'arsenic	6
2.2.3	Mécanismes de transport au sein de la plante	8
2.2.4	Effets sur le métabolisme	10
2.2.5	Mécanismes de résistance connus	10
2.3	Toxicité du bore	13
2.3.1	Généralités	13
2.3.2	Mécanismes de transport au sein de la plante	14
2.3.3	Effets sur le métabolisme	15
2.3.4	Mécanismes de résistance connus	16
2.4	Toxicité saline	18
2.4.1	Généralités	18
2.4.2	Mécanismes de transport au sein de la plante	18
2.4.3	La composante osmotique du stress salin	19
2.4.4	Effets sur le métabolisme	20
2.4.5	Mécanismes de résistance connus et plantes halophytes	21
2.5	Toxicité et stress multiples	23
2.6	<i>Atriplex atacamenis</i>	25
3	Matériel et méthode	27
3.1	Matériel végétal	27
3.2	Analyse des éléments minéraux	30
3.3	Analyses biochimiques	31
3.3.1	MDA (Heath and Packer, 1968)	31
3.3.2	Proline (Bates et al., 1973)	31
3.3.3	Glutathion (Cereser et al., 2001)	31
3.4	Traitements statistiques	32
4	Analyse des résultats	33
4.1	Résultats du 1er quadrimestre : Détermination de la dose létale	33
4.1.1	Taux de mortalité	33
4.1.2	Taille des individus	34
4.1.3	Poids frais	35
4.1.4	Poids sec	37
4.1.5	Teneur en éléments minéraux	39
4.2	Résultats du deuxième quadrimestre : Réponse à un stress combiné	43
4.2.1	Poids frais	43
4.2.2	Poids sec	45
4.2.3	Teneur en éléments minéraux	47
4.2.4	Teneur en MDA	52

4.2.5	Dosage du glutathion	53
4.2.6	Teneur en proline	55
5	Discussion	56
5.1	Paramètres de croissance	56
5.2	Effets des stress combinés sur l'accumulation d'arsenic	56
5.3	Effets des stress combinés sur l'accumulation de B	57
5.4	Effets des stress combinés sur l'accumulation de Na ⁺ et de K ⁺	58
5.5	Effets de l'application de bore, sel et Arsenic sur <i>A. atacamensis</i>	58
5.6	Effets des stress combinés sur les teneurs en MDA, proline et glutathion	59
5.7	Erreurs possibles	60
6	Conclusion	61

1 Introduction

La contamination des sols par des métaux lourds et des métalloïdes est un problème qui existe depuis longtemps et qui suscite une attention grandissante. De plus en plus de sols sont en effet affectés par la présence en fortes concentrations de métaux lourds tels que le zinc, le cadmium, le plomb ou le cuivre (Krishna and Govil, 2004; Li et al., 2014; Solgi et al., 2012). L'arsenic n'est pas à proprement parlé un métal mais un métalloïde particulièrement toxique. Sa présence au sein des nappes phréatiques peut être un phénomène naturel lié à la géologie des sols mais l'influence de l'homme dans l'accumulation de ce contaminant ne peut être niée (Wang and Mulligan, 2006; Ferguson and Gavis, 1972). Parmi les différents secteurs d'activités pouvant conduire à l'accumulation de l'arsenic dans l'environnement, les exploitations minières sont particulièrement pointées du doigt (Ono et al., 2016). L'irrigation peut aussi contribuer à la pollution à l'arsenic : utiliser de l'eau polluée peut conduire à une contamination de la chaîne alimentaire et ainsi générer des problèmes d'ordre sanitaire et économique (Abernathy, 1999). Les sols contenant une concentration trop importante en arsenic deviennent impropres à la culture, et le traitement de ces sols pour les rendre exploitables nécessite des opérations lourdes et coûteuses. Parmi les nouvelles méthodes de traitement du sol, la phytoremédiation, qui consiste à utiliser des plantes pour immobiliser ou extraire des polluants du sol, est une alternative peu coûteuse (McIntyre, 2003; Ali et al., 2013).

Les sites contaminés par des métaux lourds et des métalloïdes sont parfois caractérisés par la présence d'autres éléments toxiques. Dans le nord du Chili, on constate la présence d'un excès de bore et on remarque que les régions contaminées par l'arsenic sont caractérisées par une salinité importante (Tapia et al., 2018). Une plante susceptible de pouvoir être utilisée en phytoremédiation de ces sites doit donc être capable de faire face à ces trois types de toxicité et il importe de voir comment ces toxicités interagissent au niveau de la plante.

Le désert d'Atacama présente une telle complexité qu'il est intéressant d'en étudier la flore afin d'identifier des espèces potentiellement intéressantes pour l'extraction des métaux dans le sol. *Atriplex Atacamensis* (*A. atacamensis*) est un buisson vivace dioïque identifié comme un bon candidat pour la phytogestion des sites contaminés par l'arsenic (Vromman et al., 2016a,b,c). Au sein du groupe de recherche en physiologie végétale de l'UCLouvain, différentes études ont été menées sur cette espèce afin d'évaluer ses capacités d'accumulation d'arsenic et l'influence du sel sur le comportement de cette espèce halophyte. Il a déjà été démontré que cette plante possède la capacité d'accumuler de l'arsenic, qu'elle le séquestre préférentiellement dans ses racines et que la salinité peut conduire à une meilleure translocation de l'arsenic vers les parties aériennes (Vromman et al., 2016a,b,c). Le niveau de résistance d'*A. atacamensis* à un excès de bore et l'influence d'une toxicité au bore sur la capacité d'accumulation de l'arsenic en présence et en absence de sel restent toutefois à préciser. L'objectif de ce mémoire est de poursuivre cette étude et apporter un peu plus d'éclaircissement dans cette recherche.

Cette expérience a été réalisée à partir de plantules d'*A. atacamensis* issues de graines récoltées dans le désert d'Atacama, au site de Quillagua (21°39' S, 69°32'W). L'expérience a eu lieu en deux parties. Durant la première partie, les plantules préalablement germées ont été exposées, en serre sous conditions contrôlées, à des concentrations variables de bore, d'arsenic ou de sel (NaCl) en solution nutritive. Cette expérience avait pour but de préciser le niveau de

résistance maximale de la plante vis à vis de chacun de ces trois polluants. Une concentration de chaque élément de la première partie a été choisie puis l'expérience a été répétée en exposant cette fois les individus aux différentes combinaisons possibles de sel, de bore et d'arsenic. Des analyses morpho-physiologiques et biochimiques seront utilisées pour étudier le comportement de la plante en conditions de toxicité mixte.

2 Revue bibliographique

2.1 Problématique des métaux lourds

Historiquement, l'appellation "métaux lourds" est un terme général qui regroupe l'ensemble des éléments métalliques présents dans le sol et qui ont une densité comprise entre 3.5 et 7 g.cm⁻³ (Appenroth, 2010). On retrouve au sein de cette liste le mercure (Hg), le plomb (Pb), le cadmium (Cd), le cuivre (Cu), le zinc (Zn), le chrome (Cr), l'étain (Sn) et l'antimoine (Sb). À cette liste, il convient d'ajouter des éléments comme l'arsenic (As) et le selenium (Se). Ils sont qualifiés de métalloïdes : il s'agit d'éléments qui ne sont pas des métaux mais présentent des propriétés qui s'en rapprochent. L'appellation « éléments traces métalliques » est également utilisée pour désigner l'ensemble de ces éléments. Il s'agit d'éléments généralement peu mobiles et qui sont toxiques pour les êtres vivants à de faibles concentrations. Leur accumulation dans les plantes cultivées ou le bétail peut être à l'origine de problèmes pour la santé humaine (Abernathy, 1999). L'inhalation de particules contaminées constitue également une voie de contamination importante (Ono et al., 2016).

Ces métaux lourds proviennent en général de la dégradation de la roche mère et sont des traces du passé géologique de la région. Ils sont donc présents naturellement dans l'environnement mais généralement en très faibles concentrations (Wang et al., 2018b). Néanmoins, les activités humaines sont susceptibles d'augmenter la concentration de ces différents polluants dans l'environnement. La fabrication d'engrais, les industries lourdes (sidérurgie et exploitations minières), la fabrication de verre et les tanneries sont les sources principales de contamination de notre environnement par des métaux lourds (Wang et al., 2018b).

La législation fixe des normes spécifiques qui rendent obligatoires la dépollution du sol au-delà d'une certaine valeur de concentration de polluants et/ou qui limitent l'usage des sols pollués. (Danian Zhang, 2019). Dans la pratique, il convient de distinguer la pollution qui résulte d'une activité récente d'une pollution « historique » dont le propriétaire du sol ou le gestionnaire du site ne peut être tenu responsable. Par ailleurs, les normes varient considérablement en fonction des pays, voire même des régions (Kurrer, 2020). Enfin, les sols contaminés par une activité industrielle sont généralement pollués par plusieurs éléments et on remarque également la présence de polluants de nature organique en plus des polluants minéraux, ce qui conduit à une situation très complexe (Kofroňová et al., 2018).

Parmi la liste des différents métaux lourds et métalloïdes reconnus, cette étude se concentrera sur l'As. Cet élément est responsable de multiples problèmes dans de nombreuses régions du monde (cf. Figure 1) (Kumari et al., 2018). Il s'agit d'ailleurs d'une source de perte de fertilité importante dans le nord du Chili, il y est présent en concentrations importantes dans les sols et les résidus des activités minières. L'exploitation minière, qui est une activité importante pour l'économie de la région, continue à favoriser l'accumulation d'As. Cette contamination pose de sérieux problèmes pour la stabilité des écosystèmes et la santé humaine (Kofroňová et al., 2018).

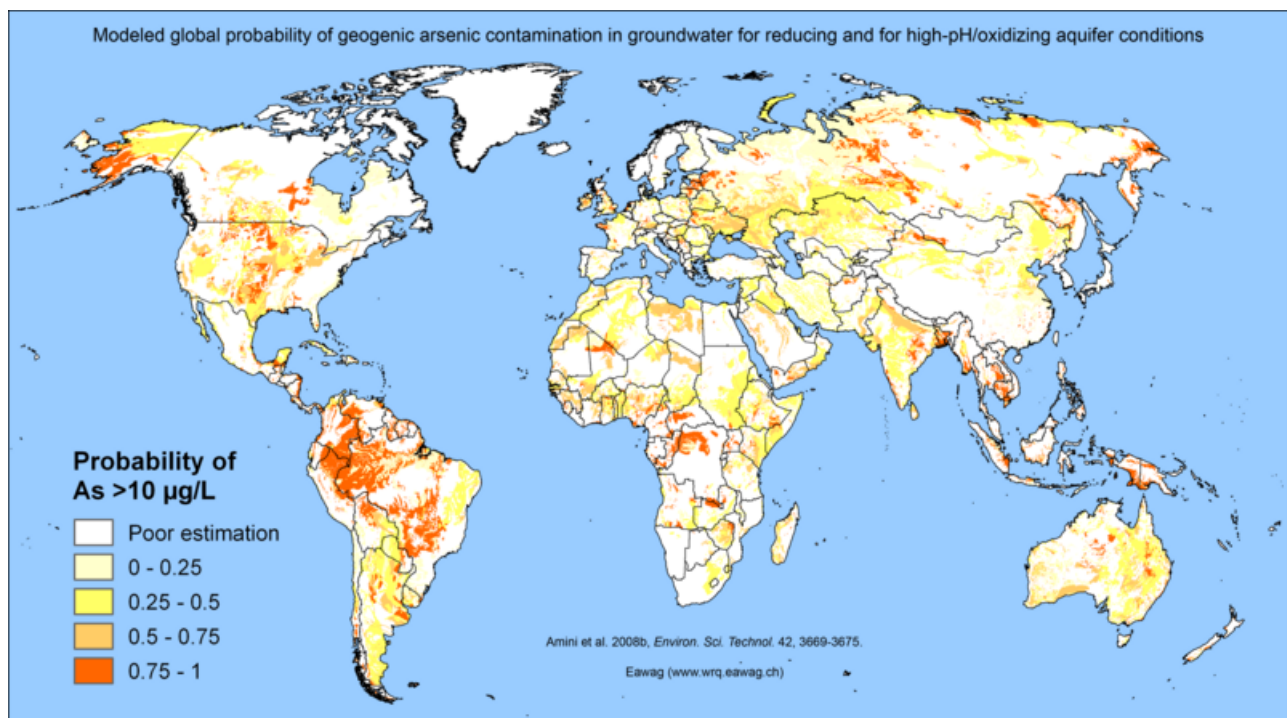


FIGURE 1 – Carte de probabilité de présence d'une concentration d'As supérieur à 10 µg/L dans les nappes phréatiques sur les différentes régions du globe terrestre réalisée à l'aide d'un modèle de prédiction (Amini et al. 2008)

2.2 Toxicité de l'arsenic

2.2.1 Généralités

L'arsenic (As) est un élément se trouvant naturellement dans l'environnement en faibles concentrations. La teneur « normale » de cet élément oscille autour de 5mg/kg dans les sols mais sa concentration varie fortement en fonction des minéraux présents (Ongley et al., 2007). Par exemple, les régions minières présentent une concentration beaucoup plus élevée dans les sols. L'As étant toxique à faible dose, il fait l'objet d'une législation particulièrement rigoureuse. À titre d'exemple, au Japon, la concentration maximale autorisée en As dans les nappes phréatiques est de 10 $\mu\text{g/l}$ et le sol ne peut être cultivé si la concentration dépasse 15 mg kg^{-1} (Ministry of the environment, 2020).

L'As existe sous différentes formes dans l'environnement. Ces formes sont classées en deux catégories : l'As organique et l'As inorganique. L'As organique est connu sous la forme de dérivés mono ou diméthylés. Ces formes organiques sont présentes dans le sol et résultent d'une activité microbienne, ou d'une application de pesticides (Ye et al., 2017; Chen et al., 2017; Zhang et al., 2015). Pour la santé humaine, ces formes présentent souvent un moindre risque que les formes minérales.

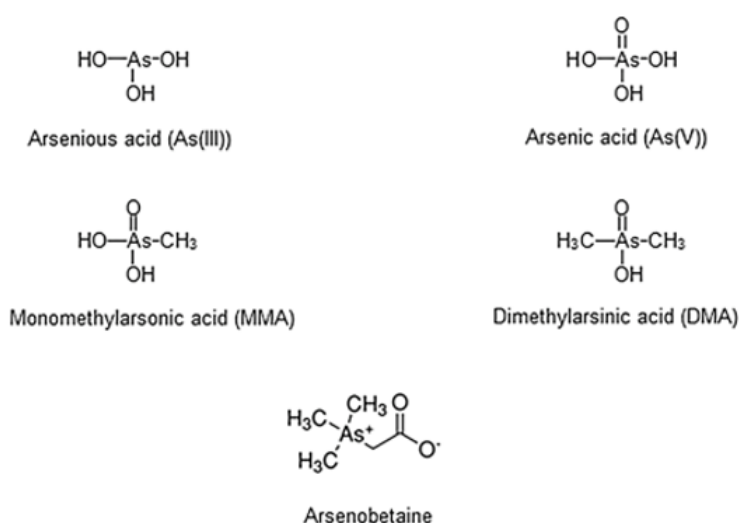


FIGURE 2 – Formes majoritaires d'As retrouvées dans l'environnement (Schramel et al., 2002)

L'As minéral est plus commun, plus toxique et plus mobile. Deux espèces majoritaires coexistent dans le sol : l'arséniate (As(V)) et l'arsénite (As(III)). L'une des spécificités de l'As est qu'il peut présenter deux étages d'oxydation et qu'il est présent sous forme anionique dans la solution du sol (Tripathi et al., 2012). En conditions réductrices, telles que celles qui prévalent en anoxie l'As va être présent sous forme d'As(III), tandis qu'en présence d'oxygène l'espèce majoritaire sera l'As(V). Le pH, le potentiel réducteur et la teneur en matière organique du sol peuvent affecter la spéciation de l'As (Abbas et al., 2018; Díaz et al., 2011).

2.2.2 Origine anthropomorphique de l'arsenic

Industrie minière :

L'industrie minière est l'une des causes principales d'apport d'As dans l'environnement. Les minerais contiennent généralement de l'As en association avec les métaux recherchés. Les poudres et résidus résultants du broyage des roches sont évacués avec le reste des déchets. Ces déchets sont beaucoup plus facilement altérables et lessivables et contribuent ainsi à l'accumulation de métaux lourds et métalloïdes dans les nappes phréatiques. Les eaux des lieux se trouvant à proximité de mines sont donc souvent exposées à une pollution à l'As. De même, lors du processus de fonte, une grande part de l'As encore présent dans les minerais se retrouve en suspension dans les gaz produits sous forme de poussière et peuvent contaminer les sols par voie éolienne (cf. figure 3) (Jankong et al., 2007; Vithanage et al., 2012; Wang et al., 2018a).

Dans le nord du Chili, les teneurs en As sont importantes au niveau des roches mères. Cette zone est le siège d'une forte activité minière et le Chili est le second producteur de minerais de cuivre après la Chine (Northey et al., 2013). Lors de l'extraction du cuivre, les problèmes de contamination au Cu demeurent limités. Par contre, l'As présent dans les roches traitées est rejeté dans l'environnement. La contamination qui en résulte est importante et se remarque par la pollution du seul cours d'eau de la région, le Rio Lola, qui est utilisé par les populations locales pour l'irrigation de parcelles potagères (Romero et al., 2003; Queirolo et al., 2000).

Industrie agro-alimentaire :

Une série d'herbicides et d'insecticides utilisés en agriculture, surtout au cours du 20ème siècle, contiennent des dérivés d'As et leur utilisation en grande quantité conduit à une accumulation de cet élément dans le sol (Mandal and Suzuki, 2002). L'irrigation constitue elle aussi une source de contamination dans certains cas. L'utilisation d'eau contenant de l'As pour irriguer un champ entraîne la concentration de cet élément dans les horizons du sol (Bhowmick et al., 2018).

Les exploitations animales sont aussi en partie responsables de l'augmentation de la présence d'As dans l'environnement. Certains additifs utilisés comme compléments alimentaires sont des composés organo-arséniés. Ces composés ne sont pratiquement pas absorbables par le système digestif des animaux et se retrouvent dans leurs déjections. Ces déjections sont à leur tour utilisées pour fertiliser des champs et augmentent leur teneur en As dans la partie cultivée du sol (Liu et al., 2015).

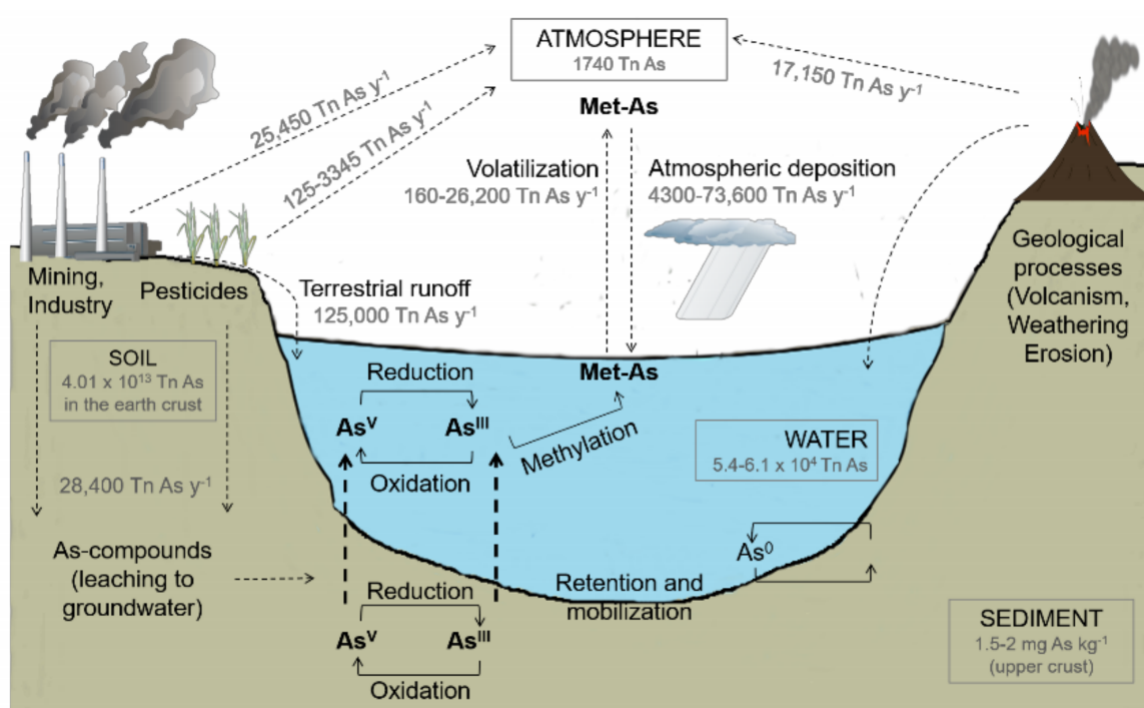


FIGURE 3 – Schéma représentant les différents réservoirs ainsi que les transferts estimés entre les différents réservoirs. As⁰ : arsenic, As^{III} : arsenite, As^v : arséniate, Met-As : dérivés méthylés d'arsenic, t : tonnes, ty⁻¹ : tonnes par ans. (Barral-Fraga et al. 2020)

2.2.3 Mécanismes de transport au sein de la plante

Parmi les différentes formes d'As, l'As(III) est la forme qui est la plus prélevée par la plante, celle-ci étant plus mobile et plus disponible. L'As(III) rentre dans la plante par le biais d'aquaporine. Une fois au sein de la plante, il transite en utilisant des canaux à silice dont il est l'analogue. L'As(V) quant à lui est un analogue du phosphate inorganique (Pi) et rentre donc principalement par le biais des transporteurs spécifiques de Pi (Panda et al., 2010; Minatel et al., 2018; Strawn, 2018). Même si les canaux à phosphate ont une affinité plus grande pour le phosphate que pour l'As, on observe une accumulation importante d'As lorsque le phosphate est déficitaire dans l'environnement. Cette constatation pourrait s'expliquer par une compétition phosphate/arséniate couplée à une surexpression de gènes codant pour les transporteurs de phosphate (Vithanage et al., 2012; Islam et al., 2015).

Dans les deux cas, les différentes formes d'As inorganiques rentrent en compétition avec les éléments desquels ils sont analogues (cf. Figure 4). Par conséquent, on a une hausse de la teneur en As dans les cas où le ratio As/Si et le ratio As/Pi est élevé. De même, une augmentation de l'expression des gènes responsables des canaux à phosphate et à silice augmente la quantité d'As prélevée dans les racines.

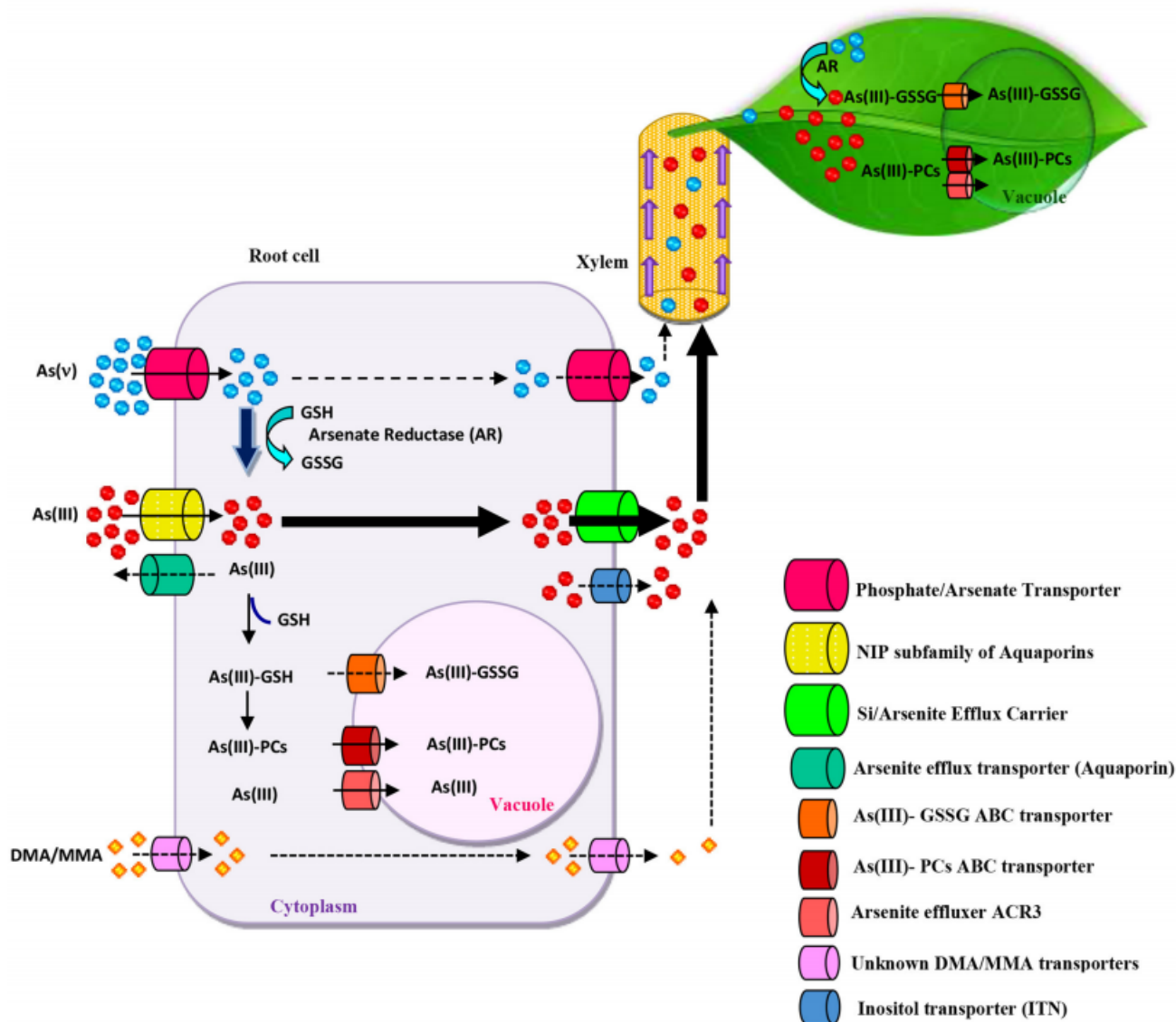


FIGURE 4 – Voies d'entrées, mécanisme de transport et voies de détoxification de l'As au sein de la plante. (As(III) : arsenite, As(V) : arséniate, GSH : glutathion réduit, GSSG : glutathion oxydé, PCs : phytochélatine, MMA : composé monométhylarsénié, DMA : composé diméthylarsénié) (Souri et al., 2017)

2.2.4 Effets sur le métabolisme

Une accumulation d'As dans la plante provoque une réduction de sa croissance, une réduction de sa teneur en acides aminés essentiels, une réduction des échanges gazeux (souvent liée à une fermeture stomatique), une altération du statut hormonal, une réduction de sa teneur en chlorophylle et conduit éventuellement à la mort de l'individu (Islam et al., 2015; Kumar et al., 2015). Les symptômes de toxicité à l'As sont donc multiples et il est difficile de distinguer l'action directe de l'As de ses actions indirectes.

L'As(III) réagit avec les groupements thiols présents dans la cellule au niveau des protéines, ce qui peut mener à une inhibition de l'activité de certaines enzymes et entraver l'activité métabolique de la cellule, entraînant la mort cellulaire (Tripathi et al., 2012; Bjørklund et al., 2018; Finnegan and Chen, 2012). L'As(V) quant à lui peut être utilisé par des enzymes et s'intégrer à des biomolécules (comprenant les acides nucléiques) à la place du phosphate. Cela risque de perturber le fonctionnement de cycles et voies métaboliques (Praveen et al., 2018).

L'As(V) est réduit en As(III) dès son entrée dans la plante. La conversion d'As(V) en As(III) entraîne la production de composés d'oxygène actif (ROS) au sein de la cellule. Il s'agit d'espèces fortement toxiques car très réactives qui peuvent endommager les enzymes, les composés lipidiques, les sucres ainsi que l'ADN (Abbas et al., 2018; Finnegan and Chen, 2012). L'altération structurelle d'organites, tels que les chloroplastes et les mitochondries provoque une perturbation dans la circulation des électrons. Cela entraîne un stress oxydatif indépendant de la conversion d'As(V) en As(III) (Kumar et al., 2015; Abbas et al., 2018; Finnegan and Chen, 2012).

2.2.5 Mécanismes de résistance connus

Séquestration racinaire

On remarque que même lorsque la plante est soumise à un stress sous forme d'As(V), 90% de l'As retrouvé au sein de la plante est sous forme d'As(III). En effet, une fois au sein de la plante, l'As(V) est rapidement réduit en As(III) via deux voies différentes (Abbas et al., 2018).

La première voie de réduction de l'As(V) en As(III) implique des antioxydants endogènes comme le glutathion. Le glutathion est un composé antioxydant hydrosoluble impliqué dans la gestion du stress oxydatif. En présence d'As(V), le glutathion réagit et forme des dimères de glutathion oxydé (GSSG) (cf Figure 5). Cette oxydation étant couplée à la réduction d'As(V) en As(III). Ces dimères seront plus tard recyclés pour reformer deux molécules de glutathion réduit (GSH) sous l'action de l'enzyme glutathion réductase (Finnegan and Chen, 2012; Hasanuzzaman et al., 2017). La deuxième voie de réduction, parfois considérée comme la voie principale de réduction, fait intervenir des enzymes. L'As(V) présent dans les cellules des plantes est réduit sous forme d'As(III) par des enzymes spécifiques notamment des arseniates réductases (ACR). Des réductases non spécifiques peuvent également intervenir dans le processus mais cela demeure controversé (Li et al., 2016).

Une autre stratégie est la détoxification de l'As. La principale voie de détoxification de l'As(III)

implique la fixation de cet ion sur les fonctions thiols de petits peptides non protéiques, les phytochélatines qui jouent un rôle essentiel dans la gestion du stress induit par l'As en complexant celui-ci. Ces phytochélatines sont synthétisées à partir du glutathion, qui est lui-même composé de trois acides aminés dont la cystéine. Le glutathion fournit des phytochélatines en se polymérisant sous l'action d'une phytochélatine synthase qui peut être activée en conditions de stress (Verbruggen et al., 2009). Une molécule de phytochélatine comprend de 2 à 11 molécules de glutathion. Une fois fixé sur la fonction thiol des cystéines des phytochélatines, l'As(III) est séquestré par transport du complexe formé vers la vacuole, un transporteur ATP binding cassette (ABC) étant impliqué dans cette translocation (Zhang et al., 2018). L'As se trouve ainsi accumulé en dehors du cytosol. Les phytochélatines ne sont pas spécifiques à l'As et peuvent également intervenir dans les stratégies de résistance à des métaux lourds comme le cadmium ou le plomb (Verbruggen et al., 2009).

Les métallothionéines sont des protéines de taille importante également riches en cystéines qui fonctionnent sur le même principe que la complexation évoquée pour les phytochélatines (Hettick et al., 2015). Contrairement aux phytochélatines, les métallothionéines sont le résultat direct de l'expression d'un gène et non le fruit d'une voie de synthèse. Il n'y a pas de séquestration vacuolaire réalisée par les métallothionéines et si leur rôle est souvent mentionné pour la gestion de la toxicité au cadmium ou au cuivre, elles sont moins étudiées pour les problèmes liés à l'accumulation de l'As.

Il est admis que l'As s'accumule principalement au niveau des racines et que seule une partie de l'As absorbé par la plante est transloquée vers les parties aériennes. Cette rétention racinaire va de pair avec une synthèse préférentielle de thiols non protéiques (glutathion et phytochélatines) au niveau des organes non photosynthétiques de la plante pour pouvoir se protéger des effets de l'As (Abbas et al., 2018). Une accumulation préférentielle de l'As dans les parois pourrait aussi contribuer à éviter l'accumulation de l'As au niveau du cytosol. La rétention pariétale des métaux lourds, qui sont pour la plupart des cations divalents, sur les composés pectiques et les hémicelluloses est un processus de résistance bien connu (Tripathi et al., 2012). Par contre, une rétention pariétale d'anions comme l'arséniate ou l'arsénite est moins évidente, même si ce processus reste possible. De plus, une séquestration d'As dans les trichomes est également mentionnée dans le cas d'espèces halophytes (Lutts and Lefèvre, 2015).

L'un des principaux symptômes liés à la toxicité de l'As est une augmentation du stress oxydatif. Les espèces résistantes à l'As se caractérisent par une gestion efficace de ce stress. cette gestion du stress dépend d'une part, de l'augmentation de la synthèse de composés antioxydants endogènes comme l'ascorbate, le glutathion, les tocophérols et les caroténoïdes, et d'autre part, de la stimulation d'enzymes antioxydantes impliquées dans la détoxification des ROS. Parmi les enzymes anti-oxydantes principales on retrouve les ascorbates peroxydases, les superoxydes dismutases, la catalase, la glutathion réductase ou la dehydrascorbate réductase (Panda et al., 2010; Kumar et al., 2015).

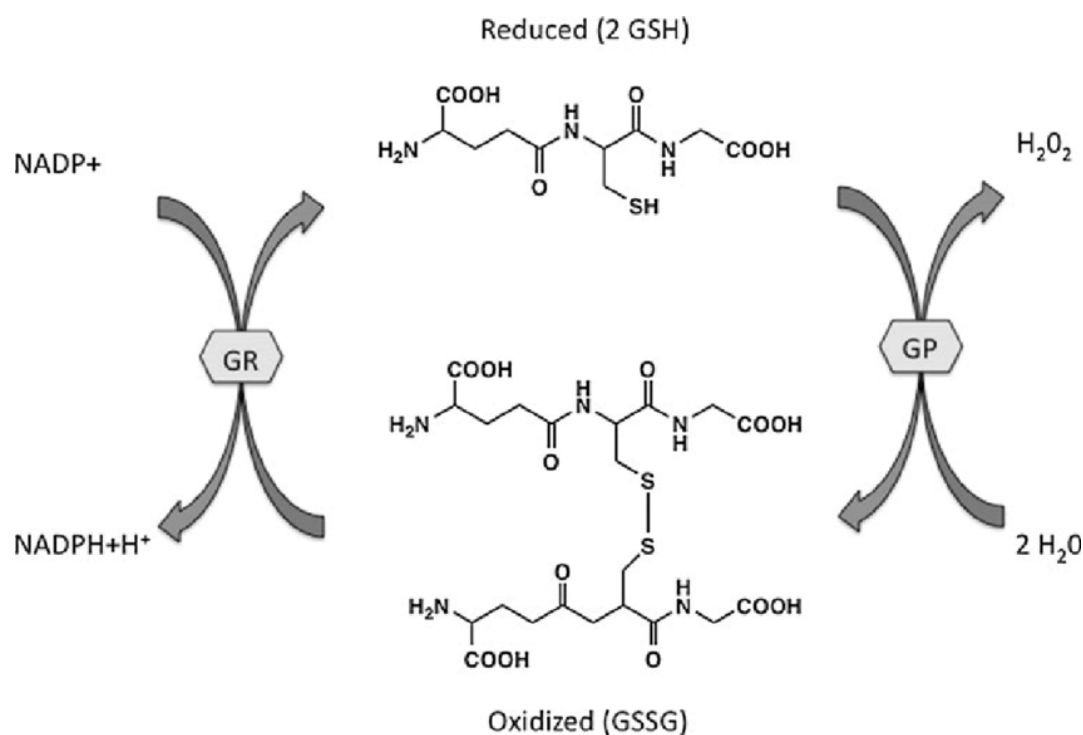


FIGURE 5 – Réaction de détoxification de ROS par le glutathion. GSSG : glutathion oxydé, GSH : glutathion réduit, GR : GSH reductase, GP : GSH peroxidase (Xiong et al., 2011)

Plante hyperaccumulatrice

Les plantes hyperaccumulatrices n'ont pas tendance à accumuler de l'As exclusivement au niveau des racines mais plutôt à le répartir au sein des différents organes. Dans certains cas on observe même une accumulation préférentielle au niveau des parties aériennes. Les espèces hyperaccumulatrices de l'As demeurent peu nombreuses, l'exemple le plus connu étant celui de la fougère *Pteris vittata* (Gonzaga et al., 2008). Il y a peu de formation de phytochélatines racinaires chez cette espèce et la majorité de l'As absorbé demeure donc disponible pour la translocation via le flux transpiratoire. La gestion des grandes quantités d'As présentes dans les racines et les frondes de la plante par la formation de complexe As-phytochélatines est coûteuse en énergie et par conséquent, peu viable pour cette plante accumulatrice. Dans certains cas, des protéines de transports sont présentes pour transférer de l'As(III) dans les parties aériennes induisant une distribution de l'As dans les organes photosynthétiques (Abbas et al., 2018; Finnegan and Chen, 2012).

2.3 Toxicité du bore

2.3.1 Généralités

Le B est un élément naturellement présent dans le sol et qui est essentiel pour les végétaux. Il occasionne des problèmes en cas de carence et est rarement en excès. Le bore intervient majoritairement dans la constitution des parois cellulaires en formant des liaisons ester entre les résidus d'apiose au niveau des rhamnogalacturonanes de type II (RGII) au sein de la pectine (cf. figure 6) (Princi et al., 2016; Brdar-Jokanović, 2020). Par ailleurs, le B sert à la formation de complexes entre la membrane cellulaire et la paroi, assurant leur adhérence et leur coordination. Il est aussi impliqué comme cofacteur d'enzymes intervenant dans la synthèse de différentes hormones ainsi que dans la synthèse de flavonoïdes (Choudhary et al., 2020). Le B contrôle également le taux de divisions cellulaires et influence le transport des sucres à travers les membranes biologiques (Nable et al., 1997).

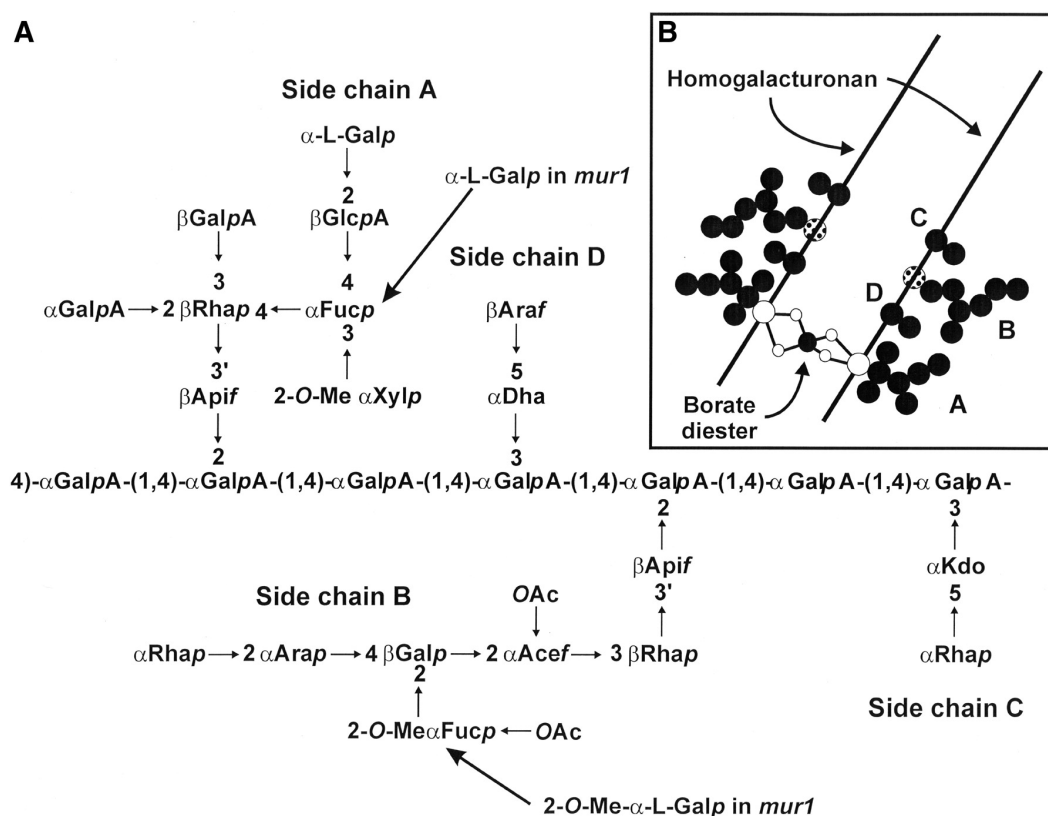


FIGURE 6 – A : structure détaillée d'une chaîne de Rhamnogalacturonan II, B : dimère de RG II formé par un pont diester et implication de la présence de B dans la formation de ce pont (Souri et al., 2017)

Certains environnements ont tendance à se concentrer en B comme les sols proches de la mer et les sols arides/semi-arides. Dans le cas des abords marins, cela est dû au fait que les nappes phréatiques sont enrichies en B par l'eau de mer. Ces eaux enrichies sont utilisées pour irriguer les cultures et créent des environnements pollués (Nable et al., 1997; Elumalai et al., 2017). Pour les milieux arides et semi-arides, cela est dû l'évapotranspiration. En effet, l'évaporation intense de l'eau contenant du B amène à une augmentation progressive de la teneur en B dans la couche superficielle du sol dans ces milieux où l'eau n'a pas le temps de s'infiltrer en profondeur.

Parmi les activités humaines susceptibles d'entraîner la formation d'un sol pollué au B, l'agriculture (et surtout l'irrigation) est généralement le secteur le plus important. Les autres domaines ayant une influence relativement importante sont : l'industrie et les activités minières (Elumalai et al., 2017).

Le désert d'Atacama, qui nous sert de référence, est un milieu aride et on retrouve aussi bien de l'As que du B dans les déchets issus des mines présentes. C'est pour ces deux raisons que la concentration en B dans cette région est aussi élevée (Landi et al., 2019). Dans la région XV du Chili (région de Arica), la rivière Lluta présente des concentrations de B de l'ordre de 25 mg/l et les teneurs en B de la rivière Colpitas peuvent atteindre 400 mg/l (Rámila et al., 2015) sachant qu'il est considéré que la limite en B dans l'eau d'irrigation est de 1 mg/l si on veut utiliser le sol de manière durable (Brdar-Jokanović, 2020). Selon Díaz et al. (2013), les teneurs en B dans l'eau de distribution provenant de l'eau de mer désalinisée ne sont jamais inférieures à 2 mg/l, l'eau de mer non désalinisée pouvant contenir jusqu'à 10 mg/l.

2.3.2 Mécanismes de transport au sein de la plante

Dans l'environnement, le B est essentiellement présent sous forme de $B(OH)_3$ et il est prélevé par la plante sous cette forme. Le B pénètre dans la plante via des transporteurs MIP (Major Intrinsic membrane family ou « aquaporines »), principalement PIP1 1 et plusieurs transporteurs NIP (Lamdan et al., 2012) (cf Figure 7). Bienert et al. (2019) ont également mis en évidence un transporteur X Intrinsic Protein qui est imperméable à l'eau mais est capable de transporter de l'acide borique. Ce transporteur jouerait un rôle déterminant dans la distribution du B au sein de la plante et dans sa répartition entre les différents tissus.

Les végétaux possèdent des mécanismes de transport actif et passif vis à vis du B. Des protéines de transport à faible et forte affinités existent mais elles sont généralement produites dans le cas d'une déficience en B. Des transporteurs BOR1 assurent une absorption sélective de B sous forme anionique (Takano et al., 2002). Le B, en conditions normales ou en excès, est absorbé passivement par les racines en diffusant à travers la double membrane de phospholipides. Pour la plupart des plantes, il est transporté par le xylème en suivant le flux engendré par la transpiration. Les feuilles adultes transpirant davantage, le B est donc généralement présent en plus grande quantité dans les plus vieilles feuilles. Il existe une grande disparité entre les espèces quant à la capacité de transporter le B par le biais du phloème. Chez les espèces qui ont cette propriété, nous retrouvons préférentiellement cet élément dans les tissus en pleine croissance. Ces plantes présentent de fortes concentrations en polyols (mannitol, sorbitol, dulcitol) au niveau des sèves phloémiennes et le B serait chélaté à des groupements hydroxyles (Rosolem et al., 2020).

De manière générale, on observe que le B est présent en plus grande quantité dans les parties aériennes que dans les parties racinaires. Les teneurs racinaires ont tendance à rester stables même en présence de fortes concentration de B. Les racines ne constituent pas un site de rétention (Landi et al., 2019).

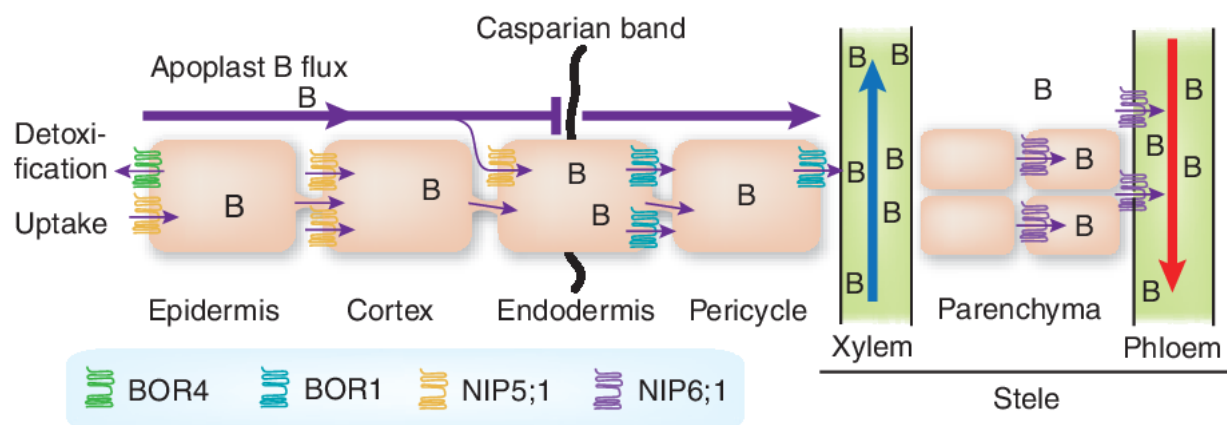


FIGURE 7 – Modèle représentant la dynamique des flux de B au sein d'une plante, BOR1 : Boron transporter 1, BOR4 : Boron transporter 4, NIP5;1 NOD26-like intrinsic protein 5;1, NIP6;1 NOD26-like intrinsic protein 6;1 (Robert and Friml, 2009)

2.3.3 Effets sur le métabolisme

Le B influence la croissance, les capacités reproductives et la qualité des graines. Il joue aussi un rôle important dans la synthèse d'acide nucléique et la synthèse de certaines molécules anti-oxydantes. Dans une situation où le B est en excès, il peut provoquer une réduction de croissance, l'apparition de nécrose ainsi qu'une malformation des fruits. Ces symptômes sont les conséquences de deux effets que le B a sur une cellule lorsqu'il est en excès :

1. Il cause une inhibition du développement ainsi que de la division cellulaire en formant des complexes avec les sucres présents. Parmi ces sucres on retrouve le ribose, qui est notamment un constituant de l'ARN (Nable et al., 1997).
2. Il interfère avec le métabolisme de base de la cellule en se liant au ribose ce qui peut amener à une liaison au NADPH ainsi qu'à l'ATP qui en contiennent tout les deux. Ceux deux composés sont essentiels aux cellules et servent, entre autres, dans le cycle de Calvin-Benson, qui est une étape obligatoire dans le processus de photosynthèse (Choudhary et al., 2020).

Au niveau morphologique, on constate que le système racinaire a tendance à se lignifier, que l'exoderme s'épaissit et dans certains cas il y a une augmentation du dépôt de subérine (Princi et al., 2016). Cette réaction pourrait être une tentative de la plante pour réduire son absorption de B. Dans la tige, on peut voir un épaississement de la paroi cellulaire du collenchyme dans le but potentiel d'augmenter les capacités de stockage de B dans la paroi (Princi et al., 2016). Les réponses observées au niveau des feuilles sont diverses et dépendent fortement de l'espèce étudiée. Un des impacts observés de manière consistante est la réduction de la photosynthèse. Cette réduction de l'activité photosynthétique pourrait être expliquée par la baisse de la disponibilité en NADPH et en ATP. Une apparition de nécrose, liée à une réduction des teneurs en chlorophylle, est possible (Choudhary et al., 2020).

Lorsque le B est présent en grande quantité, on observe une réduction du flux transpiratoire et une perturbation du fonctionnement des stomates. Le B peut interagir avec le métabolisme de l'acide abscissique (ABA) par le biais d'une augmentation dans l'expression du gène NCED3 conduisant à une surproduction de l'acide abscissique impliqué dans les processus de fermeture des stomates (Macho-Rivero et al., 2017).

En plus d'une baisse de la production de sucre, la réduction des capacités photosynthétiques entraîne un surplus d'énergie. La plante, incapable d'intégrer toute la lumière incidente, produit des ROS. La plante se retrouve alors confronté à un stress oxydatif, provoquant des symptômes similaires aux symptômes évoqués dans la section dédiée à l'As (cf. point 2.2.4).

2.3.4 Mécanismes de résistance connus

Certaines espèces réduisent leur absorption de B lorsque celui-ci est présent en excès et peuvent même mettre en place des mécanismes d'excrétion par les racines. Cela se fait notamment via la production de protéines d'efflux spécifique (Lamdan et al., 2012). La production d'anti-oxydant peut limiter le stress oxydatif et est couramment observée. Un autre mécanisme de résistance est la production de polyalcools ainsi que de composés phénoliques dans le but de chélater le $B(OH)_3$. Le B peut être séquestré dans la vacuole ou dans la paroi cellulaire, où il n'a que peu ou pas d'effets physiologiques (Brdar-Jokanović, 2020). Dans certains cas, on a une hausse de la vitesse de croissance du parenchyme accompagnée de la production de cellules aux parois plus épaisses (Princi et al., 2016).

Certaines plantes utilisant le saccharose comme moyens de transports des photosynthétats opèrent un changement et se mettent à produire du sorbitol ou du fructose au lieu du saccharose. Cela rend possible la translocation du B. Le B suit alors la direction du phloème qui se dirige préférentiellement dans les tissus en pleine croissance.

L'espèce *Puccinellia frugida* a été identifiée comme une espèce hyperaccumulatrice de B. Comme *Atriplex atacamensis*, cette espèce est originaire du nord du Chili et pousse spontanément sur des sols riches en B (Rámila et al., 2015). Selon Ramila et al. (2015), cette espèce placée en conditions de fortes teneurs en B surexprime un gène codant pour un transporteur impliqué dans l'efflux racinaire de cet élément.

Plusieurs hormones jouent un rôle important dans la tolérance au B. La kinétine, par exemple, réduit les effets négatifs du B sur les teneurs en chlorophylle, ainsi que les teneurs en H_2O_2 et en MDA de plantes de blé confrontées à un excès de B (Eser and Aydemir, 2016). Chez la tomate, les mêmes effets bénéfiques sont rapportés pour une application exogène de GA3 et seraient à mettre en relation avec une surproduction endogène d' H_2S (Kaya et al., 2020). Pour Oliveira et al. (2020) l'acide salicylique permet au pois de lutter efficacement contre le stress oxydatif induit par la toxicité du B, cette hormone permettant d'augmenter les activités de multiples enzymes antioxydantes. Selon Al-Huqail et al. (2020), une application foliaire de melatonine, dont la structure est proche de celle de l'acide indol-acétique, supprime également les effets oxydatifs d'une toxicité au B et stimule les activités des catalase, ascorbate peroxydase et glutathion reductase, ainsi que les teneurs endogènes en composés phénoliques.

La présence d'un excès de B est souvent rapportée en zones arides ou semi-arides. Il n'est donc pas rare que cette toxicité soit associée à d'autres stress, notamment au stress salin. Pour Smith et al. (2013), les teneurs en B dans les parties aériennes de *Brassica oleracea* augmentent lorsque cette plante est exposée conjointement aux deux stress. Le sel en solution peut induire la conversion d'acide borique ($B(OH)_3$) en anion borate ($B(OH)_4^-$). Masood et al. (2012) rapportent que la salinité augmente l'absorption de B chez le blé et que le B et l'ion Cl^- ont des

effets additifs sur la réponse de la plante. Selon Pandey et al. (2019), la présence simultanée de B et de NaCl induit une contrainte spécifique qui ne peut pas être résumée à l'addition de contraintes individuelles.

La présence de B a un effet positif sur la réponse des plantes au Cd, ce qui est attribué à une augmentation de la capacité de rétention pariétale de ce métal lourd induit par le B en relation avec une augmentation de la synthèse de pectine et une stimulation des activité pectinemethyl esterase (Wu et al., 2020b,a).

2.4 Toxicité saline

2.4.1 Généralités

La perte de fertilité liée à la salinité est depuis longtemps un problème prépondérant pour l'agriculture (Daliakopoulos et al., 2016). L'irrigation et l'agriculture intensive accentuent ce problème et la surface arable perdue à cause de cette salinité augmente d'années en années. Certaines études estiment que près d'un quart des terres arables de la planète sont affectées par des problèmes de toxicité saline (Munns, 2002).

Un sol salin présente, par définition, une conductivité électrique de plus de 4 dS.m⁻¹. Le terme stress salin regroupe donc des stress causés par une multitude de sels distincts tels que Na₂SO₄, le KCl, le MgSO₄, le Na₂CO₃ et NaCl (Irakoze et al., 2019). Le NaCl est responsable de la majeure partie des problèmes de salinité rencontrés.

Le Na⁺ est un élément non-essentiel pour les plantes en C3. Il intervient au niveau des plantes en C4 pour favoriser la régénération du phosphoénolpyruvate mais les quantités requises à cette usage sont très faibles (mineral nutrition of higher plants, second edition, pg 407). Le Cl⁻ est un élément essentiel dans la mesure où il intervient au niveau de la photolyse de l'eau au sein des chloroplastes mais les quantités nécessaires sont infimes.

on admet que le stress salin présente une double composante : 1) une composante ionique liée à l'accumulation d'éléments toxiques et 2) une composante osmotique associée à la réduction du potentiel osmotique de la solution du sol et compromettant de ce fait l'approvisionnement en eau de la plante. Le modèle « biphasique » qui repose sur un certain nombre de données expérimentales stipule que la composante agissant le plus rapidement au niveau de la plante est la composante osmotique (Munns, 2002). La réduction du potentiel osmotique est en effet immédiate suite à l'addition de sel dans le milieu alors que les effets de la toxicité ionique relèvent d'une accumulation progressive d'ions. Il est utile de souligner que ceci n'est valable que si une dose importante de sel est ajoutée brutalement au milieu de culture (ce qui en conditions de terrain n'est pas souvent le cas). Par ailleurs, l'importance relative des composantes ioniques et osmotiques n'est pas nécessairement la même pour toutes les doses de sel et chez toutes les espèces (Munns et al., 2020). Outre ces composantes, des phénomènes de carences secondaires peuvent être induits en relation avec une réduction de l'absorption de K⁺ (liée à une compétition avec le Na⁺) et une réduction de l'absorption de nitrate (lié à une compétition avec le Cl⁻). Par ailleurs, un excès de Na⁺ peut, au niveau de certains sols, induire une floculation des argiles impliquant une altération structurelle du substrat conduisant à des phénomènes d'hypoxie (Adak et al., 2019).

2.4.2 Mécanismes de transport au sein de la plante

Le Na⁺ est un élément commun présent dans le sol. C'est un élément soluble et très mobile qui pénètre au sein de la plante par le biais des canaux à cations et de transporteurs de K⁺ peu spécifiques. En effet le Na⁺ et le K⁺ partagent de multiples propriétés physico-chimiques. Un excès de Na⁺ par rapport au K⁺ dans la solution du sol conduit donc certains transporteurs à se tromper, ce qui amène à une réduction du rapport K⁺/Na⁺ au sein de la plante (Garcia-deblás et al., 2003).

Une fois absorbé, Na^+ suit le flux transpiratoire. Il transite au sein des racines par le biais des plasmodesmes ou de la circulation apoplasmique. Après avoir franchi la barrière endodermique, il se retrouve dans le xylème. Il est alors acheminé dans les différents organes où il impacte la croissance et les capacités photosynthétiques (cfr ci-dessous). Il est à noter que le Na^+ est peu mobile dans le phloème. Une fois dans les parties aériennes, il n'est donc que rarement redistribué (Munns et Tester, 2008), même si certaines espèces halophytes semblent avoir la capacité de remettre en circulation le Na^+ accumulé au niveau des parties aériennes vers les tissus racinaires. Le chargement des lames vasculaires joue un rôle essentiel dans la régulation des taux de translocation (Zhu et al., 2017). De nombreuses protéines membranaires sont responsables du transport de Na^+ dans les cellules et entre les tissus. Les trois familles de protéines principalement impliquées sont les AKT, HKT et NHX (Luan et al., 2009). La régulation de l'expression des gènes codant pour ces protéines, et la régulation post-traductionnelle de ces transporteurs joue un rôle déterminant dans la résistance à la salinité, que nous mettrons en évidence ultérieurement. Il convient de souligner que le transport de Na^+ vers le symplasme est un transport passif : le Na^+ a donc tendance à rentrer dans le cytosol. Ceci signifie qu'une exclusion du Na^+ du cytoplasme implique un transport actif lié à l'activation d'une pompe de protons suite à une activité ATPase membranaire et impliquant un antiport $\text{Na}^+ - \text{H}^+$ (Fukuda et al., 1998, 2011).

Les transporteurs de Cl^- sont moins bien connus que les transporteurs impliqués dans le mouvement du Na^+ et ceci s'explique par le fait que le Cl^- a souvent été négligé dans les études consacrées au stress salin (Wu and Li, 2019; White and Broadley, 2001). Les teneurs en Cl^- dans les parties aériennes sont régulées par des transporteurs d'anions qui contrôlent le transport de Cl^- depuis les racines, particulièrement au niveau du chargement des lames vasculaires. Depuis quelques années, une attention croissante est octroyée à des « Cation-Chloride-Cotransport » qui sont impliqués dans un co-transport $\text{Cl}^- - \text{Na}^+ - \text{K}^+$ (Colmenero-Flores et al., 2007; Kong et al., 2011). Il est à noter que, contrairement au Na^+ , le transport de Cl^- vers l'intérieur de la cellule est un transport actif. La famille des CCC comporte trois grands types de transporteurs (Kong et al., 2011) :

1. Ceux qui fonctionnent avec un symport $\text{Cl}^- - \text{Na}^+$
2. Ceux qui fonctionnent avec un symport $\text{Cl}^- - \text{K}^+$
3. Ceux qui fonctionnent avec un symport $2 \text{Cl}^- - \text{Na}^+ - \text{K}^+$

Chez des plantes non-exposées à la salinité, ce sont les transporteurs de type 2 qui sont les mieux représentés au sein de la plante et ces transporteurs jouent un rôle dans le métabolisme normal des cellules en conditionnant les cinétiques d'élongation cellulaire et les processus d'osmorégulation (Chen et al., 2016). La présence de ces transporteurs est rapportée non seulement au niveau des membranes plasmiques mais également au niveau des appareils de Golgi qui pourraient constituer des sites d'accumulation de Cl^- en conditions de stress salin (Henderson et al., 2015).

2.4.3 La composante osmotique du stress salin

La présence de NaCl (ou d'un autre sel soluble) entraîne une réduction du potentiel hydrique de la solution du sol par le biais de sa composante osmotique. Il en résulte une altération du

statut hydrique de la plante, parfois qualifié de « sécheresse physiologique ». Pour faire face à cette situation, la plante aura tendance à fermer ses stomates afin de limiter ses pertes en eau, comme le fait une plante soumise à un déficit hydrique. Cette fermeture des stomates présente l'inconvénient de compromettre la régulation thermique du système foliaire et surtout de réduire l'activité photosynthétique par le biais d'une altération des échanges gazeux (Rathinasabapathi, 2000). Il est à noter qu'une réduction du flux transpiratoire peut avoir comme effet bénéfique de limiter l'apport de Na^+ et de Cl^- . Cette interaction entre « composante hydrique et composante osmotique » est rarement étudiée.

Pour conserver un gradient de potentiel hydrique favorable à l'approvisionnement en eau, la plante peut avoir recours à un phénomène d'ajustement osmotique qui consiste en la réduction de son propre potentiel osmotique par accumulation de solutés au sein des cellules (Munns et al., 1995). Du fait de leurs toxicités à forte concentration, le Na^+ et le Cl^- devront préférentiellement s'accumuler au sein du compartiment vacuolaire (Parihar et al., 2015). Ceci implique cependant de réguler le potentiel osmotique du cytosol, ce qui n'est possible qu'avec l'accumulation de solutés qui n'altèrent pas les activités enzymatiques du cytoplasme (Olias et al., 2009). Si le K^+ est un soluté jouant un rôle dans l'ajustement osmotique cellulaire, nous avons vu que son absorption était compromise en situation de stress salin. La plante pourra alors avoir recours à des solutés organiques qualifiés de « compatibles » dont les plus fréquemment mentionnés dans la littérature sont la proline, la glycine bêtaïne ou les sucres non réducteurs (Mansour and Ali, 2017). Outre le fait qu'ils présentent un pouvoir de solubilité élevé, ces composés sont souvent peu coûteux à produire et sont susceptibles de pouvoir être remétabolisés après disparition du stress (à l'exception notable de la glycine bêtaïne) (Munns et al., 2020). Ils ont également des fonctions protectrices, notamment en se fixant aux membranes biologiques ou aux protéines et en permettant de conserver leur structure tridimensionnelle dans une situation de réduction des teneurs en eau (Yeo et al., 1991). Ce processus d'ajustement osmotique présente un coût, et peut donc se faire au détriment de la croissance de la plante et requiert en outre un certain temps (Munns, 2005).

2.4.4 Effets sur le métabolisme

Toutes les propriétés physiologiques sont susceptibles d'être affectées par la salinité. Les effets à court terme se manifestent au bout de quelques minutes à quelques heures après l'exposition. A plus long terme, les plantes présentent une réduction de croissance qui peut être due à une réduction de l'élongation des cellules et/ou à une réduction des taux de divisions cellulaires. Une modification des cinétiques d'élongation peut être associée à une altération du statut hydrique conduisant à une réduction de la pression de turgescence (Morton et al., 2019). Une altération de la structure pariétale résultant d'une modification de la synthèse des polymères peut impacter les coefficients d'extensibilité et la turgescence de seuil (Zheng et al., 2019).

La photosynthèse est sensible à la présence de NaCl . Tant la phase claire que la phase sombre sont altérées dans des conditions de stress salin. Le sel réduit les teneurs en pigments photosynthétiques (la Chl a et la Chl b ne présentant pas nécessairement le même niveau de sensibilité) (Wang et al., 2019). Le stress salin a par ailleurs un effet négatif sur la stabilité du PSII. A dose élevée, le sel peut conduire à une altération structurelle des chloroplastes et à la

perte d'intégrité des membranes thylakoïdiennes (Zörb et al., 2019). La fermeture des stomates consécutive à la composante hydrique du stress salin a déjà été évoquée. À terme, une réduction des teneurs en K^+ au niveau des cellules de garde et des cellules annexes peut avoir un impact sur les cinétiques de régulation stomatique alors qu'au niveau de feuilles en cours de différenciation, le sel peut avoir un impact sur la densité des stomates (Yeo et al., 1991). Les enzymes du cycle de Calvin peuvent être impactés par la présence de NaCl, de même que les activités enzymatiques impliquées au niveau du cytosol dans le métabolisme des sucres (Bhuiyan et al., 2017).

Le stress salin a un impact sur le statut hormonal des plantes : pour ce paramètre plus encore que pour les autres, il est parfois difficile de faire la différence entre ce qui résulte d'une tentative d'adaptation et ce qui constitue un symptôme de dégâts. Une surproduction d'éthylène observée en conditions de stress peut être liée à une accélération des processus de sénescence. Une production d'acide abscissique est à rapprocher d'une fermeture des stomates mais il est aujourd'hui clairement établi que l'ABA intervient dans les processus de transduction conduisant à l'expression de gènes de résistance (Rabbani et al., 2003). Une modification des teneurs en polyamines et en cytokinines peut également être analysée à la lumière d'une modification du cycle cellulaire ayant un impact sur les taux de division (Ghanem et al., 2011).

Le stress salin induit un stress oxydatif secondaire lié à la surproduction de composés d'oxygène actif. Ce point a été évoqué au niveau des effets de l'As. Rien n'indique que les modalités de formation des composés d'oxygène actif suivent les mêmes cinétiques mais la nature de ces composés (anions superoxydes, radical hydroxyle, peroxyde d'hydrogène, etc.) est identique et les stratégies de protection antioxydante mise en place (antioxydants endogènes et enzymes antioxydantes) sont comparables (Bose et al., 2014). En conditions de stress salin, le chloroplaste est un site important de production de composés d'oxygène actif en raison des perturbations qu'induit le Na^+ au niveau des chaînes de transport des électrons (Bhuiyan et al., 2017).

2.4.5 Mécanismes de résistance connus et plantes halophytes

Il existe de grandes différences entre les espèces en ce qui concerne la résistance à la salinité. Au sein d'une même espèce, les cultivars diffèrent également pour leur niveau de résistance au sel. Le stress salin étant un stress complexe agissant à de multiples niveaux au sein de la plante, la résistance est souvent considérée comme un caractère polygénique pour lequel la sélection est ardue.

Certains mécanismes de résistance existant dans le règne végétal sont liés à l'expression de protéines appartenant à 3 "familles" différentes : les SOS, NHX et HKT. Les protéines de ces familles affectent la mobilité du Na^+ au sein des tissus et sont donc essentiels à sa séquestration ainsi qu'à son extrusion. Les protéines de la famille SOS comprennent des antiports : SOS1 est localisé au niveau du plasmalemm, alors que SOS2 et SOS3 sont des protéines régulatrices agissant en amont. SOS1 est une protéine d'extrusion : elle est présente au niveau des racines et extrude le Na^+ dans le sol, principalement au niveau des pointes méristématiques où les possibilités de séquestration vacuolaire sont limitées.

À l'inverse des espèces « glycophytes », les plantes « halophytes » sont naturellement résis-

tantes à la salinité et poussent sur des sols caractérisés par une conductivité électrique importante. Il a été démontré que les enzymes des espèces halophytes ne sont pas plus résistantes au sel que celles des espèces glycophytes. La résistance à la salinité des halophytes est donc associée à une compartimentation plus efficace (Yeo et al., 1991; Munns et al., 2020). Les protéines SOS sont aussi exprimées dans la tige de certaines de ces espèces au niveau d'organes spécialisés formés pour stocker le sel et réduire les dommages qu'il peut occasionner. Ces organes, appelés glandes salines, sont essentiellement des trichomes modifiés. Ces cellules spécialisées sont faites pour accumuler de grande quantité de sel ou de l'excréter vers le milieu extérieur. Dans les deux cas, les protéines SOS sont impliquées dans le chargement des trichomes et dans l'extrusion par les biais des glandes saline. Les individus du genre *Atriplex* sont d'ailleurs des plantes possédant des glandes salines (Rathinasabapathi, 2000; Munns, 2002; Parihar et al., 2015).

Les protéines de la famille HKT sont réparties en 2 classes : les HKT1 de classes 1 sont des transporteurs spécifiques de Na^+ qui retiennent de plus en plus l'attention, tandis que les HKT1 de classe 2 sont des symports de K^+ et Na^+ . Les HKT1 de classe 2 sont en général responsables du maintien d'un ratio Na^+/K^+ favorable à la plante, évitant ainsi les symptômes liés à la déficience en K^+ . Certains membres de cette famille assurent l'export de Na^+ hors du xylème (xylem retrieval), limitant ainsi le chargement xylémien (Zhu et al., 2017). Les plantes résistantes à la salinité présentent souvent des adaptations particulières au niveau de l'expression des gènes codant pour ces transporteurs. Enfin les protéines de la famille des NHX, elles, sont liées aux mécanismes de séquestration vacuolaire. Les protéines NHX sont des échangeurs Na^+/H^+ qui sont exprimés au niveau de la vacuole et de l'épiderme racinaire. Une réaction commune des plantes soumises à un stress par le Na^+ est de compartimenter le Na^+ en l'accumulant au sein de la vacuole. Un gradient électrochimique est maintenu par le biais de pompes à protons. Ce gradient sert de force motrice aux protéines NHX qui transfèrent le Na^+ depuis le cytoplasme vers la vacuole. Ces mêmes protéines sont exprimées au niveau de l'épiderme racinaire et permettent l'extrusion racinaire de Na^+ (Cf. Figure 8) (Luan et al., 2009; Zhang and Shi, 2013).

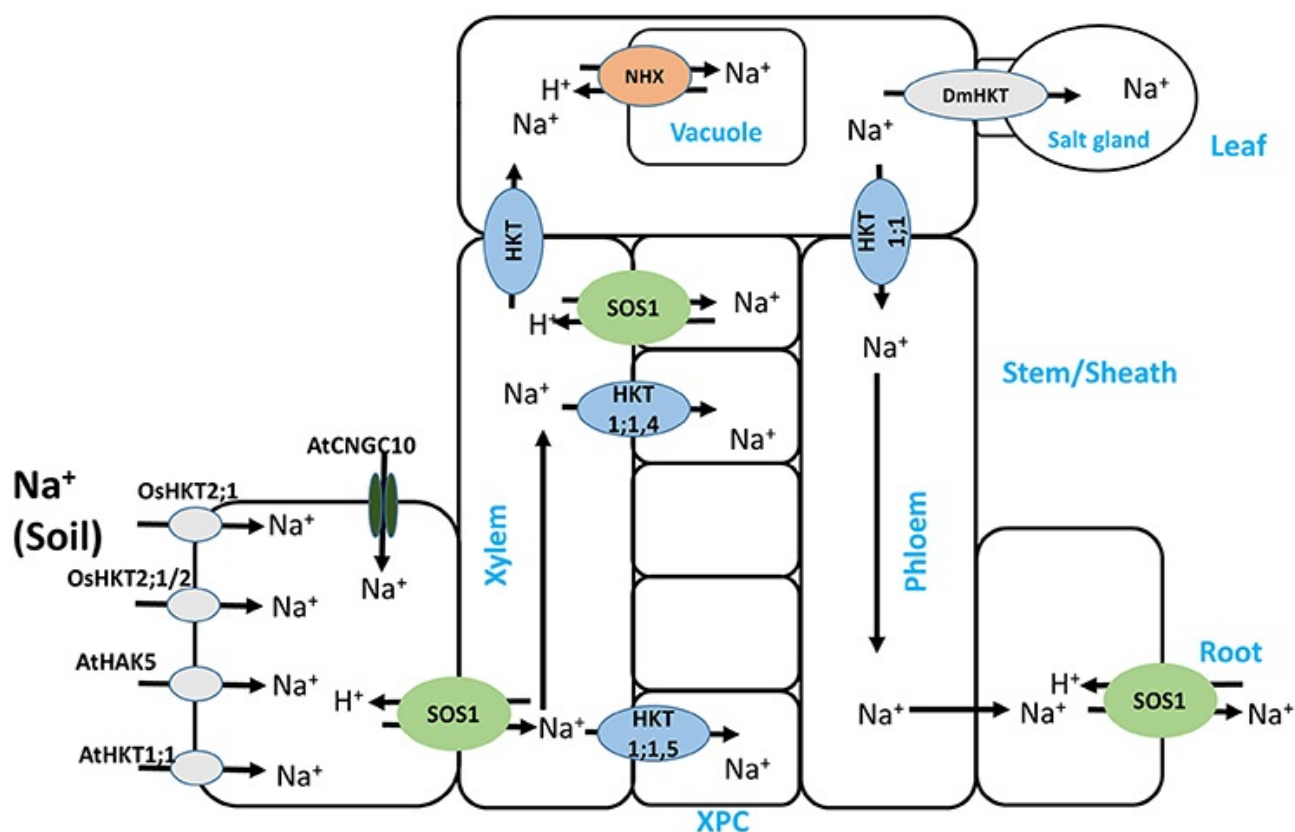


FIGURE 8 – Schéma représentatif des flux de transports de sodium dans une plante glycophyte, HKT : high-affinity K⁺ transporter, SOS1 : salt overly sensitive proteins antiporteur 1, NHX : Sodium Proton Antiporter, XPC : parenchyme xylémien (Assaha et al., 2017)

Les espèces résistantes au sel présentent une cinétique rapide d'ajustement osmotique ainsi qu'une gestion optimale des stress oxydatifs. Ceci implique une meilleure stabilité des structures intracellulaires, particulièrement au niveau du plasmalemmes et des chloroplastes (Morton et al., 2019).

2.5 Toxicité et stress multiples

Dans leur environnement naturel, les plantes sont rarement soumises à une seule contrainte. Ainsi, les plantes exposées à la sécheresse sont aussi soumises à une température élevée et à une luminosité importante (Chen et al., 2008). Dans la nature, ces différents stress peuvent intervenir simultanément ou de façon séquentielle. Ils peuvent varier dans le temps selon des cinétiques qui leur sont propres. La plante doit pouvoir gérer cette complexité environnementale et mettre en place, dans la mesure du possible, une réponse adaptée (Atkinson et al., 2013). Les études sur les stress multiples sont demeurées peu nombreuses jusqu'il y a quelques années, comparativement aux études consacrées aux contraintes individuelles (Mittler, 2006; Suzuki et al., 2014). Beaucoup de ces études utilisent l'espèce modèle *Arabidopsis thaliana* qui ne permet pas de prendre en considération des différents paramètres de rendement.

Des stress abiotiques distincts peuvent agir au niveau de paramètres identiques. Ainsi, tous les stress abiotiques ont un impact sur le statut hydrique de la plante et induisent un stress oxydatif secondaire (Rizhsky et al., 2002, 2004; Mittler, 2006). Ces paramètres physiologiques sont eux-mêmes complexes et constituent l'expression ultime d'un ensemble de propriétés qui

peuvent être affectées selon des séquences différentes en réponse à des stress distincts. Dans cette optique, il n'est pas étonnant de constater qu'un mécanisme précis peut contribuer à une réponse appropriée pour la résistance à des stress distincts. C'est le cas de la proline et d'autres composés osmoprotecteurs surproduits en présence de diverses contraintes, ou des enzymes impliquées dans la gestion des stress oxydatifs (Suzuki et al., 2014; Atkinson et al., 2013). Ces observations sont encourageantes dans la mesure où cette possibilité d'agir sur un nombre limité de gènes clés permettrait aux améliorateurs de sélectionner pour la résistance aux stress multiples. Outre les gènes impliqués dans l'osmorégulation et dans la gestion du stress oxydatif, la prise en considération de gènes codant pour des facteurs de transcription, de certains récepteurs, de gènes impliqués dans le métabolisme des flavonoïdes ou dans des modifications de la chromatine est suggérée par (Shaik and Ramakrishna, 2013, 2014).

Il ne faudrait pas pour autant en conclure que toutes les contraintes agissent de façon additive. Les interactions entre les contraintes peuvent dépendre des cinétiques et des séquences d'exposition. Paoletti and Grulke (2010) ont ainsi démontré que si une plante est soumise à la sécheresse, elle aura tendance à fermer ses stomates et sera moins sensible à une exposition ultérieure à l'ozone. Mais à l'inverse, les plantes soumises d'abord à l'ozone seront affectées dans le mécanisme de fermeture des stomates et deviendrait plus sensibles à une sécheresse ultérieure.

Les approches « omiques » ont permis de souligner que pour la plante, le stress multiple est parfois vécu comme une situation spécifique : des gènes particuliers sont induits par une combinaison de sel et de mercure chez *Suaeda salsa* alors qu'aucun de ces gènes ne s'exprime en réponse à des contraintes appliquées séparément (Liu et al., 2013). Des facteurs de transcription spécifiques à des stress multiples sont également rapportés (Iyer et al., 2013; Atkinson et al., 2013; Rizhsky et al., 2004). Kissoudis et al. (2014) insistent sur le fait que les contraintes multiples peuvent entraîner des modifications épigénétiques particulières par le biais de pattern de méthylation et d'acétylation spécifiques.

Dans le plus simple des cas, les effets des contraintes peuvent être additifs, mais ils peuvent également être synergiques si l'une des contraintes, en affaiblissant la plante, la rend plus sensible à une seconde contrainte. Ce cas de figure sera souvent observé lorsque l'une des contraintes est un stress biotique (Atkinson et al., 2013). Les effets imposés par des contraintes différentes peuvent toutefois être antagonistes. C'est un cas, amplement documenté dans la littérature, des plantes soumises à un stress hydrique et à une augmentation des teneurs en CO₂ atmosphérique et qui, du fait de cette augmentation, pourront poursuivre une activité photosynthétique en dépit d'une fermeture partielle des stomates, augmentant de ce fait leur efficience d'utilisation de l'eau (Roden and Ball, 1996). le CO₂ a dans ce cas une action antagoniste vis-à-vis de la sécheresse.

Les toxicités minérales qui nous intéressent dans le cadre de ce mémoire ne sont pas souvent étudiées. Nous ne disposons pas d'information de la littérature concernant une interaction NaCl x As x B comme celle que nous envisageons ici. L'une de leur particularité tient au fait que l'intensité des contraintes peut varier en fonction des équilibres chimiques qui conditionnent la biodisponibilité en relation avec les propriétés de spéciation et les phénomènes de précipitation. Ainsi, chez le riz, une exposition à la toxicité ferreuse induit à la surface de la racine une plaque d'oxyde de fer qui protégera la plante d'une absorption d'As (Vromman et al., 2013). Des

interactions entre éléments peuvent également se manifester au niveau des sites d'absorption du fait d'une compétition pour des transporteurs membranaires peu sélectifs. Enfin, certains métaux lourds comme le nickel, pourraient servir à l'ajustement osmotique de plantes exposées à la sécheresse si une séquestration vacuolaire de ces éléments intervient (Bhatia et al., 2005).

2.6 *Atriplex atacamenis*

Atriplex atacamensis est un buisson vivace dioïque appartenant à la famille des Amaranthacées. Le genre *Atriplex* est distribué partout dans le monde, mais l'espèce *Atriplex atacamensis* est endémique du désert de l'Atacama. Ce genre comprend de nombreuses espèces adaptées aux climats arides et semi-arides dont plusieurs espèces présentent une photosynthèse en C4. De nombreuses espèces du genre *Atriplex* sont des plantes halophytes, et la résistance à la salinité peut être mise en relation avec la présence de trichomes à la surface des feuilles. Ces trichomes peuvent séquestrer des ions Na^+ en excès et protéger le mésophylle d'une accumulation potentiellement néfaste (Belkheiri and Mulas, 2013; Smaoui et al., 2011). Ces plantes présentent également une bonne capacité d'ajustement osmotique et produisent souvent de fortes concentrations de glycine bêtaïne dont le rôle protecteur est avéré, particulièrement au niveau des chloroplastes (Bajji et al., 1998; Hassine et al., 2008; martinez et al., 2003; Martinez et al., 2004, 2005).

A. atacamensis peut atteindre une hauteur de 3 m. Les buissons sont souvent lignifiés et très ramifiés. Les feuilles sont ovales et ont une disposition alterne et un contour ondulé : leur longueur n'excède pas 25 mm en longueur et 5 à 15 mm en largeur. La graine (1,3 à 1,5 mm de diamètre) possède un tégument brun, elle est protégée par les bractées coriaces de la fleur femelle. Celles-ci sont ovales et soudées à leur base. Elles sont généralement plus larges (4 à 6 mm) que longues (3 à 4,5 mm) et de couleur beige (Rosas, 1989).

Les populations d'*A. atacamensis* sont exposées à des conditions particulièrement rigoureuses. Elles se retrouvent à proximité de rares nappes phréatiques ou cours d'eau (Betancourt et al., 2000). Ainsi, on voit apparaître d'importantes colonies d'*A. atacamensis* dans les fonds de vallées et au bord des rivières qui traversent le désert, comme les rivières Camarones, Camiña, Tarapacá, et Loa (Rosas, 1989). Dans son environnement, la plante est exposée à des intensités lumineuses très importante, des températures très élevées et un stress hydrique fréquent. Le substrat sur lequel évolue *A. atacamensis* présente une conductivité électrique élevée, et des teneurs très importantes en B et en As. Les études de Tapia et al. (2013, 2018) montrent que l'As sur ces sols est très fortement biodisponible ce qui est en partie lié à un pH élevé, un faible contenu en matière organique, une teneur élevée en oxydes de fer et une texture sableuse. Díaz et al. (2011) confirment qu'*A. atacamensis* a un bon niveau de résistance à l'As comparativement à d'autres espèces (*Pluchea absinthioides*, *Lupinus microcarpus*) présentes dans la zone.

Vromman et al. (2011) rapportent qu'en solution nutritive, la plante peut survivre à une dose de 1 mM d'arséniate. Dans ces conditions, la plante réduit fortement son flux transpiratoire en fermant ses stomates. Les teneurs d'As accumulées par la plante peuvent atteindre $400 \mu\text{g.g}^{-1}$ de matière sèche au niveau des parties aériennes et jusqu'à $3500 \mu\text{g.g}^{-1}$ de matière sèche au niveau des racines. L'As réduit les teneurs en P mais stimule fortement l'accumulation de glycine bêtaïne et en polyamines. Ces études montrent également que l'As n'est pas sécrété

au niveau des trichomes. Dans son milieu naturel, [Vromman et al. \(2016c\)](#) rapportent que *A. atacamensis* accumule plus d'As au niveau des feuilles qu'au niveau des tiges, et que des teneurs non négligeables d'As sont également observées au niveau des bractées entourant les graines.

La présence de sel n'a pas d'effet sur la spéciation de l'As en solution. Au niveau des racines, [Vromman et al. \(2016b\)](#) rapportent que 55% de l'As est présent sous forme réduite (As(III)) et 45% sous forme d'arsenate As(V). Près de la moitié de l'As absorbé s'accumule au niveau des parois. L'addition de sel réduit les teneurs en As au niveau des racines et augmente la translocation d'As des racines vers les parties aériennes. La salinité influence également la spéciation de l'As en augmentant la proportion d'As présent sous forme d'As(V) mais ne modifie pas la distribution de l'As entre l'apoplasme et le symplasme. L'effet du sel se marque également par une augmentation des taux de production d'éthylène et la synthèse de glycine bêtaïne et de thiols non protéiques.

Chez *A. atacamensis*, une carence en P augmente les teneurs en As au niveau des racines, mais a de façon surprenante un effet inverse au niveau des parties aériennes. À l'inverse du sel, le P réduit donc la translocation de l'As au sein de la plante. L'As augmente fortement les teneurs en S ainsi que les concentrations en thiols non protéiques ([Vromman et al. 2017](#)). Une exposition de plantes et de cals issus d'hypocotyle à de l'As(III) est beaucoup plus néfaste à la plante qu'une exposition à l'As(V). [Vromman et al. \(2018\)](#) suggèrent qu'une oxydation d'As(III) en As(V) pourrait intervenir. Une séquestration au niveau des parois s'observe chez les plantes exposées à l'As(V) mais pas chez celles exposées à l'As(III) et les teneurs en thiol-non protéique augmentent plus en réponse à une exposition à l'As(V) qu'en réponse à une exposition à l'As(III).

Outre un bon niveau de résistance à l'As, [Orrego et al. \(2020a,b\)](#) soulignent que *A. atacamensis* présente également un bon niveau de résistance au cuivre : la présence, en plus du cuivre, de doses élevées de NaCl ou d'un stress osmotique induit par le PEG affecte la croissance des plantes mais n'a pas d'effets négatifs sur les teneurs en glutathion.

3 Matériel et méthode

3.1 Matériel végétal

Cette étude a été réalisée à partir de graines d' *Atriplex atacamensis* récupérées sur 4 sites au sein du désert d'Atacama. Ces graines issues d'origines différentes ont chacune subi un test de germination en serres sous conditions contrôlées. Le groupe de graines présentant le taux de germination le plus élevée a été sélectionné pour la suite de l'expérience. Le lot de graine sélectionné provient de la région de Quillagua (21°39' S, 69°32'W). Ces graines ont été semées dans 3 terrines contenant un mélange de sable et de terreau (1 :1, v :v) (cf Figure 9). Les terrines ont été humidifiées une fois par semaine et ont été couvertes par une plaque de verre pour maintenir une humidité relativement élevée, favorisant ainsi la germination. Les graines ont été gardées en terrine pendant 3 semaines.



FIGURE 9 – Bac de semis

Une fois que les plantules ont atteint la taille de 3 cm, elles ont été séparées et placées dans des pots (4 cm x 4 cm) contenant un mélange de terreau, sable et vermiculite (1 :1 :1, v :v :v) par groupe de 3 (cf Figure 10). Ces plantes ont été maintenues pendant 2 semaines en pots, jusqu'à une taille d'environ 8 cm puis ont été transférées dans des bacs en plastiques, de dimension 18cm x 13cm x 9cm, remplis de solutions hydroponiques de Hoegland (cf Figure 13).



FIGURE 10 – Pot de 3 plantules d'*Atriplex atacamensis* 2 semaines après avoir été repiquée en pots

Chaque bac de solution hydroponique contenait 6 plantes maintenues par une plaque de frigolite percée de trous bouchés par de l'ouate (cf Figure 11).



FIGURE 11 – Exemple d'un bac de culture d'*Atriplex atacamensis* en fin d'expérience

Après une semaine d'acclimatation au transfert en solution, les bacs ont été vidés et les traitements ont été appliqués. Toutes les semaines, la solution a été maintenue à niveau par un apport de solution hydroponique classique afin d'éviter un stress hydrique. Au bout d'un mois, la solution a été à nouveau complètement remplacée par la solution contenant les traitements. Au bout de deux mois de culture, les plantes de chaque bac ont été récoltées.

Les cultures ont eu lieu au sein des serres de l'université catholique de Louvain (UCL) en conditions semi-contrôlée. Les cultures ont été soumises à une photo-période de 16h. La lumière d'origine naturelle a été complémentée par des lampes LED de 325 watts afin d'assurer une intensité lumineuse d'environ $100 \mu\text{moles}/\text{m}^2\text{s}$ éclairant dans le bleu/rouge. L'humidité relative était comprise entre 55 et 70% et la température oscillait entre 20 et 30°C.

Deux séries de cultures ont été effectuées au cours de cette étude.

Première culture

Lors de la première culture, les plantes ont été confrontées aux polluants individuels à des doses croissantes afin de déterminer quelle dose engendrait des symptômes sur les individus sans provoquer leur mort. Trois doses ont été testées pour chacun des trois polluants et des témoins ont été préparés à titre de comparaison, pour un total de 10 traitements. Les traitements stressés au NaCl ont été exposés à des concentrations de 100 mg/l, 1000 mg/l, et 10 000 mg/l sous forme de NaCl. Les traitements stressés au bore (B) ont été exposés à des concentrations de 1 mg/l, 10 mg/l, et 100 mg/l sous forme de H_3BO_4 et ceux stressés à l'As ont été exposés à des concentrations de 10 mg/l, 100 mg/l et 1000 mg/l sous forme de $Na_2HAsO_4 \cdot 7H_2O$. Les témoins ainsi que chaque dose ont été répétés 3 fois.

Lors de la récolte, les tiges, feuilles et racines de chaque bac ont été récoltés séparément. La taille ainsi que le poids frais ont été mesurés à la récolte. Les échantillons ont ensuite été séchés à 70°C pendant 48h. Une fois les organes séchés, le poids sec a été déterminé. Les teneurs en éléments minéraux ont ensuite été mesurées à partir de la matière sèche.

Les doses occasionnant des symptômes sans provoquer la mort de tous les individus ont été retenues pour la deuxième expérience. Les doses retenues sont : 10 000 mg/l de NaCl, 100 mg/l d'As et 100 mg/l de B. Une fois les doses choisies, la seconde partie de l'expérience a pu commencer. Après un mois de traitement, les quantités de B administrées dans chaque traitement contenant déjà du B ont été augmentées à 500 mg/l car celui-ci ne semblait occasionner aucun symptôme visuel à la dose de 100 mg/l. Cette dose a été sélectionnée sur base d'une expérience similaire effectuée sur *A. atacamensis* par [Marcelis and Lutts \(2019\)](#) dans le cadre de son mémoire.

Deuxième culture

Une seconde série de cultures en solution a donc été préparée en suivant le protocole énoncé précédemment. Ces bacs ont été exposés, eux, aux différentes combinaisons possibles des 3 stress étudiés aux concentrations sélectionnées. Nous avons, au total, 8 traitements : témoins, NaCl, B, As, B-As, NaCl-As, B-NaCl, B-NaCl-As. Chaque traitement a été répété 5 fois.

Pour 3 des 5 bacs, les feuilles et les racines furent récoltées séparément et immédiatement plongées dans de l'azote liquide. Les tiges n'ont pas été récupérées. Ces échantillons de matière fraîche ont ensuite été conservés à -80°C. Des analyses de teneur en malondialdéhyde (MDA), proline, et Glutathion (GSH) ont été effectuées sur la matière fraîche.

Les racines, tiges et feuilles des 2 bacs restants ont été récoltées séparément. Les mesures de taille et de poids frais ont été faites dès la récolte. L'ensemble a ensuite été séché à 70°C pendant 48h. Une fois séchée, le poids sec des individus a été mesuré et la matière sèche a été conservée à température ambiante jusqu'à être analysée. La composition en éléments minéraux a été déterminée à partir de la matière sèche (cf Figure [12](#)).

Les racines des plantes récoltées sont rincées à l'eau distillée puis séchées avant d'être pesées et plongées dans l'azote liquide.

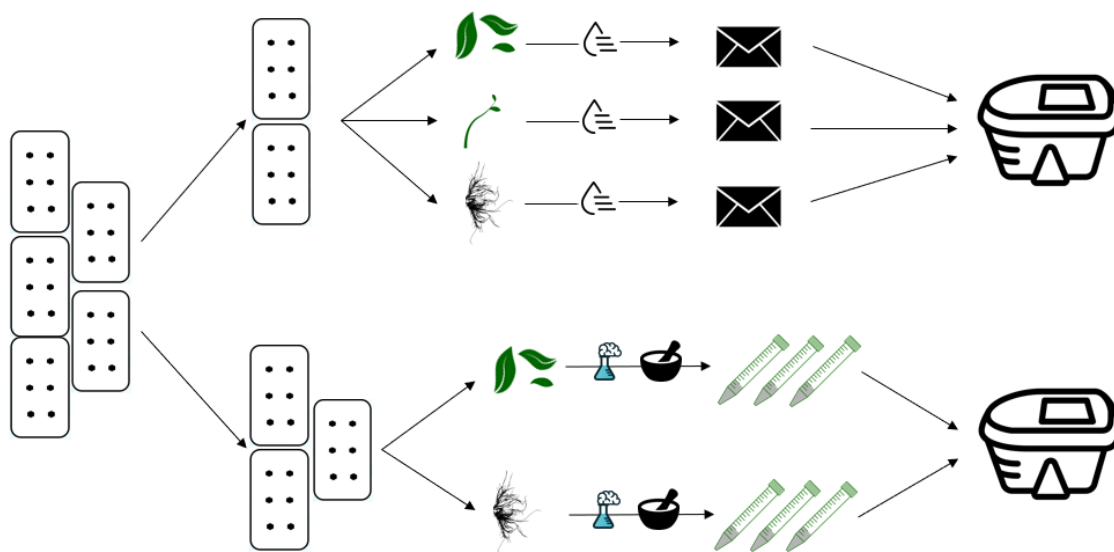


FIGURE 12 – Schéma de récolte des échantillons

Hoagland (6/0,5)		diluée 200 fois	
	Produit	Concentration (g/L)	ds 52 L H ₂ O d
Solution A1	NH ₄ NO ₃	8	260 mL
	Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	82,6	
	KNO ₃	35,7	
Solution B	KNO ₃	5	260 mL
	KH ₂ PO ₄	27,4	
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	24,6	
	MnSO ₄ ·5H ₂ O	0,053	
	H ₃ BO ₃	0,14	
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,015	
	(NH ₄) ₂ MoO ₇ ·4H ₂ O	0,008	
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,06	
Solution de fer	Fe EDDHA	1,87	260 mL

FIGURE 13 – Composition de la solution de Hoegland utilisée comme base pour la culture et l'application des traitements

3.2 Analyse des éléments minéraux

Les échantillons de matière sèche ont tout d'abord été broyés manuellement. Une fois à l'état de poudre, entre 75 et 150 mg de matière sèche ont été pesées et introduites dans un ballon jaugé de 10 ml. Cette matière sèche a été digérée pendant 12h dans 4 ml d'acide nitrique concentré 68%.

L'acide a ensuite été chauffé dans un bain de sable jusqu'à évaporation complète. Les résidus s'étant déposés au fond de chaque ballon jaugé ont été resuspendus dans 2 ml d'un mélange d'acide chloridrique 68% et d'acide nitrique 37% (3 :1,v :v). Les jaugés ont été chauffés jusqu'à décoloration puis portés au trait de jauge avec de l'eau distillée. Le contenu des ballons jaugés a ensuite été filtré à travers un papier filtre Wathman n°1 et récupéré dans des Falcons de 15 ml. Des blancs sont préparés en suivant exactement le même processus, sans matière sèche.

Les Falcons contenant les reliquats sont conservés à température ambiante jusqu'à leurs futurs analyses. Les teneurs en Na^+ et en K^+ ont été mesurées via un spectromètre d'absorption atomique SOLAAR S Series AA. Les teneurs en As et B ont été mesurées par un laboratoire tiers par Spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif (ICP-MS)(Varian, type MPX) .

3.3 Analyses biochimiques

3.3.1 MDA (Heath and Packer, 1968)

250 mg d'échantillons de matière fraîche broyée dans de l'azote ont été pesés et ont été suspendus dans 5 ml d'un mélange d'acide trichloroacétique (5%v) contenant 1,25% de glycérol au sein d'un Falcon de 15 ml. Ces Falcons ont ensuite été centrifugés à 12 000 g pendant 10 minutes à 4°C puis filtrés grâce à un papier wathman n°1. Une fois le filtrat récupéré dans une nouvelle série de Falcon, on prélève 2 ml de ce filtrat qu'on transfère dans une troisième série de Falcon. 2 ml d'acide thiobarbiturique ont été ajoutés à chaque échantillon. Une fois mélangé par vortex, les Falcons ont été incubés au bain-marie pendant 30 minutes à 100 °C. Au bout de cette période ils ont été plongés dans la glace puis centrifugés à 12 000g pendant une minute. Au terme de ces opérations, l'absorbance à 532 et à 600 nm (ABS_{532} , ABS_{600}) a été mesurée par spectrophotometrie via un spectrophotomètre shimadzu uv 1800. La valeur obtenue à 600 nm permet de soustraire l'absorbance due à l'absorbance non-spécifique. le coefficient d'extinction molaire (ϵ) utilisé est $155 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$. La concentration (C_{echant}) dans les échantillons a été calculé suivant la formule suivante. V correspond au volume initial (de 0.005 l) et M correspond à la quantité en gramme de matière fraîche pesée dans l'échantillon.

$$\text{Abs} = \text{ABS}_{532} - \text{ABS}_{600},$$

$$C_{MDA} = \frac{\text{Abs}}{\epsilon},$$

$$C_{echant} = \frac{(C_{MDA} \cdot 2 \cdot V \cdot 1000)}{M}$$

3.3.2 Proline (Bates et al., 1973)

Pour le dosage de la proline, environ 150 mg de matière fraîche broyée a été introduites dans un flacon de 15ml. Cette matière fraîche a été suspendue dans 10 ml d'acide sulfosalicylique puis incubée 30 minutes dans un bain-marie à 70°C. Une fois l'incubation terminée, les échantillons ont été filtrés sur papier wathman n°1. 2 ml du filtrat a été transféré dans des tubes en verre de 10 ml. On a ensuite ajouté 2 ml d'une solution de ninhydrine acide et 2 ml d'acide acétique glacial. L'échantillon a été mélangé par vortex puis incubé pendant une heure à 90°C. Une fois l'incubation terminée, les tubes ont été plongés dans de la glace pour arrêter la réaction. 2 ml de toluène ont été ajoutés puis les échantillons ont été mélangés par vortex pendant 10 secondes. La phase colorée a été prélevée et son absorbance à 520 nm a été déterminée via un spectrophotometre par spectrophotometrie via un spectrophotomètre shimadzu UV 1800.

3.3.3 Glutathion (Cereser et al., 2001)

Le dosage de glutathion s'est fait en deux étapes. Le glutathion total (GSH_{tot}) a d'abord été mesuré puis le glutathion réduit (GSH_{red}). Les concentrations de glutathion oxydé ont été

estimées comme étant le GSH_{tot} moins le GSH_{red} le tout divisé par 2.

préparation des échantillons pour le dosage de GSH_{red}

Pour la préparation des dosages de GSH_{red} pour chaque traitement, 200 mg de matière fraîche préalablement broyée dans de l'azote liquide a été suspendue dans 4ml d'acide métaphosphorique 6% (MPA) puis a été mélangée avec un vortex. 1 ml de cette solution a été prélevé et a été centrifugé à 4°C à 10 000 g pendant 7 minutes.

préparation des échantillons pour le dosage de GSH_{tot}

Pour la préparation des dosages de GSH_{tot} 200 mg de matière fraîche, de chaque traitement, préalablement broyée dans de l'azote liquide a été suspendue dans 500 μ l de tampon Tris (0.1M; pH 8.5) et 1ml de dithiothreitol 25 mM puis a été mélangée à l'aide d'un vortex. Après avoir été laissé 30 minutes dans de la glace, 8ml de MPA a été ajouté à chaque échantillons puis ceux-ci ont été mélangés à l'aide d'un vortex. 1 ml de cette solution a été prélevé et a été centrifugé à 4°C à 10 000 g pendant 7 minutes.

Pour le dosage

pour l'ensemble des échantillons préparé (GSH_{tot} et GSH_{red}) 100 μ l de chaque échantillon a été prélevé puis a été mélangé 100 μ l de O-phthaldialdéhyde (OPA 5%). Après 5 minutes d'incubation, 800 μ l de phosphate de sodium (500mM; pH 7) ont été ajouté puis l'ensemble a été mélangé. Les échantillons ont ensuite été filtré à travers un microfiltre Chromafil PES-45/15 (Macherey-Nagel) de 0.45 μ m et les dérivés d'OPA ont été séparé par un gradient acetonitrile-sodium acetate via un colone HPLC à phase inverse. 5 μ l de chaque échantillons ont été lu par le biais d'un système d'un système HPLC Shimadzu. Après excitation à 340 nm, le glutathion a été dosé à 420 nm par fluorométrie. La concentration a été estimée à l'aide d'une droite de calibration de 9 points établie à l'aide de standard.

3.4 Traitements statistiques

Le traitement statistique des données a été effectué à l'aide du programme R. La version utilisée est R version 3.6.0 (26/04/2019). La normalité des données a été vérifiée par le biais d'un test de Shapiro-Wilk tandis que l'homoscédasticité a été vérifié par le biais d'un test de Bartlett. Afin de déterminer si les traitements ont eu un effet, une ANOVA à un seul facteur a été appliquée lorsque la normalité ainsi que l'homogénéité des variances étaient respectées, L'ANOVA a ensuite été suivie d'un test de Tukey. Dans le cas où les conditions d'application de l'ANOVA n'étaient pas respectées, un test non-paramétrique (le test de Kruskal-Wallis) a été effectué et a été suivi par un test de Dunnett T3.

4 Analyse des résultats

4.1 Résultats du 1er quadrimestre : Détermination de la dose létale

4.1.1 Taux de mortalité

Le B ne semble pas influencer sur le taux de mortalité. Ce taux reste équivalent aux témoins peu importe la dose. Le traitement sel semble réduire le taux de mortalité tandis que le taux de mortalité des traitement à l'As a tendance à augmenter avec la dose. La mortalité au niveau du traitement As 100 mg/l est 4 fois plus élevé qu'au niveau des témoins (cf Figure 14). L'entièreté des individus exposés au traitement As 1000 mg/l sont morts une semaine après avoir été exposé aux traitements.

		Taux de mortalité [%]
Témoins		5.6
NaCl	100 mg/L	0.0
	1000 mg/L	0.0
	10 000 mg/L	0.0
B	1 mg/L	5.6
	10 mg/L	5.6
	100 mg/L	5.6
As	10 mg/L	0.0
	100 mg/L	22.2
	1000 mg/L	100.0

FIGURE 14 – Taux de mortalité mesuré lors de la récolte après 2 mois de traitement en solution hydroponiques. Les individus morts des trois répétitions de chaque traitement ont été comptés ensemble et le taux de mortalité a été calculé sur les 18 (6 plantes x 3 bacs) plantes impliquées dans chaque traitements

4.1.2 Taille des individus

Aucune différence significative au niveau des tailles n'a été constatée (cf Figure 15). À titre d'observation, dans chacun des réplicats, on pouvait observer la présence d'un individu chétif ainsi que d'un individu visiblement plus développé que les autres. La présence de ces individus augmente la variance et rend difficile de faire la distinction entre les traitements compte tenu que la taille moyenne oscille autour de valeurs proches.

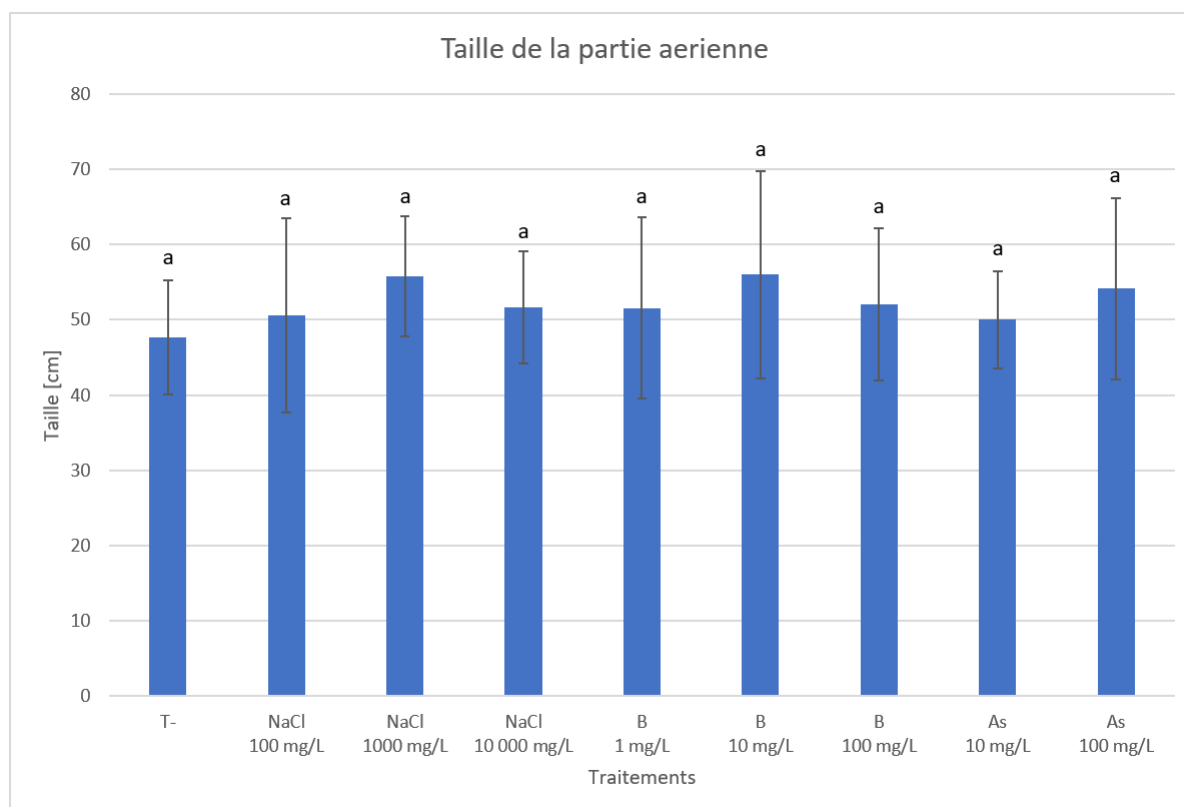


FIGURE 15 – Taille moyenne des parties aériennes après 2 mois de traitement en solution hydroponique pour chaque traitement. Chaque valeur correspond à la moyenne de 3 réplicats. Les barres verticales correspondent aux écarts types standards. Les lettres au-dessus des écarts-types indiquent les résultats de l'analyse statistique. Des lettres différentes signifient des résultats significativement différents pour une p-valeur de 0,05. Le traitement As 1000 mg/l n'est pas représenté car tous les individus sont morts.

4.1.3 Poids frais

La figure 16 montre les mesure de poids frais obtenue durant l'expérience préliminaire du premier quadrimestre. Le poids frais des individus a été mesuré. On peut remarquer qu'aucun des traitements à "faible dose" (NaCl 100 mg/l, B 1 mg/l, As 10 mg/l) n'induit de changement au niveau du poids frais des individus dans aucune des sections de la plante.

Le sel a une influence positive sur le poids frais à partir d'une dose de 1000 mg/l aussi bien au niveau des racines que au niveau des tiges et des feuilles. Cet effet ne semble pas plus important dans le traitement NaCl 10 000 mg/l.

Le traitement B 100 mg/l a une influence positive sur au niveau du poids frais des racines et des tiges. Il semble aussi y avoir une influence positive sur les feuilles mais cette tendance au niveau des feuilles n'est pas significative.

Le traitement As 100 mg/l quand à lui semble augmenter le poids frais de chaque partie mais cette mesure n'est pas significativement différente.

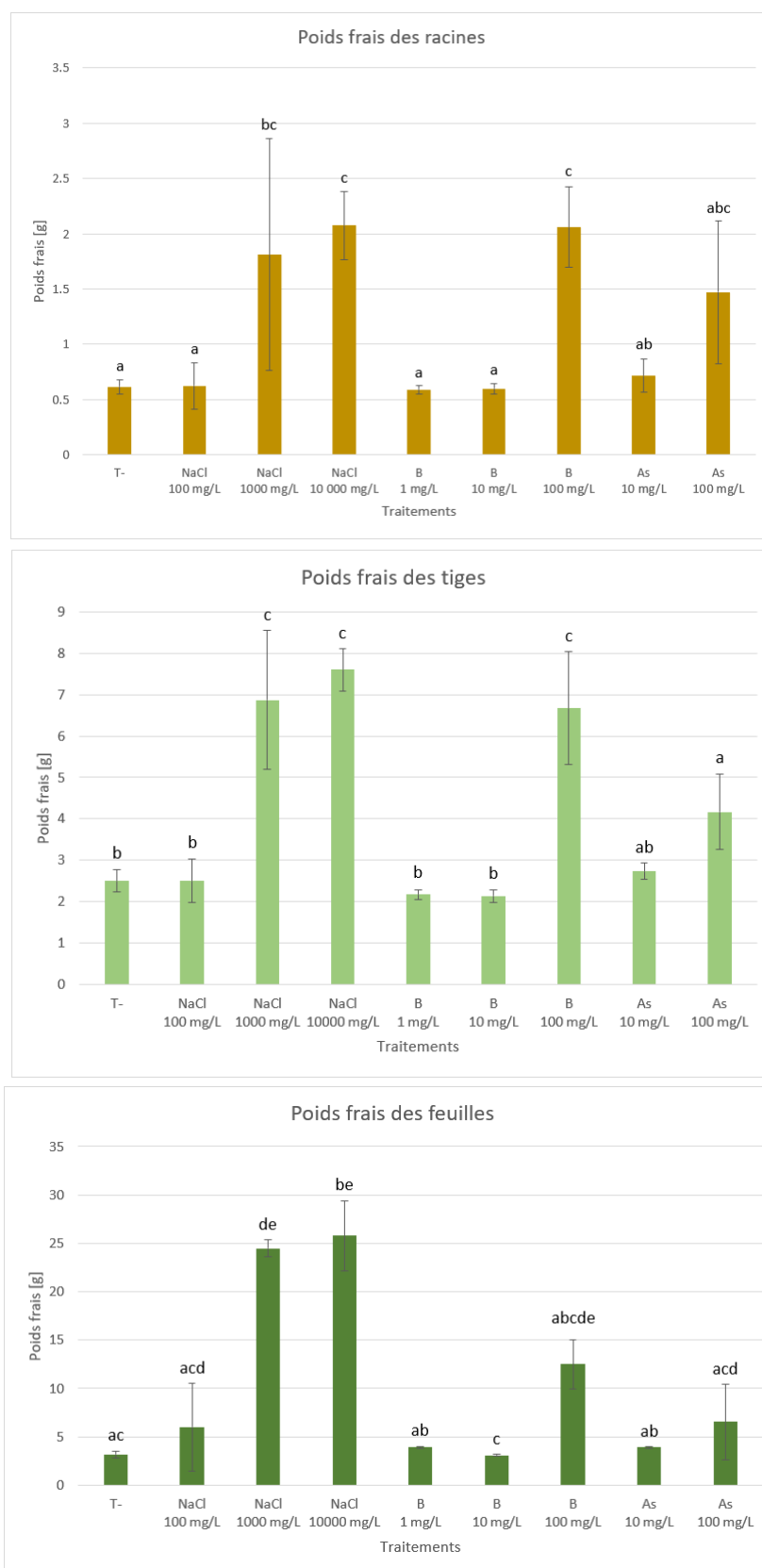


FIGURE 16 – Poids frais moyen des racines, des tiges et des feuilles après 2 mois de traitement en solution hydroponique pour chaque traitement. Chaque valeur correspond à la moyenne de 3 réplicats. Les barres verticales correspondent aux écarts types standards. Les lettres au-dessus des écart-types indiquent les résultats de l'analyse statistique. Des lettres différentes signifient des résultats significativement différents pour une p-valeur de 0,05.

4.1.4 Poids sec

La Figure 17 nous permet de voir qu'au niveau des racines, on ne constate pas de différences significatives entre les traitements au niveau du poids sec mais il semble y avoir une baisse non-significative de la masse des racines dans les cas des traitements NaCl 10 000 mg/l, B 100 mg/l et As 100 mg/l.

les résultats obtenus sur les tiges montrent que le poids sec des tiges ne semble pas affecté peu importe le traitement et on ne peut en dégager aucune différence significative.

Quant aux feuilles, on constate une augmentation significative du poids secs des feuilles par rapport aux autres traitement en présence de NaCl 10 000 mg/l. On peut aussi voir qu'en présence de B 1 mg/l le poids sec des feuilles est inférieur à celui des autres traitements . Les autres traitements sont équivalents entre eux et aux témoins .

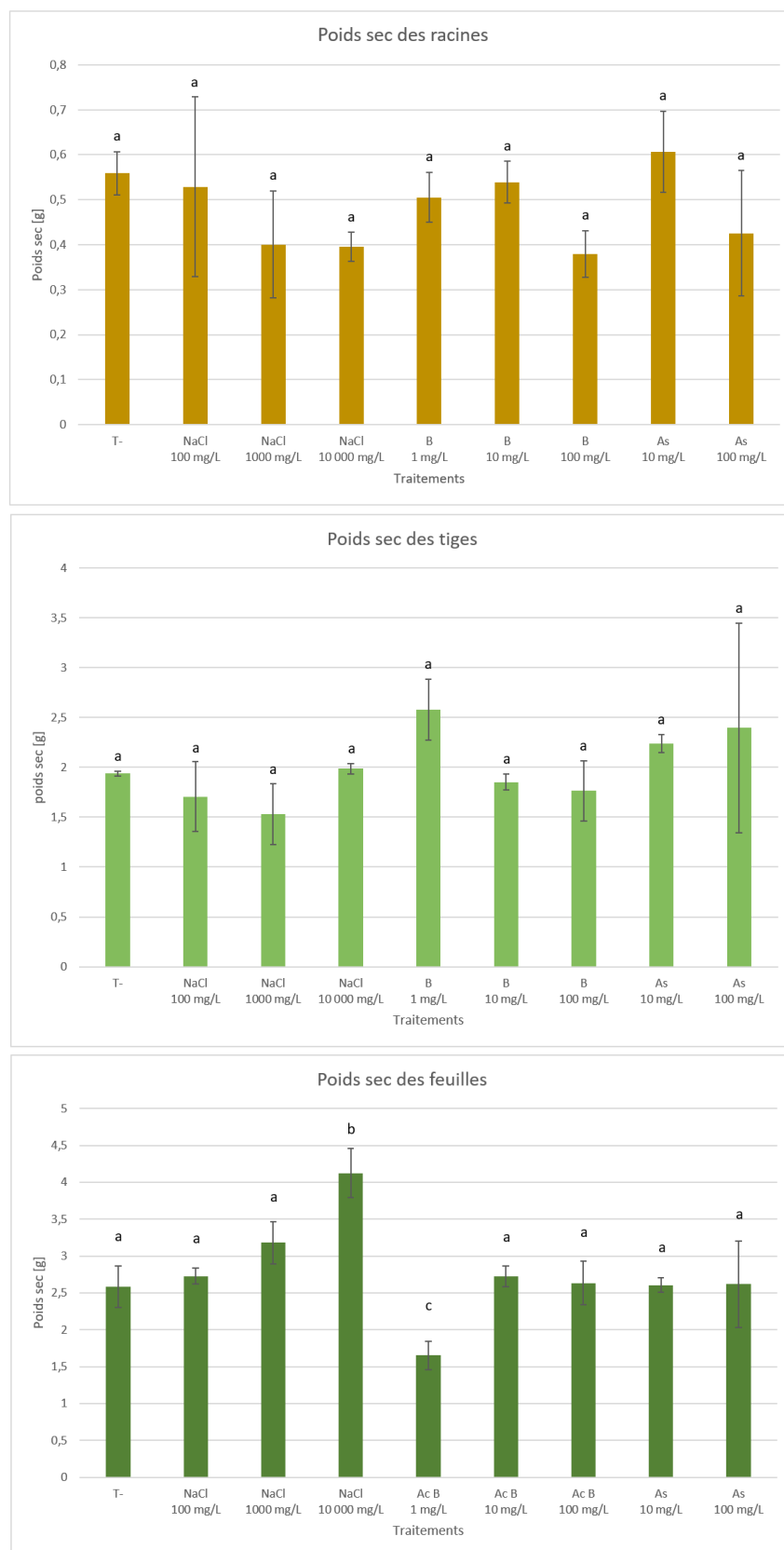


FIGURE 17 – Poids sec moyen des racines, des tiges et des feuilles après 2 mois de traitement en solution hydroponique pour chaque traitement. Chaque valeur correspond à la moyenne de 3 réplicats. Les barres verticales correspondent aux écarts types standards. Les lettres au-dessus des écart-types indiquent les résultats de l'analyse statistique. Des lettres différentes signifient des résultats significativement différents pour une p-valeur de 0,05. Le traitement As 1000 mg/l n'est pas représenté car tous les individus sont morts.

4.1.5 Teneur en éléments minéraux

Teneur en As

Sur la figure 18, on remarque qu'il y a une quantité d'éléments minéraux plus élevée d'As dans les racines des traitements As 10 mg/l et 1000 mg/l que dans les témoins. La quantité d'éléments minéraux se trouvant dans le traitement 1000 mg/l est plus importante que celle du traitement 10 mg/l. On ne peut cependant rien affirmer vis à vis du traitement As 100 mg/l. La concentration en As est plus élevée dans les traitement As 1000 mg/l que dans les 10 mg/l.

La concentration en As au niveau des tiges augmente à mesure que l'intensité du traitement appliqué augmente.

Au niveau des feuilles, les traitements exposés à l'As en possèdent significativement plus que le témoin mais ne sont pas distinguables entre eux. Les racines, les tiges et les feuilles du traitement As 1000 mg/l ne pouvant être récoltées séparément. Les plantes entières ont été récoltées et traitées ensemble. Le résultat du traitement As 1000 mg/l est comparé aux racines car les concentrations en As est du même ordre de grandeur.

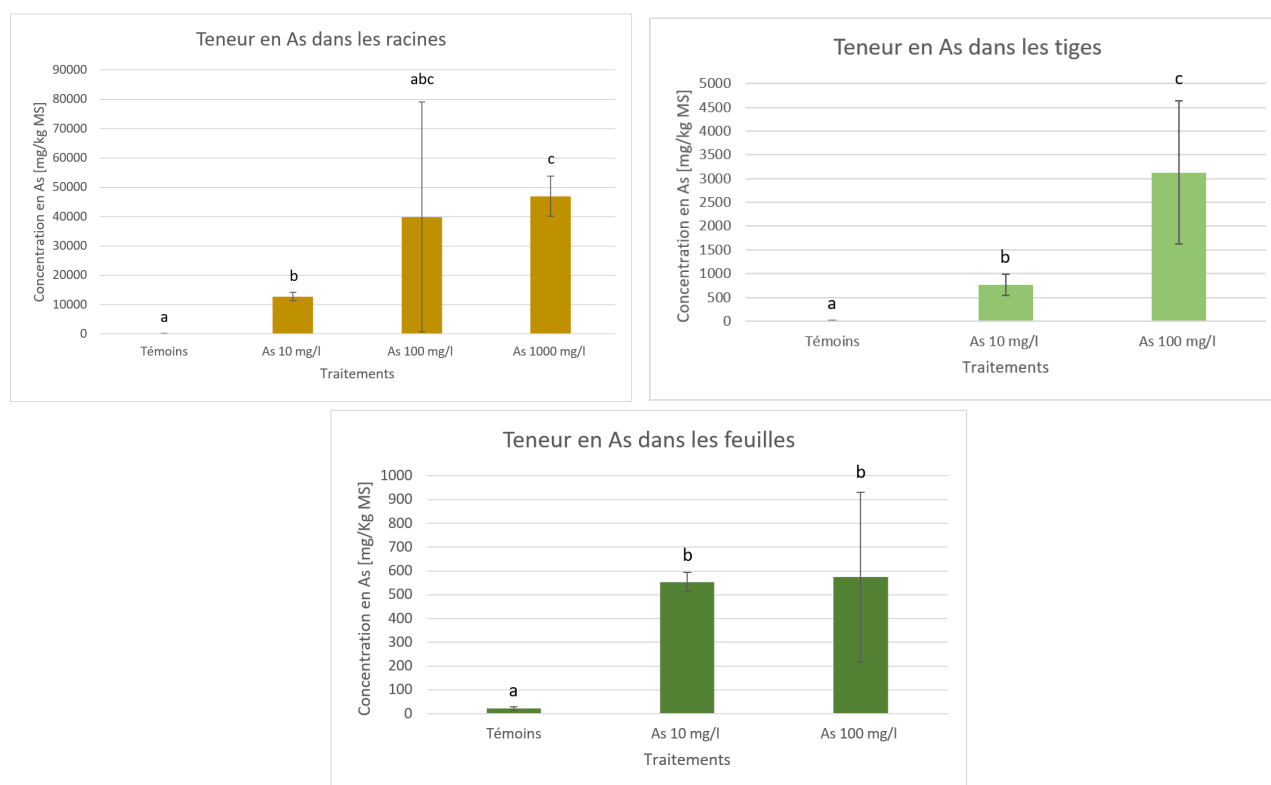


FIGURE 18 – Concentration moyenne en As dans les racines, les tiges et les feuilles en mg d'As par kg de matière sèche après 2 mois de traitement en solution hydroponique. Chaque valeur correspond à la moyenne de 3 réplicats. Les barres verticales correspondent aux écarts types standards. Les lettres au-dessus des écart-types indiquent les résultats de l'analyse statistique. Des lettres différentes signifient des résultats significativement différents pour une p-valeur de 0,05.

Teneur en B

Comme nous le montre la Figure 19, les concentrations en B racinaire augmentent avec l'apport de B mais semblent atteindre un plateau à partir du traitement 10 mg/l. Les teneurs en B dans les traitements 10 mg/l et 100 mg/l ne sont pas significativement différentes et semblent accumuler des quantités similaires.

Le traitement 1 mg/l n'induit pas de différence significative vis à vis des témoins au niveau de l'accumulation de B dans les tiges tandis que les traitements 10 mg/l et 100 mg/l accumulent davantage de B que les témoins mais il n'est pas possible d'affirmer une différence entre ces deux traitements.

Enfin, on remarque que les concentrations en B foliaire augmentent à mesure que la dose augmente.

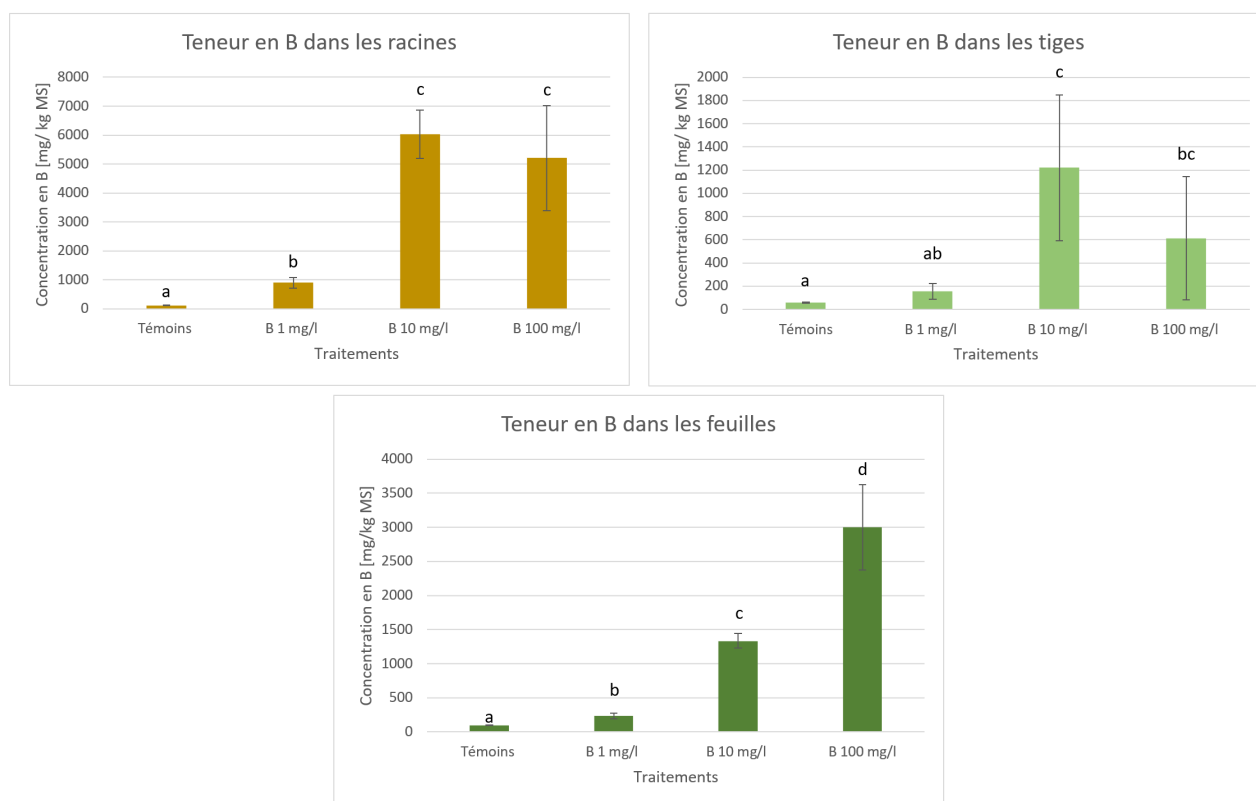


FIGURE 19 – Concentration moyenne en B dans les racines, les tiges et les feuilles en mg de B par kg de matière sèche après 2 mois de traitement en solution hydroponique. Chaque valeur correspond à la moyenne de 3 réplicats. Les barres verticales correspondent aux écarts types standards. Les lettres au-dessus des écart-types indiquent les résultats de l'analyse statistique. Des lettres différentes signifient des résultats significativement différents pour une p-valeur de 0,05.

Teneur en Na^+

On remarque que la concentration en Na^+ dans les différentes parties de la plante augmente avec la dose de sel (cf Figure 20).

On peut constater qu'il y a davantage de Na^+ dans les feuilles que dans les racines dans le cas du traitements 1000 mg/l mais que cette tendance s'inverse dans le cas du traitement 10 000 mg/l.

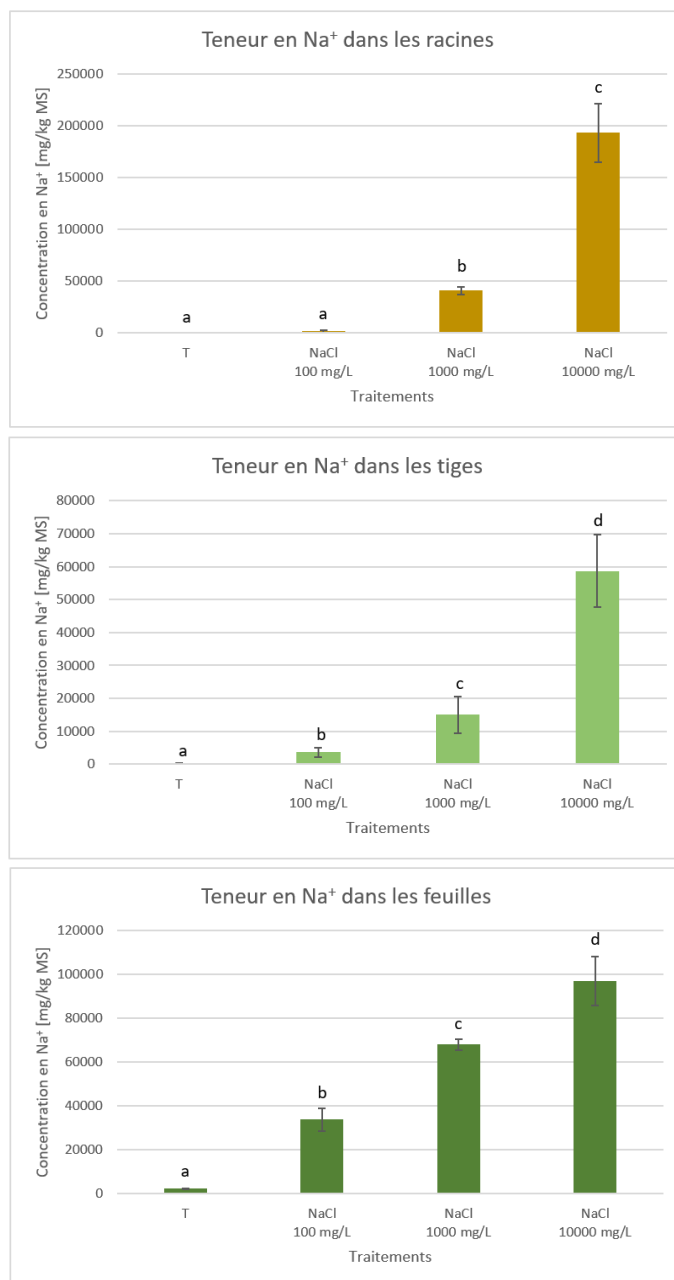


FIGURE 20 – Concentration moyenne en Na^+ dans les racines, les tiges et les feuilles en mg de Na^+ par kg de matière sèche après 2 mois de traitement en solution hydroponique. Chaque valeur correspond à la moyenne de 3 réplicats. Les barres verticales correspondent aux écarts types standards. Les lettres au-dessus des écart-types indiquent les résultats de l'analyse statistique. Des lettres différentes signifient des résultats significativement différents pour une p-valeur de 0,05.

Teneur en K^+

Aucune différence significative ne peut être faite au niveau des racines

L'effet du NaCl sur les concentrations en K^+ dans les tiges est peu marqué et il n'est pas possible de distinguer les traitements des témoins.

Dans les feuilles, on remarque que les concentrations en K^+ sont inférieure à celle des témoins mais que les concentrations des deux traitements ne peuvent être distinguées. Les traitements NaCl 10 000 mg/l présentent la valeur moyenne la plus basse. (cf Figure 21) .

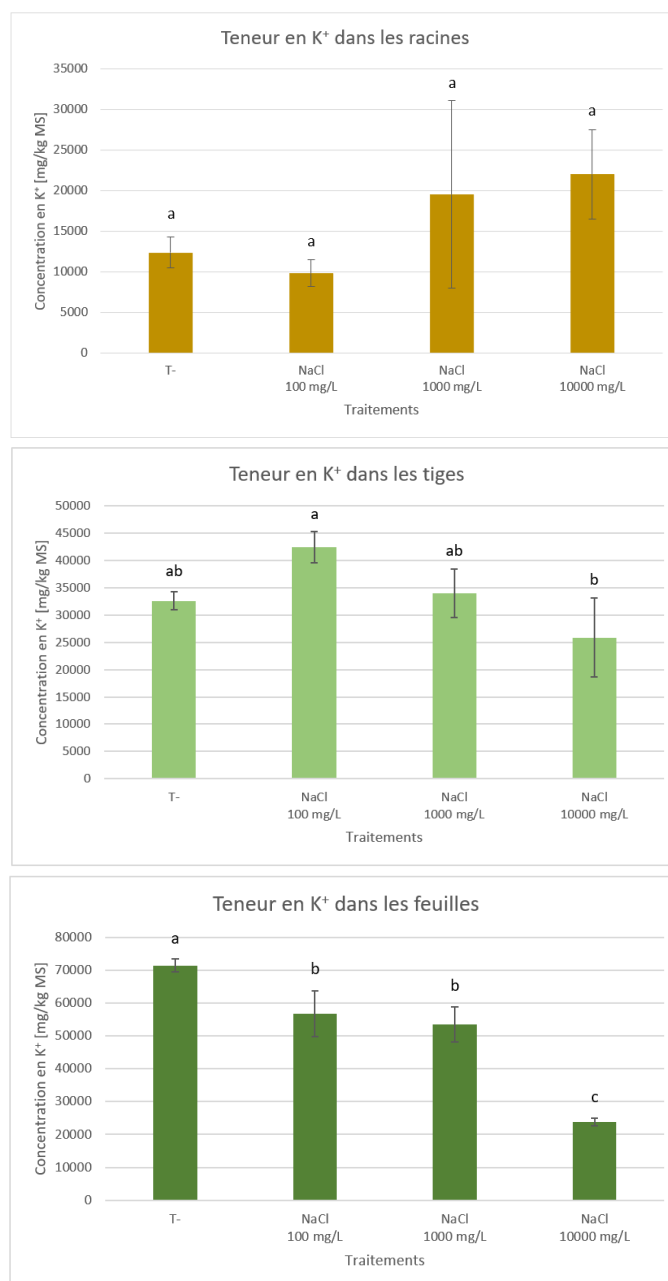


FIGURE 21 – Concentration moyenne en K^+ dans les racines, les tiges et les feuilles en mg de K^+ par kg de matière sèche après 2 mois de traitement en solution hydroponique. Chaque valeur correspond à la moyenne de 3 réplicats. Les barres verticales correspondent aux écarts types standards. Les lettres au-dessus des écart-types indiquent les résultats de l'analyse statistique. Des lettres différentes signifient des résultats significativement différents pour une p-valeur de 0,05.

4.2 Résultats du deuxième quadrimestre : Réponse à un stress combiné

4.2.1 Poids frais

Au niveau de la partie racinaire : on ne peut pas dégager de différence significative avec les témoins à l'exception du traitement As-NaCl. On peut aussi remarquer que le traitement NaCl a un poids frais significativement plus élevé que les traitements As, B, B-NaCl et B-As. Il y a une augmentation non-significative du poids frais des traitements NaCl et As-B-NaCl (All) comparativement aux témoins. La présence de sel semble occasionner une augmentation du poids frais dans les traitement sauf dans le cas du B-NaCl (cf Figure 22).

Pour les tiges, on ne peut pas dégager de différence significative entre les traitements et les témoins. La seule différence notable à noter est que le traitement NaCl a un poids frais supérieur a celui des traitements As, B, B-NaCl et B-As.

Quant aux poids frais des feuilles, le traitement NaCl est encore une fois le traitement avec la valeur moyenne la plus élevée et son poids frais est significativement plus important que celui des autres traitements. Les traitements contenant du B semblent être affectés et voient leurs poids frais baisser à l'exception du traitement All.

On peut remarquer au niveau des racines et des feuilles que la présence de NaCl semble augmenter le poids frais des traitements excepté dans le cas des traitement B-NaCl qui restent équivalents aux traitements B seul. Le B quant à lui semble induire une baisse du poids frais. Ces effets observés sont par contre moins marqués au niveau des tiges.

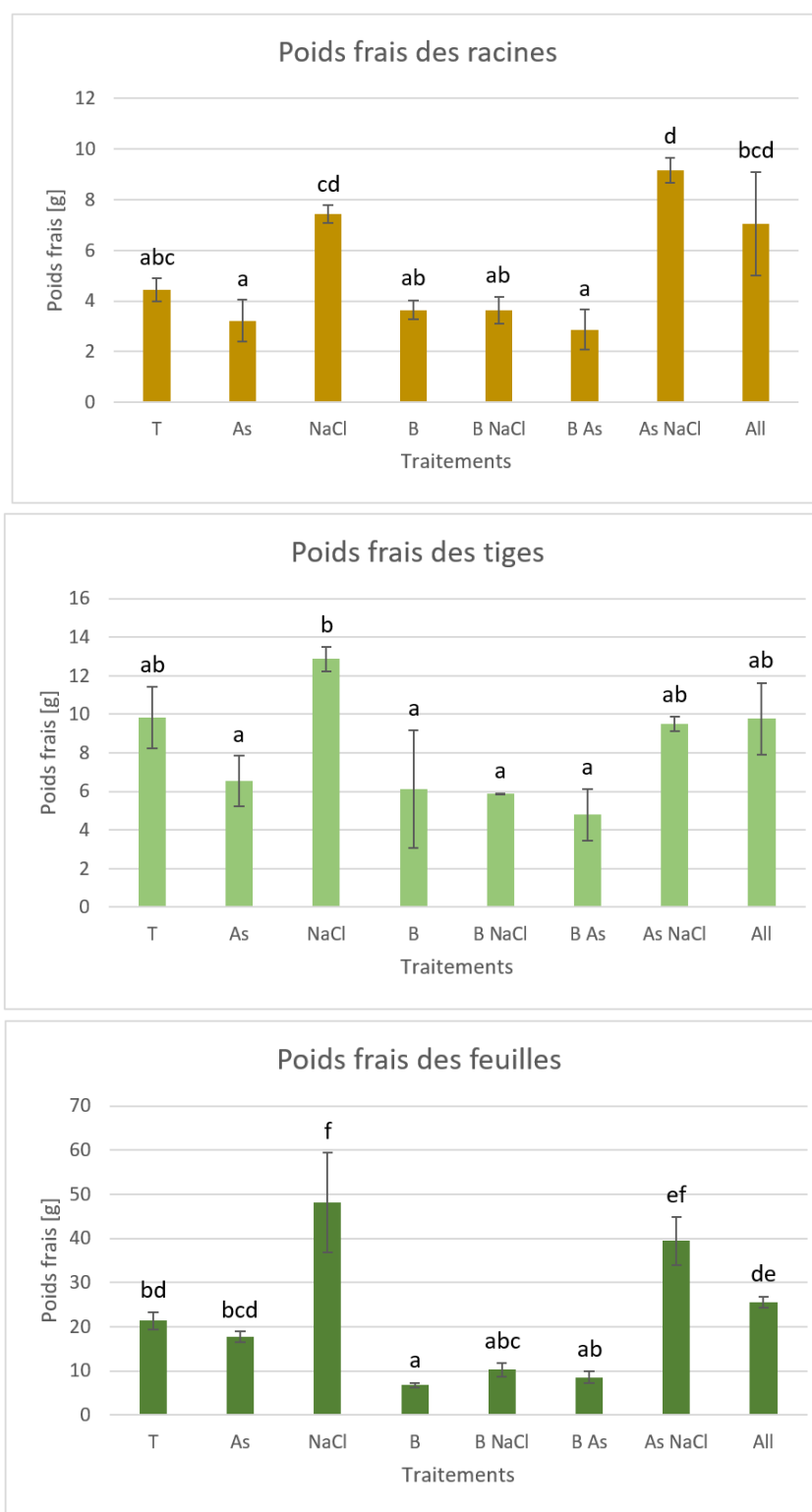


FIGURE 22 – Poids frais moyen des racines, des tiges et des feuilles en grammes après 2 mois de traitement en solution hydroponique pour chaque traitement. Le traitement "All" correspond à l'application de B, sel et As. Chaque valeur correspond à la moyenne de 2 réplicats. Les barres verticales correspondent aux écarts types standards. Les lettres au-dessus des écart-types indiquent les résultats de l'analyse statistique. Des lettres différentes signifient des résultats significativement différents pour une p-valeur de 0,05.

4.2.2 Poids sec

La présence de B au niveau des racines réduit le poids sec tandis que le NaCl entraîne une augmentation du poids sec . L'As ne semble pas avoir d'effet (cf Figure 23).

La seule différence significative au niveau des tiges est que le traitement NaCl à un poids sec supérieur au traitement B mais aucune autre distinction ne peut être faite.

Pour l'analyse du poids sec dans les feuilles, on peut voir un net effet positif du traitement Na sur le poids sec en comparaison des témoins. De même, les comparaisons des paires de traitements As :As-NaCl et B :As-NaCl mettent en avant un effet positif du sel.

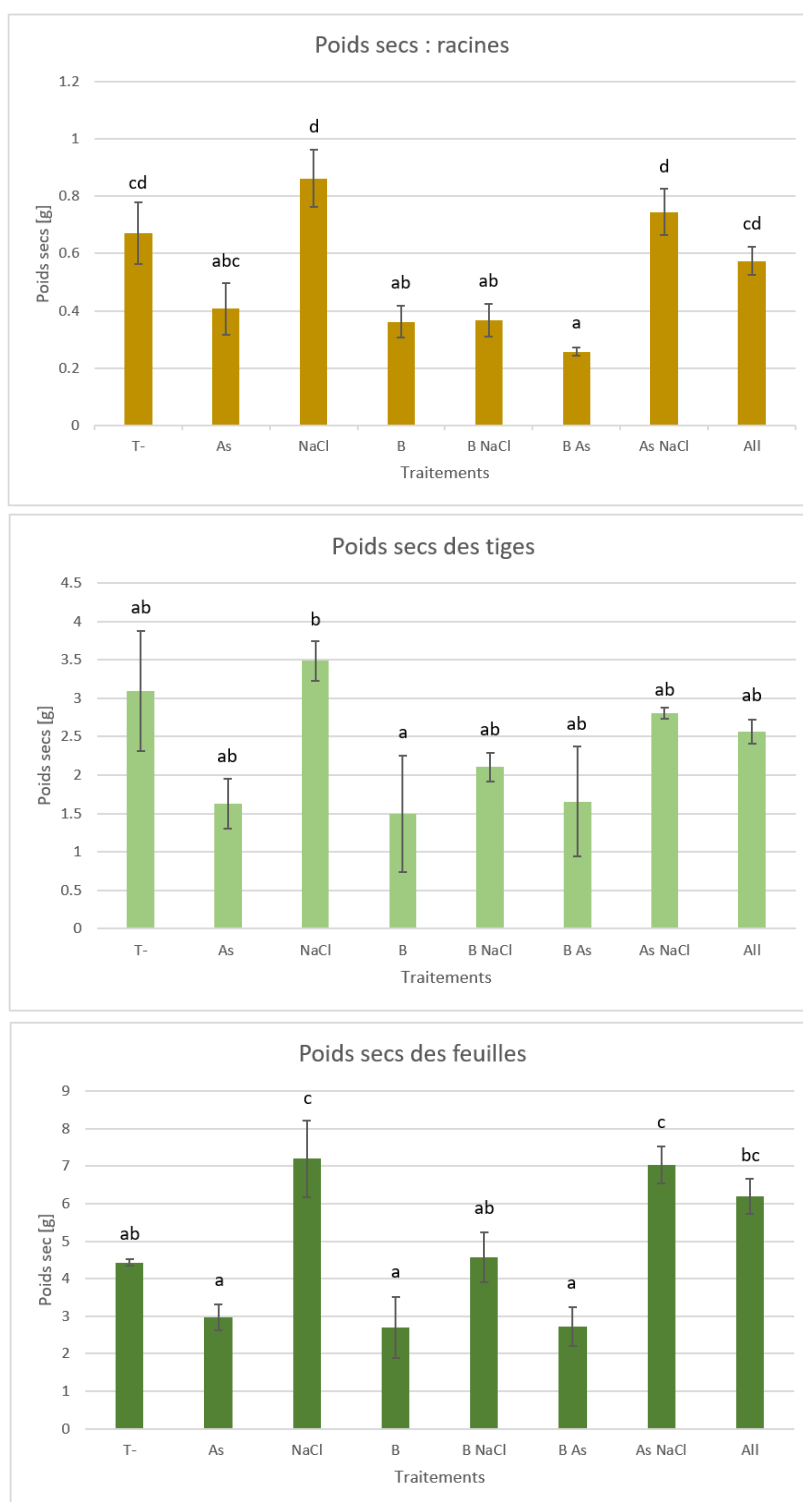


FIGURE 23 – Poids sec moyen des racines, des tiges et des feuilles en grammes après 2 mois de traitement en solution hydroponique pour chaque traitement. Le traitements "All" correspond à l'application de B, sel et As. Chaque valeur correspond à la moyenne de 2 réplicats. Les barres verticales correspondent aux écarts types standards. Les lettres au-dessus des écart-types indiquent les résultats de l'analyse statistique. Des lettres différentes signifient des résultats significativement différents pour une p-valeur de 0,05.

4.2.3 Teneur en éléments minéraux

Teneur en As

La base de référence prise pour effectuer des comparaison dans le cas des teneur en As représentées en Figure 24 est le traitement As. La présence de NaCl dans le traitement a tendance à diminuer la quantité d'As retrouvé dans les différentes parties de la plante comme on peut le voir en comparant les teneurs en As dans les traitements As et As-NaCl. Cet effet peut aussi être remarqué en comparant les traitements B-As et All. On constate aussi que le traitement B-As semble accumuler plus d'As que le traitement exposé uniquement à de l'As mais que cette tendance ne peut être affirmée.

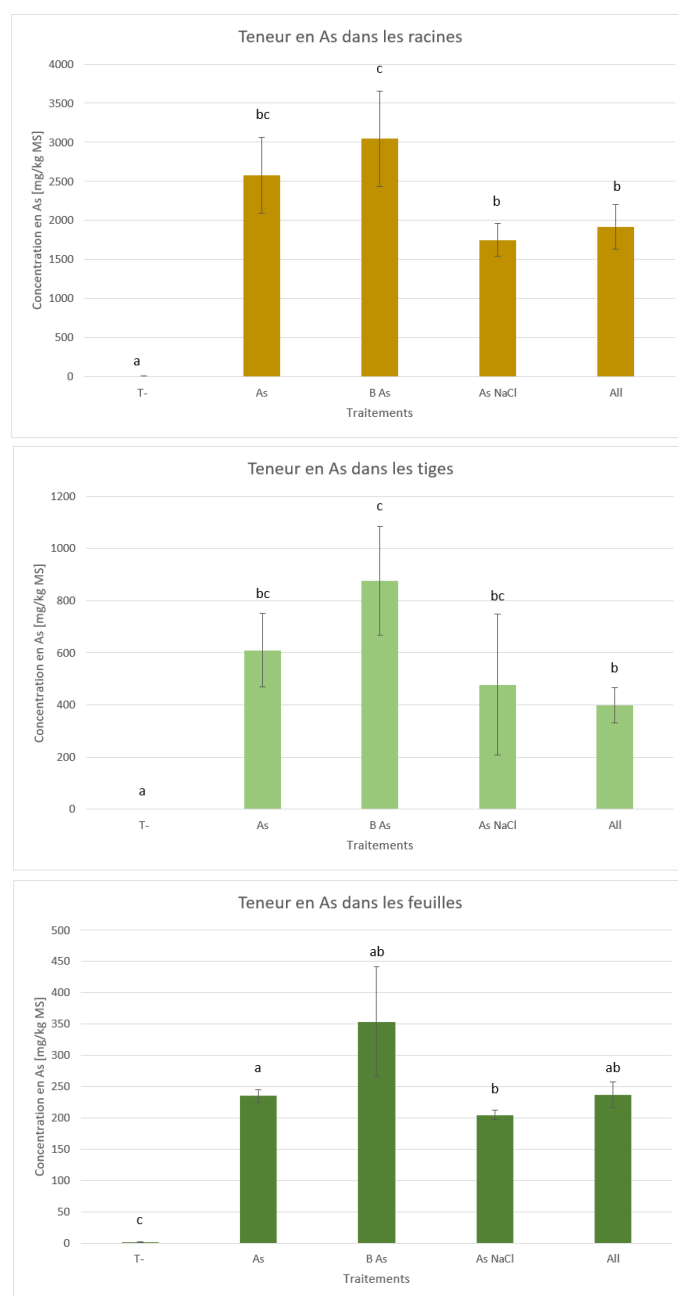


FIGURE 24 – Teneur moyenne en As dans les racines, les tiges et les feuilles en mg d'As par kg de matière sèche après 2 mois de traitement en solution hydroponique pour chaque traitement contenant de l'As. Le traitement "All" correspond à l'application de B, sel et As. Chaque valeur correspond à la moyenne de 4 réplicats. Les barres verticales correspondent aux écarts types standards. Les lettres au-dessus des écarts-types indiquent les résultats de l'analyse statistique. Des lettres différentes signifient des résultats significativement différents pour une p-valeur de 0,05.

Teneur en B

La base de référence prise pour effectuer des comparaison dans le cas des teneurs en B est le traitement B.

Les teneurs en B des racines (montrées en Figure 25) traités à la fois par du B et du NaCl accumulent une quantité plus faible de B qu'avec le traitement B seul. Les traitements All ont une concentration significativement plus élevée en B que les traitements B. Un effet similaire est observé dans le cas des traitements B-As mais cette tendance n'est pas significative.

Comparativement au traitement B, pour le cas des tiges, la présence d'As et de B combinés ne semble pas avoir d'effet sur les teneurs mesurées. Le traitement All ne peut être distingué du traitement B ni du traitement B-As. On remarque cependant que la concentration est nettement plus élevée dans le cas du traitement B-NaCl.

Les concentrations en B dans les feuilles sont plus importantes dans les traitements combinés que de le traitement simple. La concentration est maximale dans le cas du traitement B-NaCl mais les traitement B-As et All présentent eux aussi une teneur en B significativement plus importante.

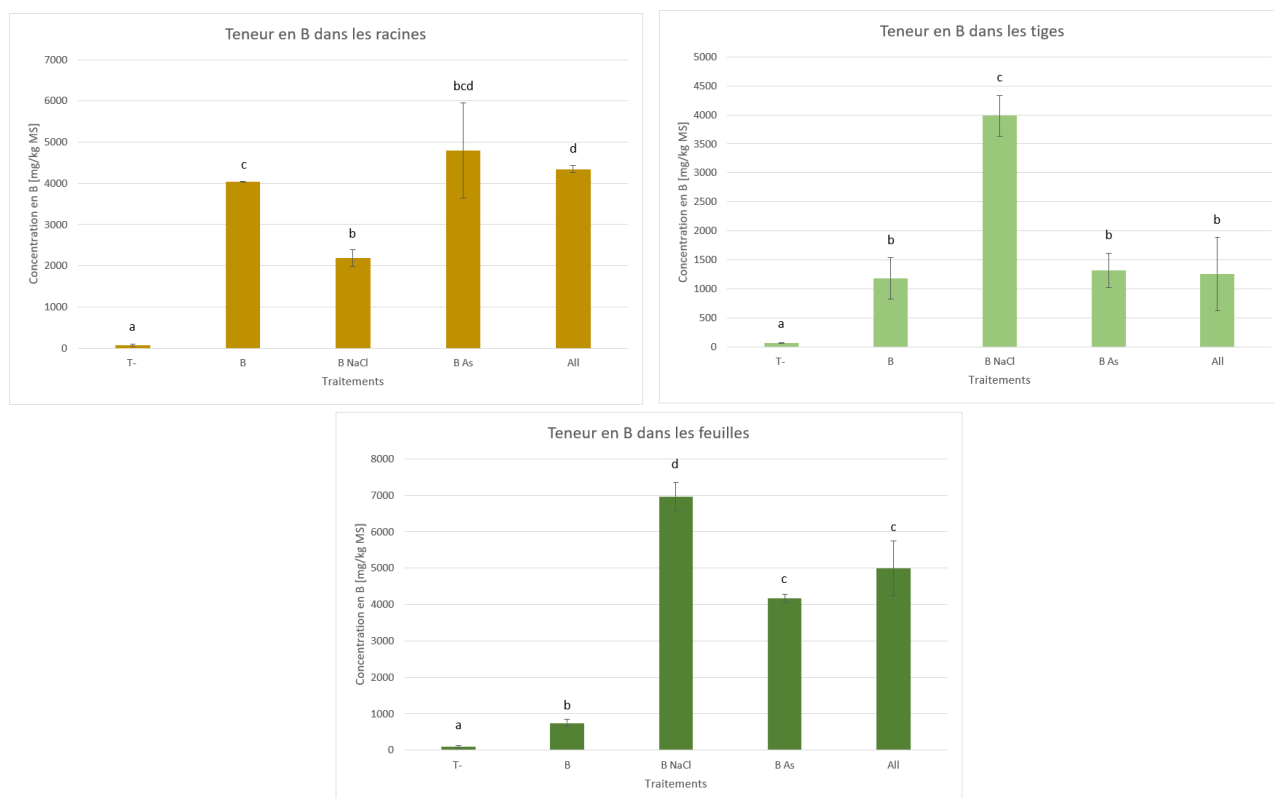


FIGURE 25 — Teneur moyenne en B dans les racines, les tiges et les feuilles en mg de B par kg de matière sèche après 2 mois de traitement en solution hydroponique pour chaque traitement contenant du B. Le traitement "All" correspond à l'application de B, sel et As. Chaque valeur correspond à la moyenne de 4 réplicats. Les barres verticales correspondent aux écarts types standards. Les lettres au-dessus des écart-types indiquent les résultats de l'analyse statistique. Des lettres différentes signifient des résultats significativement différents pour une p-valeur de 0,05.

Teneur en Na^+

Pour les résultats en teneur de Na^+ , on peut constater au niveau des racines (cf Figure 26) qu'il y a significativement plus de Na^+ dans tous les traitements contenant du NaCl que dans les témoins. Il n'y a cependant pas de distinction faisable entre les autres traitements.

Au niveau des tiges, l'addition de B semble entraîner une augmentation de la teneur en Na^+ comme on peut le constater en comparant le traitement NaCl et le traitement B-NaCl. Cette tendance ne semble, par contre, pas maintenue dans le cas du traitement All. Les traitements All et As-NaCl ne sont pas significativement différents du traitement NaCl.

Au niveau des feuilles, L'ajout d'As semble augmenter la concentration en Na^+ . Il n'y a pas de différence de concentration entre le traitement NaCl et le traitement B-NaCl. Il y a une baisse significative de la teneur en Na dans le cas du traitement All par rapport à ces deux traitements. Cet effet semble apparaître lorsqu'on compare les traitements NaCl et As-NaCl mais la différence n'est pas significative. Dans le cas du traitement As, la teneur en Na^+ est aussi significativement plus élevée que celle des témoins mais moindre que celle des traitements contenant du NaCl.

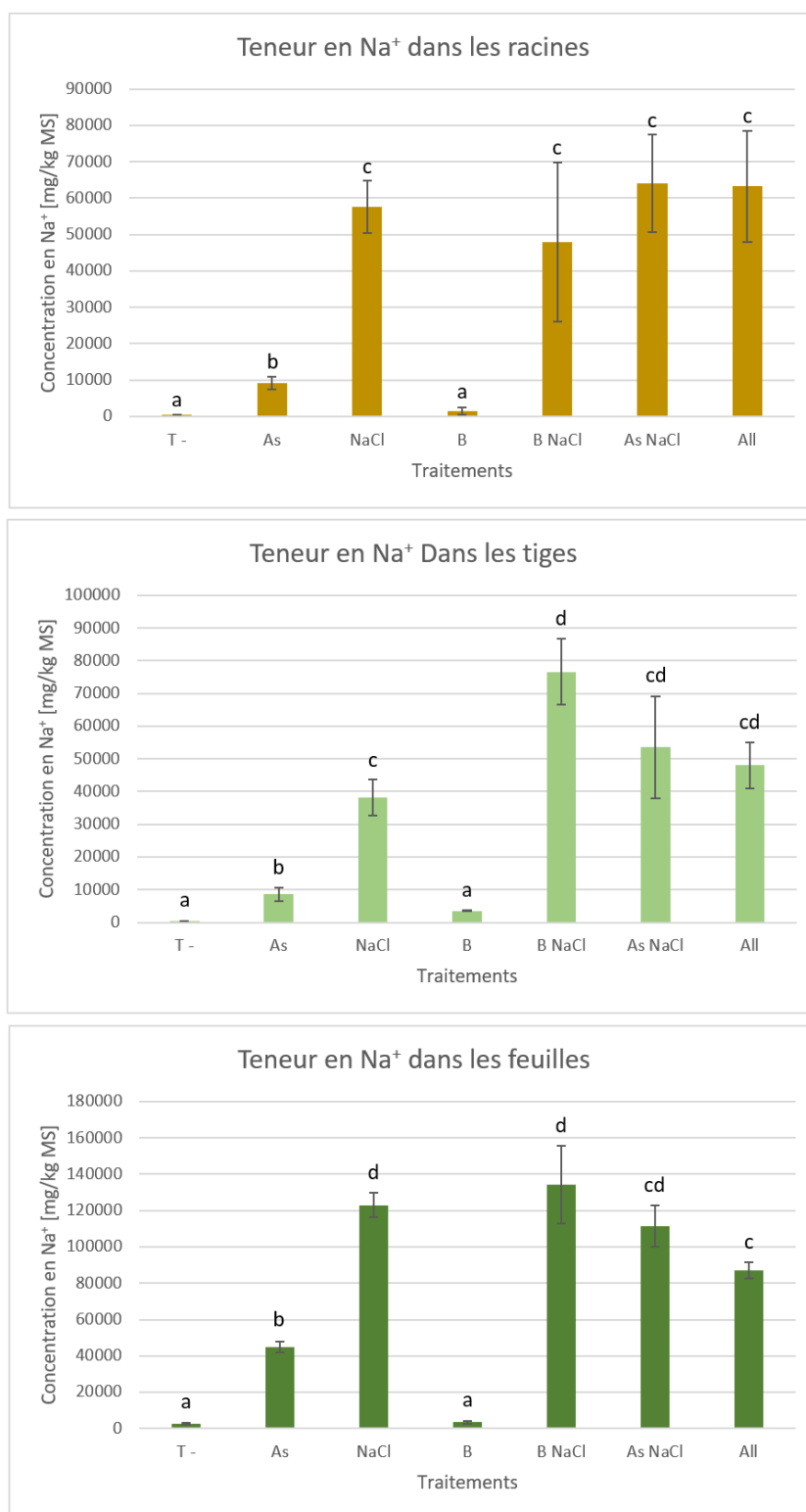


FIGURE 26 – Teneur moyenne en Na⁺ dans les racines, les tiges et les feuilles en mg de Na⁺ par kg de matière sèche après 2 mois de traitement en solution hydroponiques pour chaque traitement. Le traitements "All" correspond à l'application de B, sel et As. Chaque valeur correspond à la moyenne de 4 réplicats. Les barres verticales correspondent aux écarts types standards. Les lettres au-dessus des écart-types indiquent les résultats de l'analyse statistique. Des lettres différentes signifient des résultats significativement différents pour une p-valeur de 0,05.

En regardant les teneurs en K^+ Figure 27, on remarque que les traitements n'occasionnent pas d'effets significatifs, au niveau des racines, sauf dans le cas du traitement B-NaCl, qui a une concentration en K^+ significativement plus faible que les autres traitements à l'exception du cas As-NaCl.

Au niveau des tiges, la présence d'As n'a pas d'effet sur la concentration en K^+ . La présence de B amène à une augmentation de la concentration en K^+ . Cet effet n'est pas significatif lorsqu'on compare les témoins. Le NaCl semble réduire la teneur en K^+ dans les tiges.

Concernant les feuilles, les teneurs en K^+ ne semblent pas affectées par la présence de B. Par contre on remarque que la présence d'As ou de NaCl entraîne une réduction de la concentration en K^+ foliaire.

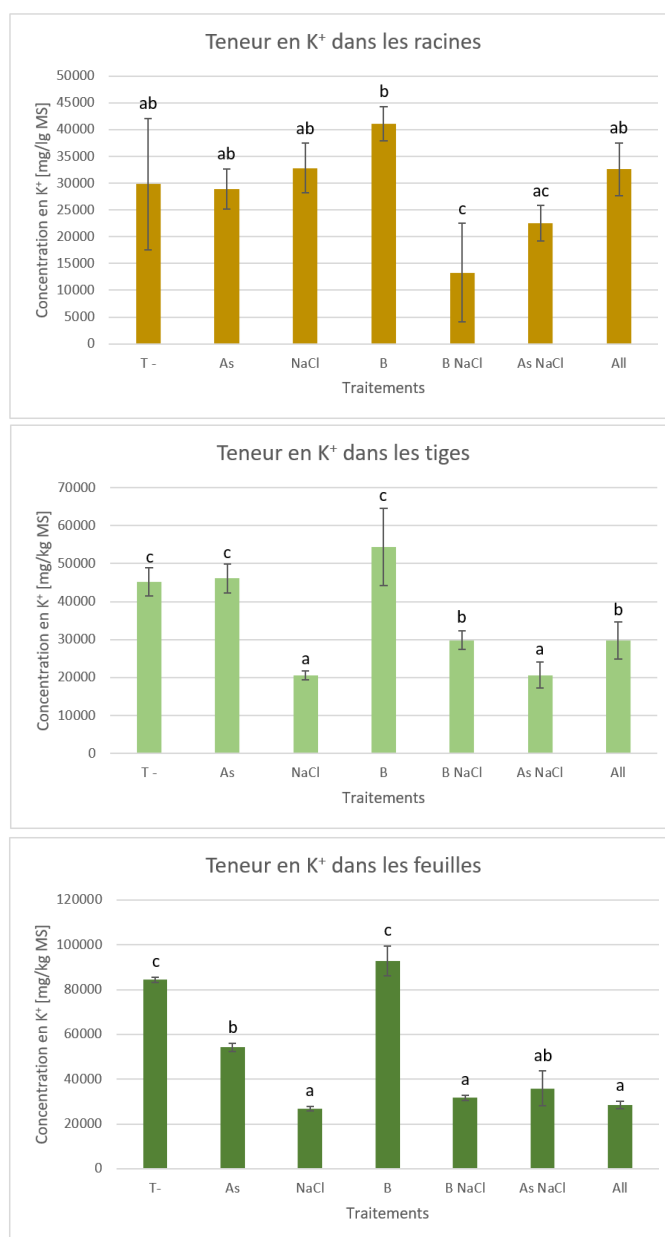


FIGURE 27 – Teneur moyenne en K^+ dans les racines, les tiges et les feuilles en mg de K^+ par kg de matière sèche après 2 mois de traitement en solution hydroponique pour chaque traitement. Le traitement "All" correspond à l'application de B, sel et As. Chaque valeur correspond à la moyenne de 4 réplicats. Les barres verticales correspondent aux écarts types standards. Les lettres au-dessus des écart-types indiquent les résultats de l'analyse statistique. Des lettres différentes signifient des résultats significativement différents pour une p-valeur de 0,05.

4.2.4 Teneur en MDA

Les concentrations en MDA racinaire ne sont pas significativement différentes les unes des autres. On peut néanmoins remarquer une baisse générale des teneurs en MDA au sein de chaque traitement contenant du B ainsi que du NaCl.

Les concentrations en MDA foliaire sont plus importantes qu'au sein des racines. Le traitement B entraîne une augmentation significative de la teneur en MDA par rapport comparativement aux témoins. Les traitements As-B et B-NaCl semblent provoquer une augmentation de la teneur en MDA mais cette tendance n'est pas significative.

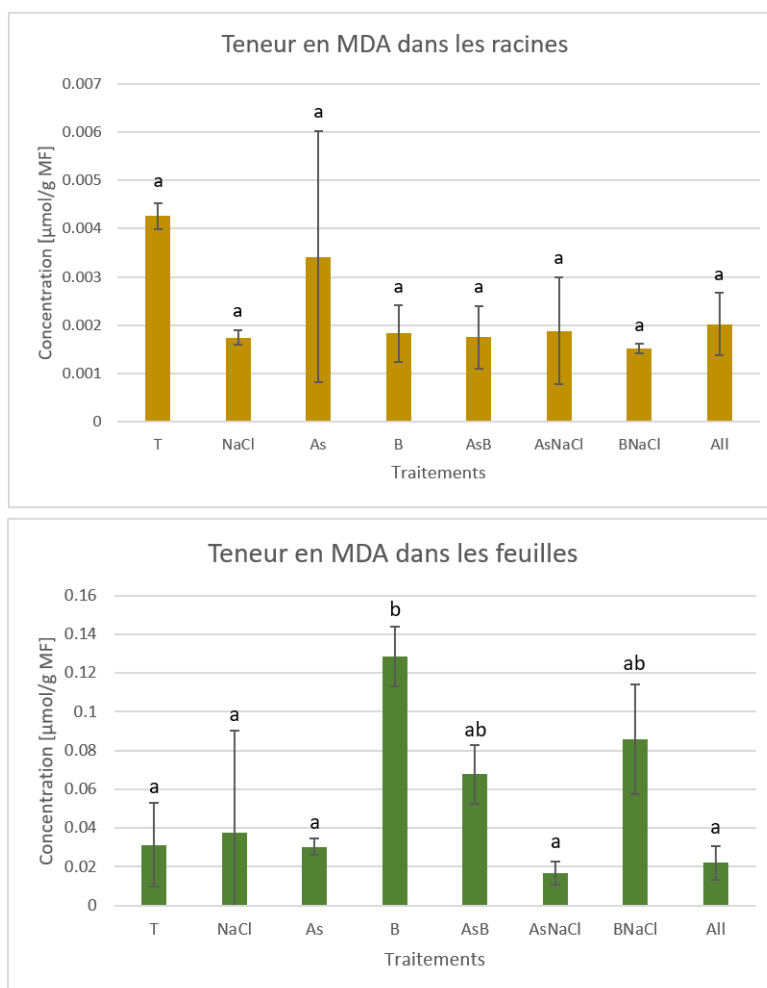


FIGURE 28 – Teneur moyenne en MDA dans les racines et les feuilles en micromoles par gramme de matière fraîche après 2 mois de traitement en solution hydroponiques pour chaque traitement. Le traitement "All" correspond à l'application de B, sel et As. Chaque valeur correspond à la moyenne de 3 réplicats. Les barres verticales correspondent aux écarts types standards. Les lettres au-dessus des écart-types indiquent les résultats de l'analyse statistique. Des lettres différentes signifient des résultats significativement différents pour une p-valeur de 0,05.

4.2.5 Dosage du glutathion

Teneur en glutathion

Les teneurs en glutathion au sein des racines sont réduites par la présence de NaCl et de B. L'effet négatif du sel sur la concentration en glutathion peut aussi être remarqué au niveau des feuilles.

L'As semble réduire les teneurs en glutathion mais cette tendance n'est pas significative.

En comparant les témoins au traitement B, on ne peut pas dégager d'effets significatifs mais en comparant les traitements As et As-B ainsi que NaCl et NaCl-B on observe une légère augmentation de la teneur en glutathion en présence de B dans le cas d'un stress combiné. Il n'est par contre pas possible de faire la différence entre les traitements NaCl, As-NaCl et All, qui présentent des concentrations en glutathion inférieures à celles des témoins.

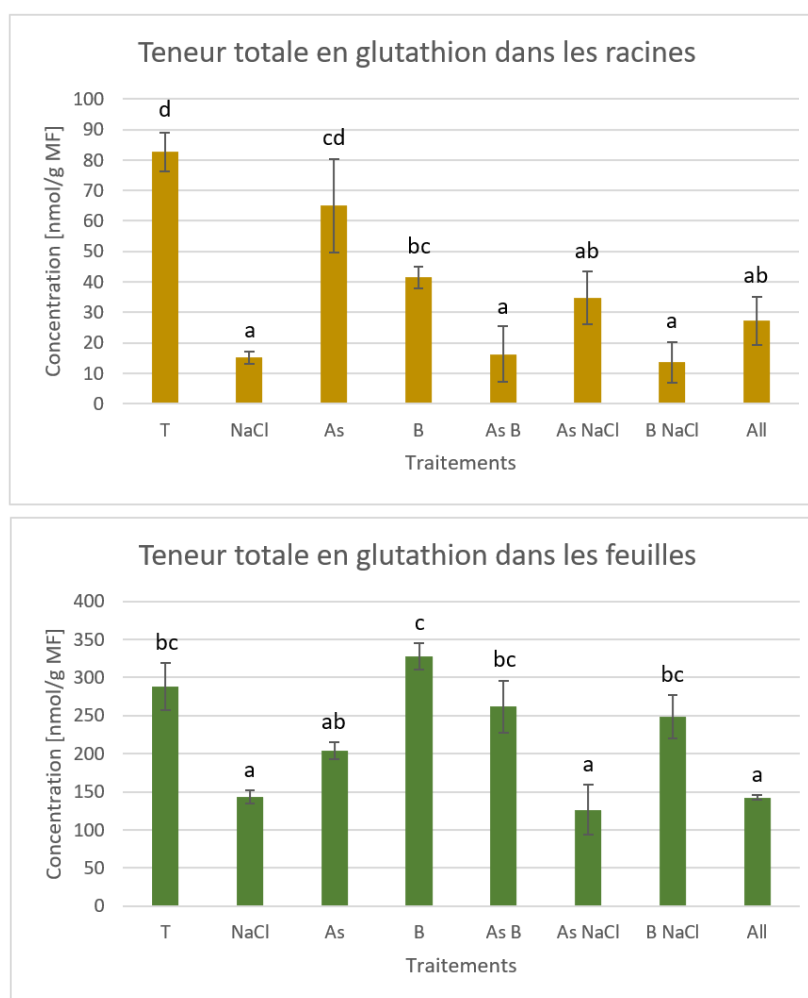


FIGURE 29 – Teneur moyenne en glutathion dans les racines et les feuilles en micromoles par gramme de matière fraîche après 2 mois de traitement en solution hydroponiques pour chaque traitement. Le traitements "All" correspond à l'application de B, sel et As. Chaque valeur correspond à la moyenne de 3 réplicats. Les barres verticales correspondent aux écarts types standards. Les lettres au-dessus des écart-types indiquent les résultats de l'analyse statistique. Des lettres différentes signifient des résultats significativement différents pour une p-valeur de 0,05.

Proportion du glutathion total sous forme oxydé

Vis à vis des ratios $\frac{(\text{glutathion}_{\text{oxyd}})}{(\text{glutathion}_{\text{total}})}$ représentés sur la Figure 30, il n'est pas possible de mettre en évidence de différences significatives entre les différents traitements au sein des racines. Les feuilles des individus exposés au traitement As semblent voir leurs ratios baissés tandis que la présence de NaCl a tendance à augmenter la proportion de glutathion oxydé. ces tendances ne sont cependant pas significatives. Les écart-types des ratios $\frac{(\text{glutathion}_{\text{oxyd}})}{(\text{glutathion}_{\text{total}})}$ sont trop élevées pour que des tendances claires puissent être dégagées, surtout au niveau des racines et laissent supposer une variabilité importante.

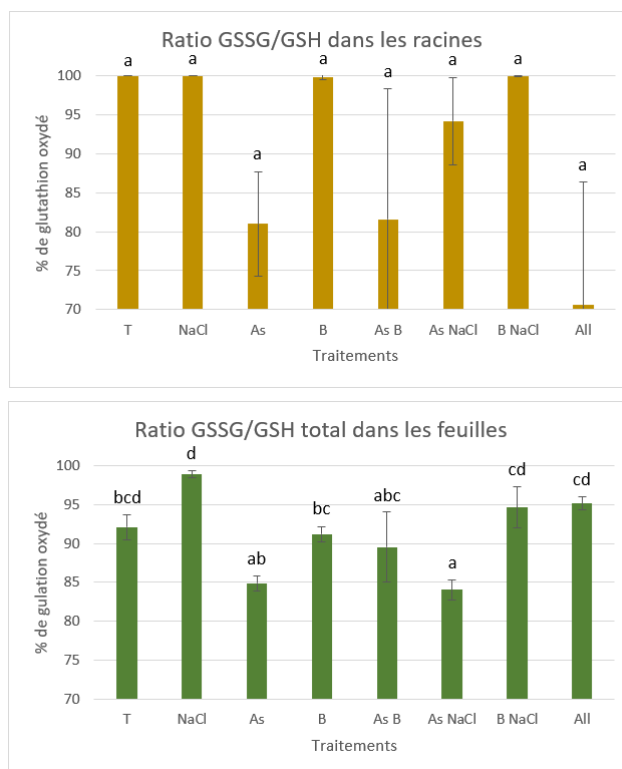


FIGURE 30 – Rapport de la concentration en glutathion oxydé mesurée sur la concentration en glutathion totale en % après 2 mois de traitement en solution hydroponique pour chaque traitement. Le traitement "All" correspond à l'application de B, sel et As. Chaque valeur correspond à la moyenne de 3 réplicats. Les barres verticales correspondent aux écarts types standards. Les lettres au-dessus des écart-types indiquent les résultats de l'analyse statistique. Des lettres différentes signifient des résultats significativement différents pour une p-valeur de 0,05.

4.2.6 Teneur en proline

Au niveau des racines, la seule différence significative est que les traitements All ont une teneur en proline supérieure à celle des traitements As-B (cf Figure 31).

Les feuilles ne semblent pas affectées par la présence d'As, il n'y a pas de différence entre les témoins et les traitements As, As-NaCl et All. Le B augmente la concentration en proline dans tous les traitements où il est présent. Il y a davantage de proline dans les feuilles que dans les racines.

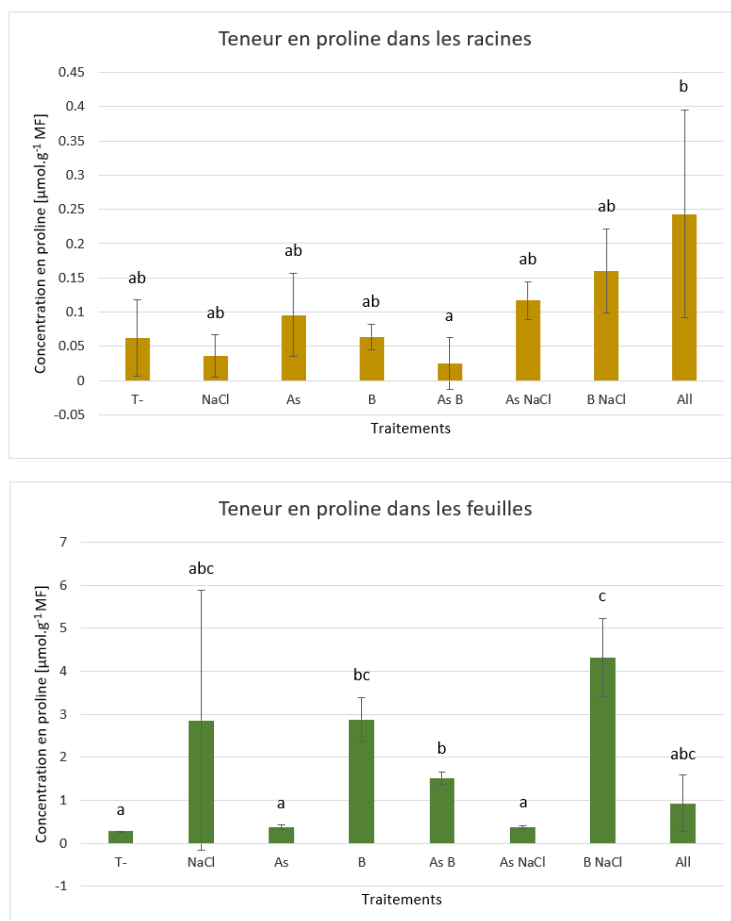


FIGURE 31 – Teneur moyenne en proline dans les racines et les feuilles en micromoles par gramme de matière fraîche après 2 mois de traitement en solution hydroponiques pour chaque traitement. Le traitements "All" correspond à l'application de B, sel et As. Chaque valeur correspond à la moyenne de 3 réplicats. Les barres verticales correspondent aux écarts types standards. Les lettres au-dessus des écart-types indiquent les résultats de l'analyse statistique. Des lettres différentes signifient des résultats significativement différents pour une p-valeur de 0,05.

5 Discussion

La région de Quillagua, d'où proviennent les graines d'*Atriplex atacamensis* utilisées dans ce travail, est une zone connue pour présenter une forte concentration en As, B et NaCl. Peu de végétation parvient à se développer dans cet environnement à l'exception d'*Atriplex atacamensis*. Cette constatation laisse penser que cette espèce a développé des mécanismes de tolérance et/ou de résistance à la présence de ces polluants. La présence conjointe de B, As et NaCl en grande quantité dans la région d'Atacama et l'absence d'études sur l'effet combiné de ces trois éléments ont motivé la présente étude. Les effets combinés de ces trois polluants sur *Atriplex atacamensis* feront l'objet de cette discussion. La première partie de cette expérience, visant à évaluer les capacités de résistance d'*Atriplex atacamensis*, a montré que la dose létale de chacun des éléments étudiés est élevée. *Atriplex* est capable de résister à des concentrations de 10 mg/l d'As, 100 mg/l de B et 10 000 mg/l de NaCl sans que cela n'affecte son taux de mortalité. On remarque que dans le cas du traitement d'As 100 mg/l même si le taux de mortalité est passé à 22%, les poids secs et frais des traitements restent équivalents aux témoins, ce qui laisse penser à un phénomène de compensation. Il est aussi à noter que ces concentrations (As 100 mg/l, B 100 mg/l et NaCl 10 000 mg/l) sont nettement plus élevées que celles rencontrées au niveau des sols de l'oasis de Quillagua ainsi qu'au sein de la rivière Rio Loa (Vromman et al., 2016c).

5.1 Paramètres de croissance

Aucune différence significative ne peut être faite entre les témoins et les traitements As aussi bien au niveau du poids sec que du poids frais. De même, les différentes comparaisons couples par couples de traitements possibles ne permettent pas non plus de mettre en évidence de différences significatives. On observe cependant de légères baisses de poids en comparant les témoins et les traitements As qui laissent penser que l'As a effectivement un effet négatif sur la croissance d'*Atriplex atacamensis* mais que la dose appliquée n'est pas toxique pour cette espèce dans les conditions de notre expérience. Les effets des stress combinés contenant de l'As sur les paramètres de croissance sont en effet similaires à ceux des stress uniques correspondants.

5.2 Effets des stress combinés sur l'accumulation d'arsenic

La Figure 24 montre que la répartition de l'As au sein des différents organes d'*Atriplex atacamensis* n'est pas affectée par l'application des stress multiples. La majorité (entre 70 et 75%) de l'As présent dans la plante est retrouvé dans les racines et ce, peu importe le traitement. L'ordre d'accumulation préférentiel semble être racines > tiges > feuilles. On retrouve de 8 à 9 fois plus d'As dans les racines que dans les feuilles et 2 à 3 fois plus d'As dans les tiges que dans les feuilles. Ces résultats semblent correspondre à la littérature qui montre que les sites de séquestration préférentiels sont les racines ainsi que les compartiments pariétaux (Abbas et al., 2018; Tripathi et al., 2012; Vromman et al., 2016c; Verbruggen et al., 2009).

Les concentrations en As ont été modifiées par les traitements. Au niveau racinaire, le traitement B-As accumule significativement plus d'As que le traitement As-NaCl et All. Les résultats obtenus laisseraient penser que la présence de sel réduirait l'absorption d'As tandis que le B l'augmenterait. Mais ces deux tendances ne peuvent pas être affirmées statistiquement. Demir

et al. (2013) ont effectivement montré que la salinité réduisait la perception d'As sur *Cakile maritima*. Pareillement Delphine Vromman et al (2016) ont constaté dans leur étude que l'absorption d'As par *Atriplex atacamensis* est réduite par la présence de sel. Aucun mécanisme n'a pour l'instant été avancé pour expliquer cette diminution. On peut néanmoins écarter la possibilité que cette baisse soit due à une complexation ou un changement de spéciation de l'As dans la solution hydroponique (Vromman et al., 2016a).

On retrouve peu d'études sur l'effet d'un stress combiné As-B. Les résultats de Marcelis and Lutts (2019) montrent une baisse de l'absorption d'As en présence de B tandis que Wang et al. (2010) n'observe pas de changement des habitudes d'accumulation chez *Pteris vittata*. Il est avancé que l'As(III) ainsi que l'acide borique sont tous les deux absorbés par le biais de protéine NIP, un sous groupe de la famille des aquaporines. Il y aurait donc un potentiel effet de compétition entre les deux composés. La forme d'As utilisée dans le cadre de cette étude est l'As(V), celle-ci est stable sous cette forme en solution hydroponique (Vromman et al., 2016a), et est absorbé selon des mécanismes différents. Dans notre cas, aucun effet significatif dû à la présence de B sur l'absorption d'As n'a pu être dégagé. Il n'y a pas ou peu d'effet de la part du B sur l'absorption d'As aux doses utilisées. Les différences entre les résultats de cette étude et celle effectuée par Marcelis and Lutts (2019) pourrait être expliquées par les différences de concentrations ainsi que de forme de B utilisée.

5.3 Effets des stress combinés sur l'accumulation de B

Les effets sur la croissance ne sont pas marqués mais il semble que le B en forte concentration a un effet néfaste sur la croissance d'*Atriplex atacamensis*. Vis à vis de la teneur en B, les traitements combinés entraînent des modifications de la répartition du B au sein de la plante et ce, tout particulièrement dans le cas B-NaCl. L'As comme le sel semblent favoriser l'accumulation de B au niveau des feuilles. Cet effet est plus marqué dans le cas de la présence de NaCl et de B.

Les résultats des études menée vis à vis de l'accumulation de B en conditions salines sont contradictoires. Il a été avancé que les comportements observables dépendent des espèces étudiées ainsi que de leur résistance au B et à la salinité (Edelstein et al., 2005; Alpaslan and Gunes, 2001). On observe une baisse de l'absorption de B liée à une réduction de l'absorption d'eau dans certains cas (Edelstein et al., 2005) tandis qu'avec Alpaslan and Gunes (2001) on a constaté que la sensibilité au B en condition saline est liée à une absorption accru dans le cas du concombre. Dans leur étude sur la résistance au B en condition saline, Ben-Gal and Shani (2002) ont noté que la réduction du flux transpiratoire observée en présence d'excès de B était inhibée lors d'une exposition simultanée au B et au sel. Le B semble entraîner une réduction de croissance au niveau des feuilles quand il s'y trouve en grande quantité. Or on retrouve des concentrations nettement plus élevées dans le traitement B-NaCl que dans le traitement B simple (7 fois plus importantes). Malgré cette augmentation, aucun symptôme n'a été observé et il n'y a pas de différence entre les poids des deux traitements.

Cela laisse penser qu'une compartimentation du B plus efficace a lieu en présence de sel. L'extrusion de B et de sel par des glandes salines a déjà été observée par Rozema et al. (1992) sur *Spartina anglica*. Des mécanismes de compartimentation ou d'extrusion pourraient être activés en présence de sel et mener à l'accumulation du B dans l'apoplasme, les vacuoles ou au

sein des glandes salines.

5.4 Effets des stress combinés sur l'accumulation de Na^+ et de K^+

Les résultats obtenus dans la section 4.2.1 de cette étude semblent montrer que le sel a une influence positive sur la croissance. Le sel occasionne une augmentation du poids frais et du poids sec. Cette réponse est connue auprès des espèces halophytes tel que *Salicornia brachiata* (Parida and Jha, 2013; Flowers and Colmer, 2008).

Tout comme Panda A. et al ont observé sur *Suaeda maritima*, la présence d'As n'a pas l'air de provoquer de changement significatif au niveau des teneur en Na^+ . Le B quant à lui semble provoquer une augmentation de la teneur en Na^+ dans les tiges, ce qui pourrait correspondre à une séquestration au sein des parois du collenchyme tel que l'a montré (Princi et al., 2016).

On remarque que le traitement As présente une quantité significativement plus importante de Na^+ que les témoins. Cet effet est très probablement dû au fait que l'As a été dispensé sous forme d'arséniate de sodium. Une certaine quantité de Na^+ est donc apporté au milieu lors de l'ajout d'As aux traitements.

La Figure 27 nous montre que la présence de sel impacte négativement les teneur en K^+ dans les tiges et les feuilles. Le Na^+ n'est pas un élément essentiel à la plante contrairement au K^+ . Le fait que l'apport de sel réduit la teneur en K^+ tout en augmentant la croissance d'*Atriplex atacamensis* peut mener à penser que cette espèce est capable d'utiliser du Na^+ pour assurer son équilibre osmotique, il remplirait donc un des rôles des ions K^+ (Wakeel et al., 2011).

Le traitement triple possède des concentrations similaires à celles du traitement NaCl. Les effets ressentis par les feuilles seraient donc limités à ceux provoqués par la présence de sel. Le B et l'As n'influenceraient pas les teneurs en K^+ .

5.5 Effets de l'application de bore, sel et Arsenic sur *A. atacamensis*

La comparaison entre les traitements All et B-NaCl relève un point intéressant : les traitements B-NaCl possèdent un poids sec et frais généralement inférieur au traitement All. Ces deux traitements sont les mêmes à l'exception d'un apport d'As en plus dans le traitement All.

Les mesures de teneur en éléments minéraux montrent une diminution de la teneur en Na^+ au niveau des feuilles. Les teneurs en B au sein des tiges et des feuilles baissent en présence d'As. Comme constaté précédemment, l'As à la dose utilisée ne provoque pas ou peu de symptômes chez *Atriplex atacamensis*. On peut donc supposer que la présence d'As amène un effet positif en réduisant l'absorption de B (cf Figure 25) qui a un effet négatif sur la croissance tel que le montre les Figures 22 et 23. Les concentrations en MDA foliaire montrent aussi que la présence de B entraîne un stress oxydatif et que dans le cas du traitement All, ce stress oxydatif est réduit.

La complexation d'une partie des éléments dans la solution pourrait être une hypothèse expliquant cette réduction de perception de B. Cependant aucun exemple de complexation

entre l'arséniate et l'acide borique n'a été trouvé dans la littérature, ni mis en évidence lors d'expériences similaires (Marcelis and Lutts, 2019; Vromman et al., 2016a).

La deuxième hypothèse serait que la résistance au bore accrue en présence de sel serait due à un changement de la répartition des éléments au sein de la plante tel que la mise en place de mécanisme de séquestration racinaire ou l'excrétion de B.

Le traitement All se comporte de manière très similaire au traitement B-As. Même si l'As et le NaCl semblent tout les deux augmenter les quantités de B foliaire, cet effet ne semble pas additif. Nos résultats laisseraient penser que l'effet de l'As réprimerait l'influence du NaCl sur la concentration en B. Seul l'effet occasionné par l'As est observé. Une autre option serait que la présence de ces trois éléments, présents naturellement dans l'environnement naturel de *Atriplex atacamensis*, entraîne une réponse spécifique indépendante des mécanismes impliqués en cas de stress individuel ou double (Liu et al., 2013).

5.6 Effets des stress combinés sur les teneurs en MDA, proline et glutathion

Les teneurs en MDA (malondialdéhyde) ainsi que les teneurs en glutathion ont été mesurées à titre d'indicateurs du stress oxydatif provoqué par les traitements. Les concentrations en MDA racinaire sont bien plus faibles que celles retrouvées dans les feuilles malgré la présence d'une quantité non-négligeable de B et le fait que les racines soient un site d'accumulation d'As. Les feuilles, elles, sont affectées par la présence de B et contiennent significativement plus de MDA que les témoins. La différence de concentration en MDA entre les deux organes pourrait être expliquée par des mécanismes de séquestration vacuolaire ou par une production de composés engagés dans la détoxification, tel que le glutathion, plus importante dans les racines. Mais bien que les teneurs en glutathion foliaire (impliqué à la gestion le stress oxydatif) ne sont que 2 à 3 fois plus élevées dans les feuilles, les concentrations en MDA (indicateur du stress oxydatif ressenti) sont près de 10 fois plus élevées dans les feuilles que dans les racines. On pourrait en déduire que les feuilles sont beaucoup plus sensibles à la présence de B, d'As ou NaCl que les racines. Cette observation est en accord avec la littérature : l'As et le B sont connus pour interférer avec le fonctionnement des tissus photosynthétiques notamment en agissant sur les photosystèmes II. Cette interférence peut mener à un surplus d'énergie lumineuse qui entraîne la production de ROS (Wang et al., 2012, 2016; Landi et al., 2012).

L'As n'induit pas de production de MDA à la dose appliquée, cela va dans le sens de notre hypothèse qui soutient que l'As, à cette dose, ne provoque pas de stress auprès d'*Atriplex atacamensis*. Une baisse non-significative de la concentration en MDA est observée dans le traitement B-NaCl au niveau des feuilles et ce, malgré la concentration bien plus importante en B. Cela renforce l'idée que la présence de NaCl induit une séquestration du B plus efficace chez *Atriplex atacamensis*. Le traitement triple présente une faible teneur en MDA, laissant penser qu'il n'est pas exposé à un stress oxydatif ou est capable d'y palier.

Concernant le glutathion, la présence de sel réduit les concentrations en glutathion aussi bien au niveau des feuilles que des racines. Cette réponse est tout à fait particulière étant donné que la majorité des études montre que la salinité entraîne une production plus importante de

glutathion notamment chez *Atriplex atacamensis* (Anjum et al., 2014; Ruiz and Blumwald, 2002; Nazar et al., 2011). Benzarti et al. (2012) ont néanmoins constaté que les teneurs en glutathion augmente avec la salinité jusqu'à un certain niveau mais diminue à nouveau en cas d'exposition à une salinité importante auprès d'une autre espèce du genre *Atriplex*. Aucune explication n'a été trouvée pour justifier une baisse de la teneur en glutathion en présence de sel. Ces résultats pourraient être dûs à une erreur mais le sujet semble peu étudié dans le cas d'*Atriplex atacamensis*. De nouvelles expériences pourraient être menées pour expliquer cette tendance. Une explication possible serait que la présence de sel entraînerait la production de phytochélatine. Ce polymère de glutathion n'est pas dosé dans le protocole utilisé pour mesurer les teneurs en glutathion. Ainsi, on peut supposer que si la production de glutathion n'est pas améliorée par la présence de sel, qui n'occasionne pas de stress, et que le glutathion est converti en phytochélatine, on observerait une baisse de la concentration en glutathion dans la plante. Pour appuyer cette hypothèse, il est possible d'avancer que les teneurs en glutathion des traitements As-NaCl sont inférieures à celles des traitements As seul.

Le B semble augmenter la concentration en glutathion dans les traitements mixtes bien qu'elle ne soit jamais significativement supérieure à celle des témoins. Le glutathion ne semble pas être le mécanisme de gestion du stress oxydatif principal. Au niveau de feuilles, la concentration en glutathion n'est pas distinguable de celle des témoins alors que les teneurs en MDA sont 4 fois plus élevées dans le traitement B que dans les témoins.

La présence de B provoque une surproduction de proline. La proline est généralement produite en cas de stress hydrique en tant qu'osmoprotectant. Un des effets connus du B est qu'il entraîne la fermeture des stomates. Cette fermeture induit une réduction du flux transpiratoire et des échanges gazeux. (Macho-Rivero et al., 2017; Ben-Gal and Shani, 2002). La production de proline en présence de B pourrait être expliquée par la fermeture des stomates. La fermeture des stomates a pour autre effet de réduire l'efficacité photosynthétique en empêchant l'arrivée de CO₂. Le surplus d'énergie entraînerait une production de ROS, ce qui expliquerait les teneurs en MDA obtenues.

5.7 Erreurs possibles

Au vu de ce qui a été observé dans la littérature (Vromman et al., 2011) et après comparaison avec les résultats obtenus au cours de la deuxième partie de l'expérience, les teneurs en As racinaire mesurées lors de l'expérience préliminaire (cf Figure 18) semblent trop importantes pour être prises en compte. Il s'agit probablement d'une erreur comise lors de la récolte : les racines des individus récoltés n'ont pas été rincées avec de l'eau distillé avant d'être récoltées.

On retient aussi que parmi les facteurs utilisés pour évaluer l'intensité du stress ressenti lors de l'expérience préliminaire, il a été constaté que la taille n'est pas un facteur intéressant à prendre en compte. La trop grande variabilité présente autour de cette variable ne permet de mettre en évidence d'effets d'autant plus que les tailles moyennes semblent osciller autour de valeurs proches. Ce facteur n'est probablement pas intéressant à mesurer dans le cadre d'expérience à venir.

6 Conclusion

Les expériences menées ont permis de mettre en évidence qu'*Atriplex atacamensis* est une plante résistante à des doses importantes de B, As et sel et ce même en cas d'exposition combinée aux trois éléments. *A. atacamensis* est capable de survivre à des concentrations de B de 500 mg/l. La présence d'une concentration de 100 mg/l d'As ne provoque pas de symptôme et n'a pas l'air d'occasionner de stress oxydatif ou hydrique. Le B, lui, impacte négativement la croissance et cette diminution est à mettre en lien avec un stress oxydatif. Le glutathion ne semble pas être le mécanisme principal de gestion du stress oxydatif. Il n'est pas davantage produit en situation de stress oxydatif comme le montre les teneurs en MDA et en glutathion des traitements B.

Les réponses de la plante aux stress doubles ouvrent de nouvelles portes. L'utilisation d'*Atriplex atacamensis* afin d'extraire le B du sol en terrain pollué est une possibilité prometteuse : ses capacités d'absorption de B sont augmentées en présence de sel ou d'As. La présence de sel réduit même l'intensité du stress oxydatif ressenti. Cela est probablement lié à un transport et une compartimentation du B plus efficace en présence de sel.

La présence de sel dans le milieu permet à *A. atacamensis* de compenser une déficience en K^+ . Elle est donc utilisable dans des sites ayant une carence en K^+ si du NaCl est présent. Les concentrations en Na^+ dans les feuilles suggèrent aussi que l'utilisation d'*A. atacamensis* pour extraire le Na^+ d'un site est envisageable.

Les capacités d'accumulation de cette espèce sont maintenues en cas de stress triple et sont équivalentes à celles d'un stress individuel et confirme que son utilisation est possible dans le cadre de la phytoremédiation. L'As étant essentiellement stocké dans les racines, *Atriplex atacamensis* aura une utilité moindre dans le cas de la phytoextraction de l'As, mais à tout fait sa place en tant que phytostabilisateur au vu des quantités importantes qu'elle est capable d'immobiliser dans ses racines malgré la présence d'autres éléments en concentrations importantes.

Cette étude avait pour but d'identifier l'influence des stress multiples sur l'accumulation de différents polluants par *A. atacamensis*. La mise en lumière des différents comportements d'*A. atacamensis* ouvre la voie à de nouvelles études. Des recherches pourraient se concentrer sur les transporteurs et l'expression des gènes afin d'expliquer les mécanismes impliqués dans les différentes réponses observées. Une piste intéressante de recherche future serait d'analyser l'expression des gènes codant pour des protéines d'efflux au niveau des feuilles dans le cadre d'un stress B-NaCl. Il serait intéressant de mesurer les teneurs en phytochélatines et les concentrations d'autres anti-oxydants lors d'expériences futures. Cela permettrait de comprendre si la résistance d'*A. atacamensis* aux polluants est induite par la séquestration et la complexation des polluants, si elle est induite par la gestion efficace du stress oxydatif ou si il s'agit d'un équilibre entre les deux.

Références

- Abbas, G., Murtaza, B., Bibi, I., Shahid, M., Niazi, N. K., Khan, M. I., Amjad, M., Hussain, M., et al. (2018). Arsenic uptake, toxicity, detoxification, and speciation in plants : physiological, biochemical, and molecular aspects. *International journal of environmental research and public health*, 15(1) :59.
- Abernathy, Charles O, Y.-P. L. D. L. H. V. A. e. a. (1999). *Arsenic : health effects, mechanisms of actions, and research issues. Environmental health perspectives.*
- Adak, S., Roy, A., Das, P., Mukherjee, A., Sengupta, S., and Majumder, A. L. (2019). Soil salinity and mechanical obstruction differentially affects embryonic root architecture in different rice genotypes from west bengal. *Plant Physiology Reports*, 24(2) :192–209.
- Al-Huqail, A. A., Khan, M. N., Ali, H. M., Siddiqui, M. H., Al-Huqail, A. A., AlZuaibr, F. M., Al-Muwayhi, M. A., Marraiki, N., and Al-Humaid, L. (2020). Exogenous melatonin mitigates boron toxicity in wheat. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 201 :110822.
- Ali, H., Khan, E., and Sajad, M. A. (2013). Phytoremediation of heavy metals—concepts and applications. *Chemosphere*, 91(7) :869–881.
- Alpaslan, M. and Gunes, A. (2001). Interactive effects of boron and salinity stress on the growth, membrane permeability and mineral composition of tomato and cucumber plants. *Plant and Soil*, 236(1) :123–128.
- Amini, M., Abbaspour, K. C., Berg, M., Winkel, L., Hug, S. J., Hoehn, E., Yang, H., and Johnson, C. A. (2008). Statistical modeling of global geogenic arsenic contamination in groundwater. *Environmental science & technology*, 42(10) :3669–3675.
- Anjum, N. A., Aref, I. M., Duarte, A. C., Pereira, E., Ahmad, I., and Iqbal, M. (2014). Glutathione and proline can coordinately make plants withstand the joint attack of metal (loid) and salinity stresses. *Frontiers in plant science*, 5 :662.
- Appenroth, K.-J. (2010). Definition of “heavy metals” and their role in biological systems. In *Soil heavy metals*, pages 19–29. Springer.
- Assaha, D. V., Ueda, A., Saneoka, H., Al-Yahyai, R., and Yaish, M. W. (2017). The role of Na^+ and K^+ transporters in salt stress adaptation in glycophytes. *Frontiers in physiology*, 8 :509.
- Atkinson, N. J., Lilley, C. J., and Urwin, P. E. (2013). Identification of genes involved in the response of arabidopsis to simultaneous biotic and abiotic stresses. *Plant physiology*, 162(4) :2028–2041.
- Bajji, M., Kinet, J.-M., and Lutts, S. (1998). Salt stress effects on roots and leaves of atriplex halimus l. and their corresponding callus cultures. *Plant science*, 137(2) :131–142.
- Barral-Fraga, L., Barral, M. T., MacNeill, K. L., Martiñá-Prieto, D., Morin, S., Rodríguez-Castro, M. C., Tuulaikhuu, B.-A., and Guasch, H. (2020). Biotic and abiotic factors influencing arsenic biogeochemistry and toxicity in fluvial ecosystems : A review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(7) :2331.

- Bates, L. S., Waldren, R. P., and Teare, I. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and soil*, 39(1) :205–207.
- Belkheiri, O. and Mulas, M. (2013). The effects of salt stress on growth, water relations and ion accumulation in two halophyte atriplex species. *Environmental and Experimental Botany*, 86 :17–28.
- Ben-Gal, A. and Shani, U. (2002). Yield, transpiration and growth of tomatoes under combined excess boron and salinity stress. *Plant and soil*, 247(2) :211–221.
- Benzarti, M., Rejeb, K. B., Debez, A., Messedi, D., and Abdelly, C. (2012). Photosynthetic activity and leaf antioxidative responses of atriplex portulacoides subjected to extreme salinity. *Acta Physiologiae Plantarum*, 34(5) :1679–1688.
- Betancourt, J., Latorre, C., Rech, J., Quade, J., and Rylander, K. (2000). A 22,000-year record of monsoonal precipitation from northern chile's atacama desert. *science*, 289(5484) :1542–1546.
- Bhatia, N. P., Baker, A. J., Walsh, K. B., and Midmore, D. J. (2005). A role for nickel in osmotic adjustment in drought-stressed plants of the nickel hyperaccumulator stackhousia tryonii bailey. *Planta*, 223(1) :134–139.
- Bhowmick, S., Pramanik, S., Singh, P., Mondal, P., Chatterjee, D., and Nriagu, J. (2018). Arsenic in groundwater of west bengal, india : a review of human health risks and assessment of possible intervention options. *Science of the Total Environment*, 612 :148–169.
- Bhuiyan, M. S., Raman, A., Hodgkins, D., Mitchell, D., and Nicol, H. I. (2017). Influence of high levels of na⁺ and cl⁻ on ion concentration, growth, and photosynthetic performance of three salt-tolerant plants. *Flora*, 228 :1–9.
- Bienert, M. D., Muries, B., Crappe, D., Chaumont, F., and Bienert, G. P. (2019). Overexpression of x intrinsic protein 1 ; 1 in nicotiana tabacum and arabidopsis reduces boron allocation to shoot sink tissues. *Plant direct*, 3(6) :e00143.
- Bjørklund, G., Aaseth, J., Chirumbolo, S., Urbina, M. A., and Uddin, R. (2018). Effects of arsenic toxicity beyond epigenetic modifications. *Environmental geochemistry and health*, 40(3) :955–965.
- Brdar-Jokanović, M. (2020). Boron toxicity and deficiency in agricultural plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(4) :1424.
- Cereser, C., Guichard, J., Draï, J., Bannier, E., Garcia, I., Boget, S., Parvaz, P., and Revol, A. (2001). Quantitation of reduced and total glutathione at the femtomole level by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection : application to red blood cells and cultured fibroblasts. *Journal of Chromatography B : Biomedical Sciences and Applications*, 752(1) :123–132.
- Chen, L.-S., Li, P., and Cheng, L. (2008). Effects of high temperature coupled with high light on the balance between photooxidation and photoprotection in the sun-exposed peel of apple. *Planta*, 228(5) :745.

- Chen, X., Zeng, X.-C., Wang, J., Deng, Y., Ma, T., Guoji, E., Mu, Y., Yang, Y., Li, H., and Wang, Y. (2017). Microbial communities involved in arsenic mobilization and release from the deep sediments into groundwater in jiangnan plain, central china. *Science of the Total Environment*, 579 :989–999.
- Chen, Z. C., Yamaji, N., Fujii-Kashino, M., and Ma, J. F. (2016). A cation-chloride cotransporter gene is required for cell elongation and osmoregulation in rice. *Plant Physiology*, 171(1) :494–507.
- Choudhary, S., Zehra, A., Naeem, M., Khan, M. M. A., and Aftab, T. (2020). Effects of boron toxicity on growth, oxidative damage, antioxidant enzymes and essential oil fingerprinting in mentha arvensis and cymbopogon flexuosus. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 7(1) :1–11.
- Colmenero-Flores, J. M., Martinez, G., Gamba, G., Vázquez, N., Iglesias, D. J., Brumós, J., and Talón, M. (2007). Identification and functional characterization of cation–chloride cotransporters in plants. *The Plant Journal*, 50(2) :278–292.
- Daliakopoulos, I., Tsanis, I., Koutroulis, A., Kourgialas, N., Varouchakis, A., Karatzas, G., and Ritsema, C. (2016). The threat of soil salinity : A european scale review. *Science of the Total Environment*, 573 :727–739.
- Danian Zhang, S. S. (2019). *Definition of “heavy metals” and their role in biological systems-China’s new Law on the Prevention and Control of Soil Pollution imposes new obligations on enterprises and landowners.*
- Demir, E., Dinler, B. S., Ozdener, Y., et al. (2013). Biochemical effects of arsenic stress in the leaves of halophyte cakile maritima (scop.) plants under salinity. *Fresenius Environ Bull*, 22 :3465–3473.
- Díaz, F. J., Tejedor, M., Jiménez, C., Grattan, S. R., Dorta, M., and Hernández, J. M. (2013). The imprint of desalinated seawater on recycled wastewater : Consequences for irrigation in lanzarote island, spain. *Agricultural Water Management*, 116 :62–72.
- Díaz, O., Tapia, Y., Pastene, R., Montes, S., Núñez, N., Vélez, D., and Montoro, R. (2011). Total and bioavailable arsenic concentration in arid soils and its uptake by native plants from the pre-andean zones in chile. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 86(6) :666–669.
- Edelstein, M., Ben-Hur, M., Cohen, R., Burger, Y., and Ravina, I. (2005). Boron and salinity effects on grafted and non-grafted melon plants. *Plant and Soil*, 269(1-2) :273–284.
- Elumalai, V., Brindha, K., and Lakshmanan, E. (2017). Human exposure risk assessment due to heavy metals in groundwater by pollution index and multivariate statistical methods : a case study from south africa. *Water*, 9(4) :234.
- Eser, A. and Aydemir, T. (2016). The effect of kinetin on wheat seedlings exposed to boron. *Plant physiology and biochemistry*, 108 :158–164.
- Ferguson, J. F. and Gavis, J. (1972). A review of the arsenic cycle in natural waters. *Water research*, 6(11) :1259–1274.

- Finnegan, P. and Chen, W. (2012). Arsenic toxicity : the effects on plant metabolism. *Frontiers in physiology*, 3 :182.
- Flowers, T. J. and Colmer, T. D. (2008). Salinity tolerance in halophytes. *New Phytologist*, pages 945–963.
- Fukuda, A., Nakamura, A., Hara, N., Toki, S., and Tanaka, Y. (2011). Molecular and functional analyses of rice nhx-type Na^+/H^+ antiporter genes. *Planta*, 233(1) :175–188.
- Fukuda, A., Yazaki, Y., Ishikawa, T., Koike, S., and Tanaka, Y. (1998). Na^+/H^+ antiporter in tonoplast vesicles from rice roots. *Plant and Cell Physiology*, 39(2) :196–201.
- Garciadeblás, B., Senn, M. E., Bañuelos, M. A., and Rodríguez-Navarro, A. (2003). Sodium transport and hkt transporters : the rice model. *The Plant Journal*, 34(6) :788–801.
- Ghanem, M. E., Hichri, I., Smigocki, A. C., Albacete, A., Fauconnier, M.-L., Diatloff, E., Martinez-Andujar, C., Lutts, S., Dodd, I. C., and Pérez-Alfocea, F. (2011). Root-targeted biotechnology to mediate hormonal signalling and improve crop stress tolerance. *Plant cell reports*, 30(5) :807–823.
- Gonzaga, M. I., Santos, J. A., and Ma, L. Q. (2008). Phytoextraction by arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata* L. from six arsenic-contaminated soils : repeated harvests and arsenic redistribution. *Environmental Pollution*, 154(2) :212–218.
- Hasanuzzaman, M., Nahar, K., Hossain, M., Mahmud, J. A., Rahman, A., Inafuku, M., Oku, H., Fujita, M., et al. (2017). Coordinated actions of glyoxalase and antioxidant defense systems in conferring abiotic stress tolerance in plants. *International journal of molecular sciences*, 18(1) :200.
- Hassine, A. B., Ghanem, M. E., Bouzid, S., and Lutts, S. (2008). An inland and a coastal population of the mediterranean xero-halophyte species *Atriplex halimus* L. differ in their ability to accumulate proline and glycinebetaine in response to salinity and water stress. *Journal of Experimental Botany*, 59(6) :1315–1326.
- Heath, R. L. and Packer, L. (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplasts : I. kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of biochemistry and biophysics*, 125(1) :189–198.
- Henderson, S. W., Wege, S., Qiu, J., Blackmore, D. H., Walker, A. R., Tyerman, S. D., Walker, R. R., and Gilliam, M. (2015). Grapevine and arabidopsis cation-chloride cotransporters localize to the golgi and trans-golgi network and indirectly influence long-distance ion transport and plant salt tolerance. *Plant Physiology*, 169(3) :2215–2229.
- Hettick, B. E., Canas-Carrell, J. E., French, A. D., and Klein, D. M. (2015). Arsenic : a review of the element’s toxicity, plant interactions, and potential methods of remediation. *Journal of agricultural and food chemistry*, 63(32) :7097–7107.
- Irakoze, W., Vanpee, B., Rufyikiri, G., Dailly, H., Nijimbere, S., and Lutts, S. (2019). Comparative effects of chloride and sulfate salinities on two contrasting rice cultivars (*Oryza sativa* L.) at the seedling stage. *Journal of Plant Nutrition*, 42(9) :1001–1015.

- Islam, E., Khan, M. T., and Irem, S. (2015). Biochemical mechanisms of signaling : perspectives in plants under arsenic stress. *Ecotoxicology and environmental safety*, 114 :126–133.
- Iyer, N. J., Tang, Y., and Mahalingam, R. (2013). Physiological, biochemical and molecular responses to a combination of drought and ozone in medicago truncatula. *Plant, Cell & Environment*, 36(3) :706–720.
- Jankong, P., Visoottiviseth, P., and Khokiattiwong, S. (2007). Enhanced phytoremediation of arsenic contaminated land. *Chemosphere*, 68(10) :1906–1912.
- Kaya, C., Sarioğlu, A., Ashraf, M., Alyemeni, M. N., and Ahmad, P. (2020). Gibberellic acid-induced generation of hydrogen sulfide alleviates boron toxicity in tomato (*solanum lycopersicum* l.) plants. *Plant Physiology and Biochemistry*.
- Kissoudis, C., van de Wiel, C., Visser, R. G., and van der Linden, G. (2014). Enhancing crop resilience to combined abiotic and biotic stress through the dissection of physiological and molecular crosstalk. *Frontiers in Plant Science*, 5 :207.
- Kofroňová, M., Mašková, P., and Lipavská, H. (2018). Two facets of world arsenic problem solution : crop poisoning restriction and enforcement of phytoremediation. *Planta*, 248(1) :19–35.
- Kong, X.-Q., Gao, X.-H., Sun, W., An, J., Zhao, Y.-X., and Zhang, H. (2011). Cloning and functional characterization of a cation–chloride cotransporter gene osccc1. *Plant molecular biology*, 75(6) :567–578.
- Krishna, A. and Govil, P. (2004). Heavy metal contamination of soil around pali industrial area, rajasthan, india. *Environmental Geology*, 47(1) :38–44.
- Kumar, S., Dubey, R. S., Tripathi, R. D., Chakrabarty, D., and Trivedi, P. K. (2015). Omics and biotechnology of arsenic stress and detoxification in plants : current updates and prospective. *Environment international*, 74 :221–230.
- Kumari, P., Rastogi, A., Shukla, A., Srivastava, S., and Yadav, S. (2018). Prospects of genetic engineering utilizing potential genes for regulating arsenic accumulation in plants. *Chemosphere*, 211 :397–406.
- Kurrer, C. (2020). *Environment policy : general principles and basic framework*.
- Lamdan, N. L., Attia, Z., Moran, N., and Moshelion, M. (2012). The arabidopsis-related halophyte *thellungiella halophila* : boron tolerance via boron complexation with metabolites ? *Plant, cell & environment*, 35(4) :735–746.
- Landi, M., Degl’Innocenti, E., Pardossi, A., Guidi, L., et al. (2012). Antioxidant and photosynthetic responses in plants under boron toxicity : a review. *Am J Agric Biol Sci*, 7 :255–270.
- Landi, M., Margaritopoulou, T., Papadakis, I. E., and Araniti, F. (2019). Boron toxicity in higher plants : An update. *Planta*, pages 1–22.
- Li, N., Wang, J., and Song, W.-Y. (2016). Arsenic uptake and translocation in plants. *Plant and Cell Physiology*, 57(1) :4–13.

- Li, Z., Ma, Z., van der Kuijp, T. J., Yuan, Z., and Huang, L. (2014). A review of soil heavy metal pollution from mines in china : pollution and health risk assessment. *Science of the total environment*, 468 :843–853.
- Liu, X., Wu, H., Ji, C., Wei, L., Zhao, J., and Yu, J. (2013). An integrated proteomic and metabolomic study on the chronic effects of mercury in suaeda salsa under an environmentally relevant salinity. *PLoS One*, 8(5) :e64041.
- Liu, X., Zhang, W., Hu, Y., Hu, E., Xie, X., Wang, L., and Cheng, H. (2015). Arsenic pollution of agricultural soils by concentrated animal feeding operations (cafos). *Chemosphere*, 119 :273–281.
- Luan, S., Lan, W., and Lee, S. C. (2009). Potassium nutrition, sodium toxicity, and calcium signaling : connections through the cbl-cipk network. *Current opinion in plant biology*, 12(3) :339–346.
- Lutts, S. and Lefèvre, I. (2015). How can we take advantage of halophyte properties to cope with heavy metal toxicity in salt-affected areas? *Annals of Botany*, 115(3) :509–528.
- Macho-Rivero, M. Á., Camacho-Cristóbal, J. J., Herrera-Rodríguez, M. B., Müller, M., Munné-Bosch, S., and González-Fontes, A. (2017). Absciscic acid and transpiration rate are involved in the response to boron toxicity in arabidopsis plants. *Physiologia plantarum*, 160(1) :21–32.
- Mandal, B. K. and Suzuki, K. T. (2002). Arsenic round the world : a review. *Talanta*, 58(1) :201–235.
- Mansour, M. M. F. and Ali, E. F. (2017). Evaluation of proline functions in saline conditions. *Phytochemistry*, 140 :52–68.
- Marcelis, S. and Lutts, S. (2019). *The impact of boron excess and vermicompost tea on the arsenic absorption by Atriplex atacamensis PHIL.*
- martinez, J., Ledent, J.-F., Bajji, M., Kinet, J., and Lutts, S. (2003). Effect of water stress on growth, na⁺ and k⁺ accumulation and water use efficiency in relation to osmotic adjustment in two populations of atriplex halimus l. *Plant Growth Regulation*, 41(1) :63–73.
- Martinez, J.-P., Kinet, J.-M., Bajji, M., and Lutts, S. (2005). NaCl alleviates polyethylene glycol-induced water stress in the halophyte species atriplex halimus l. *Journal of Experimental Botany*, 56(419) :2421–2431.
- Martinez, J.-P., Lutts, S., Schanck, A., Bajji, M., and Kinet, J.-M. (2004). Is osmotic adjustment required for water stress resistance in the mediterranean shrub atriplex halimus l? *Journal of Plant Physiology*, 161(9) :1041–1051.
- Masood, S., Saleh, L., Witzel, K., Plieth, C., and Mühling, K. H. (2012). Determination of oxidative stress in wheat leaves as influenced by boron toxicity and nacl stress. *Plant physiology and Biochemistry*, 56 :56–61.
- McIntyre, T. (2003). Phytoremediation of heavy metals from soils. In *Phytoremediation*, pages 97–123. Springer.

- Minatel, B. C., Sage, A. P., Anderson, C., Hubaux, R., Marshall, E. A., Lam, W. L., and Martinez, V. D. (2018). Environmental arsenic exposure : From genetic susceptibility to pathogenesis. *Environment international*, 112 :183–197.
- Ministry of the environment (2020). Environmental quality standards for soil pollution.
- Mittler, R. (2006). Abiotic stress, the field environment and stress combination. *Trends in plant science*, 11(1) :15–19.
- Morton, M. J., Awlia, M., Al-Tamimi, N., Saade, S., Pailles, Y., Negrão, S., and Tester, M. (2019). Salt stress under the scalpel—dissecting the genetics of salt tolerance. *The Plant Journal*, 97(1) :148–163.
- Munns, R. (2002). Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, cell & environment*, 25(2) :239–250.
- Munns, R. (2005). Genes and salt tolerance : bringing them together. *New phytologist*, 167(3) :645–663.
- Munns, R., Passioura, J. B., Colmer, T. D., and Byrt, C. S. (2020). Osmotic adjustment and energy limitations to plant growth in saline soil. *New Phytologist*, 225(3) :1091–1096.
- Munns, R., Schachtman, D., and Condon, A. (1995). The significance of a two-phase growth response to salinity in wheat and barley. *Functional Plant Biology*, 22(4) :561–569.
- Nable, R. O., Bañuelos, G. S., and Paull, J. G. (1997). Boron toxicity. *Plant and soil*, 193(1-2) :181–198.
- Nazar, R., Iqbal, N., Syeed, S., and Khan, N. A. (2011). Salicylic acid alleviates decreases in photosynthesis under salt stress by enhancing nitrogen and sulfur assimilation and antioxidant metabolism differentially in two mungbean cultivars. *Journal of plant physiology*, 168(8) :807–815.
- Northey, S., Haque, N., and Mudd, G. (2013). Using sustainability reporting to assess the environmental footprint of copper mining. *Journal of Cleaner Production*, 40 :118–128.
- Olias, R., Eljakaoui, Z., Li, J., DE MORALES, P. A., MARÍN-MANZANO, M. C., Pardo, J. M., and Belver, A. (2009). The plasma membrane Na^+/H^+ antiporter *sos1* is essential for salt tolerance in tomato and affects the partitioning of Na^+ between plant organs. *Plant, cell & environment*, 32(7) :904–916.
- Oliveira, K. R., Junior, J. P. S., Bennett, S. J., Checchio, M. V., de Cássia Alves, R., Felisberto, G., de Mello Prado, R., and Grato, P. L. (2020). Exogenous silicon and salicylic acid applications improve tolerance to boron toxicity in field pea cultivars by intensifying antioxidant defence systems. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 201 :110778.
- Ongley, L. K., Sherman, L., Armienta, A., Concilio, A., and Salinas, C. F. (2007). Arsenic in the soils of Zimapan, Mexico. *Environmental pollution*, 145(3) :793–799.
- Ono, F., Tappero, R., Sparks, D., and Guilherme, L. (2016). Investigation of arsenic species in tailings and windblown dust from a gold mining area. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(1) :638–647.

- Orrego, F., Ortíz-Calderón, C., Lutts, S., and Ginocchio, R. (2020a). Effect of single and combined cu, nacl and water stresses on three atriplex species with phytostabilization potential. *South African Journal of Botany*, 131 :161–168.
- Orrego, F., Ortiz-Calderón, C., Lutts, S., and Ginocchio, R. (2020b). Growth and physiological effects of single and combined cu, nacl, and water stresses on atriplex atacamensis and a. halimus. *Environmental and Experimental Botany*, 169 :103919.
- Panda, S., Upadhyay, R., and Nath, S. (2010). Arsenic stress in plants. *Journal of Agronomy and crop science*, 196(3) :161–174.
- Pandey, A., Khan, M. K., Hakki, E. E., Gezgin, S., and Hamurcu, M. (2019). Combined boron toxicity and salinity stress—an insight into its interaction in plants. *Plants*, 8(10) :364.
- Paoletti, E. and Grulke, N. E. (2010). Ozone exposure and stomatal sluggishness in different plant physiognomic classes. *Environmental Pollution*, 158(8) :2664–2671.
- Parida, A. K. and Jha, B. (2013). Physiological and biochemical responses reveal the drought tolerance efficacy of the halophyte salicornia brachiata. *Journal of Plant Growth Regulation*, 32(2) :342–352.
- Parihar, P., Singh, S., Singh, R., Singh, V. P., and Prasad, S. M. (2015). Effect of salinity stress on plants and its tolerance strategies : a review. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(6) :4056–4075.
- Praveen, A., Mehrotra, S., Singh, N., and Pandey, V. (2018). Nutrient constraints in arsenic phytoremediation. *Russian Journal of Plant Physiology*, 65(1) :15–22.
- Princi, M. P., Lupini, A., Araniti, F., Longo, C., Mauceri, A., Sunseri, F., and Abenavoli, M. R. (2016). Boron toxicity and tolerance in plants : Recent advances and future perspectives. In *Plant metal interaction*, pages 115–147. Elsevier.
- Queirolo, F., Stegen, S., Restovic, M., Paz, M., Ostapczuk, P., Schwuger, M., and Munoz, L. (2000). Total arsenic, lead, and cadmium levels in vegetables cultivated at the andean villages of northern chile. *Science of the Total Environment*, 255(1-3) :75–84.
- Rabbani, M. A., Maruyama, K., Abe, H., Khan, M. A., Katsura, K., Ito, Y., Yoshiwara, K., Seki, M., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2003). Monitoring expression profiles of rice genes under cold, drought, and high-salinity stresses and abscisic acid application using cdna microarray and rna gel-blot analyses. *Plant physiology*, 133(4) :1755–1767.
- Rámila, C. D., Leiva, E. D., Bonilla, C. A., Pastén, P. A., and Pizarro, G. E. (2015). Boron accumulation in puccinellia frigida, an extremely tolerant and promising species for boron phytoremediation. *Journal of Geochemical Exploration*, 150 :25–34.
- Rathinasabapathi, B. (2000). Metabolic engineering for stress tolerance : installing osmoprotectant synthesis pathways. *Annals of Botany*, 86(4) :709–716.
- Rizhsky, L., Liang, H., and Mittler, R. (2002). The combined effect of drought stress and heat shock on gene expression in tobacco. *Plant physiology*, 130(3) :1143–1151.

- Rizhsky, L., Liang, H., Shuman, J., Shulaev, V., Davletova, S., and Mittler, R. (2004). When defense pathways collide. the response of arabidopsis to a combination of drought and heat stress. *Plant physiology*, 134(4) :1683–1696.
- Robert, H. S. and Friml, J. (2009). Auxin and other signals on the move in plants. *Nature chemical biology*, 5(5) :325–332.
- Roden, J. S. and Ball, M. C. (1996). The effect of elevated [co₂] on growth and photosynthesis of two eucalyptus species exposed to high temperatures and water deficits. *Plant Physiology*, 111(3) :909–919.
- Romero, L., Alonso, H., Campano, P., Fanfani, L., Cidu, R., Dadea, C., Keegan, T., Thornton, I., and Farago, M. (2003). Arsenic enrichment in waters and sediments of the rio loa (second region, chile). *Applied Geochemistry*, 18(9) :1399–1416.
- Rosas, M. R. (1989). The genus atriplex (chenopodiaceae) in chile. *Gayana Botanica (Chile)*.
- Rosolem, C. A., Almeida, D. S., and Cruz, C. V. (2020). Polyol-ester impact on boron foliar absorption and remobilization in cotton and coffee trees. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 44.
- Rozema, J., De Bruin, J., and Broekman, R. (1992). Effect of boron on the growth and mineral economy of some halophytes and non-halophytes. *New phytologist*, 121(2) :249–256.
- Ruiz, J. and Blumwald, E. (2002). Salinity-induced glutathione synthesis in brassica napus. *Planta*, 214(6) :965–969.
- Schramel, P., Michalke, B., Emons, H., Göen, T., Hartwig, A., and Commission, M. (2002). Arsenic and arsenic compounds—determination of arsenic species (as (iii), as (v), monomethylarsonic acid, dimethylarsinic acid and arsenobetaine) in urine by hplc-icp-ms [biomonitoring methods, 2018]. *The MAK-Collection for Occupational Health and Safety : Annual Thresholds and Classifications for the Workplace*, 3(4) :2149–2169.
- Shaik, R. and Ramakrishna, W. (2013). Genes and co-expression modules common to drought and bacterial stress responses in arabidopsis and rice. *PloS one*, 8(10) :e77261.
- Shaik, R. and Ramakrishna, W. (2014). Machine learning approaches distinguish multiple stress conditions using stress-responsive genes and identify candidate genes for broad resistance in rice. *Plant physiology*, 164(1) :481–495.
- Smaoui, A., Barhoumi, Z., Rabhi, M., and Abdely, C. (2011). Localization of potential ion transport pathways in vesicular trichome cells of atriplex halimus l. *Protoplasma*, 248(2) :363–372.
- Smith, T., Grattan, S., Grieve, C., Poss, J., Läuchli, A., and Suarez, D. (2013). ph dependent salinity-boron interactions impact yield, biomass, evapotranspiration and boron uptake in broccoli (brassica oleracea l.). *Plant and soil*, 370(1-2) :541–554.
- Solgi, E., Esmaili-Sari, A., Riyahi-Bakhtiari, A., and Hadipour, M. (2012). Soil contamination of metals in the three industrial estates, arak, iran. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 88(4) :634–638.

- Souri, Z., Karimi, N., and Sandalio, L. M. (2017). Arsenic hyperaccumulation strategies : an overview. *Frontiers in cell and developmental biology*, 5 :67.
- Strawn, D. G. (2018). Review of interactions between phosphorus and arsenic in soils from four case studies. *Geochemical Transactions*, 19(1) :1–13.
- Suzuki, N., Rivero, R. M., Shulaev, V., Blumwald, E., and Mittler, R. (2014). Abiotic and biotic stress combinations. *New Phytologist*, 203(1) :32–43.
- Takano, J., Noguchi, K., Yasumori, M., Kobayashi, M., Gajdos, Z., Miwa, K., Hayashi, H., Yoneyama, T., and Fujiwara, T. (2002). Arabidopsis boron transporter for xylem loading. *Nature*, 420(6913) :337–340.
- Tapia, J., González, R., Townley, B., Oliveros, V., Álvarez, F., Aguilar, G., Menzies, A., and Calderón, M. (2018). Geology and geochemistry of the atacama desert. *Antonie van Leeuwenhoek*, 111(8) :1273–1291.
- Tapia, Y., Diaz, O., Pizarro, C., Segura, R., Vines, M., Zúñiga, G., and Moreno-Jiménez, E. (2013). Atriplex atacamensis and atriplex halimus resist as contamination in pre-andean soils (northern chile). *Science of the total environment*, 450 :188–196.
- Tripathi, R. D., Tripathi, P., Dwivedi, S., Dubey, S., Chakrabarty, D., et al. (2012). Arsenomics : omics of arsenic metabolism in plants. *Frontiers in physiology*, 3 :275.
- Verbruggen, N., Hermans, C., and Schat, H. (2009). Mechanisms to cope with arsenic or cadmium excess in plants. *Current opinion in plant biology*, 12(3) :364–372.
- Vithanage, M., Dabrowska, B. B., Mukherjee, A. B., Sandhi, A., and Bhattacharya, P. (2012). Arsenic uptake by plants and possible phytoremediation applications : a brief overview. *Environmental chemistry letters*, 10(3) :217–224.
- Vromman, D., Flores-Bavestrello, A., Šlejkovec, Z., Lapaille, S., Teixeira-Cardoso, C., Briceño, M., Kumar, M., Martinez, J.-P., and Lutts, S. (2011). Arsenic accumulation and distribution in relation to young seedling growth in atriplex atacamensis phil. *Science of the total environment*, 412 :286–295.
- Vromman, D., Lefèvre, I., Šlejkovec, Z., Martinez, J.-P., Vanhecke, N., Briceño, M., Kumar, M., and Lutts, S. (2016a). Salinity influences arsenic resistance in the xerohalophyte atriplex atacamensis phil. *Environmental and Experimental Botany*, 126 :32–43.
- Vromman, D., Lefèvre, I., Šlejkovec, Z., Martinez, J.-P., Vanhecke, N., Briceño, M., Kumar, M., and Lutts, S. (2016b). Salinity influences arsenic resistance in the xerohalophyte atriplex atacamensis phil. *Environmental and Experimental Botany*, 126 :32–43.
- Vromman, D., Lutts, S., Lefèvre, I., Somer, L., De Vreese, O., Šlejkovec, Z., and Quinet, M. (2013). Effects of simultaneous arsenic and iron toxicities on rice (oryza sativa l.) development, yield-related parameters and as and fe accumulation in relation to as speciation in the grains. *Plant and soil*, 371(1-2) :199–217.

- Vromman, D., Martinez, J.-P., Kumar, M., Šlejko, Z., and Lutts, S. (2018). Comparative effects of arsenite (as (iii)) and arsenate (as (v)) on whole plants and cell lines of the arsenic-resistant halophyte plant species *atriplex atacamensis*. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(34) :34473–34486.
- Vromman, D., Martinez, J.-P., and Lutts, S. (2017). Phosphorus deficiency modifies as translocation in the halophyte plant species *atriplex atacamensis*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 139 :344–351.
- Vromman, D., Paternostre, B., Briceño, M., Teixeira-Cardoso, C., Flores-Bavestrello, A., Vanhecke, N., Kumar, M., Martinez, J.-P., and Lutts, S. (2016c). Arsenic distribution in shoots of the halophyte plant species *atriplex atacamensis* growing in an extreme arid mining area from northern chile. *J Biorem Biodegrad*, 7(3.1000349).
- Wakeel, A., Farooq, M., Qadir, M., and Schubert, S. (2011). Potassium substitution by sodium in plants. *Critical reviews in plant sciences*, 30(4) :401–413.
- Wang, C., Liu, H., Zhang, Y., Zou, C., and Anthony, E. J. (2018a). Review of arsenic behavior during coal combustion : volatilization, transformation, emission and removal technologies. *Progress in Energy and Combustion Science*, 68 :1–28.
- Wang, S. and Mulligan, C. N. (2006). Occurrence of arsenic contamination in canada : sources, behavior and distribution. *Science of the total Environment*, 366(2-3) :701–721.
- Wang, S., Zhang, D., and Pan, X. (2012). Effects of arsenic on growth and photosystem ii (psii) activity of *microcystis aeruginosa*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 84 :104–111.
- Wang, X., Ma, L. Q., Rathinasabapathi, B., Liu, Y., and Zeng, G. (2010). Uptake and translocation of arsenite and arsenate by *pteris vittata* l. : effects of silicon, boron and mercury. *Environmental and Experimental Botany*, 68(2) :222–229.
- Wang, X., Wang, W., Huang, J., Peng, S., and Xiong, D. (2018b). Diffusional conductance to co₂ is the key limitation to photosynthesis in salt-stressed leaves of rice (*oryza sativa*). *Physiologia Plantarum*, 163(1) :45–58.
- Wang, Y., Chai, L., Yang, Z., Mubarak, H., and Tang, C. (2016). Chlorophyll fluorescence in leaves of *ficus tikoua* under arsenic stress. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 97(4) :576–581.
- Wang, Y., Jie, W., Peng, X., Hua, X., Yan, X., Zhou, Z., and Lin, J. (2019). Physiological adaptive strategies of oil seed crop *ricinus communis* early seedlings (cotyledon vs. true leaf) under salt and alkali stresses : From the growth, photosynthesis and chlorophyll fluorescence. *Frontiers in Plant Science*, 9 :1939.
- White, P. J. and Broadley, M. R. (2001). Chloride in soils and its uptake and movement within the plant : a review. *Annals of Botany*, 88(6) :967–988.
- Wu, H. and Li, Z. (2019). The importance of cl⁻ exclusion and vacuolar cl⁻ sequestration : Revisiting the role of cl⁻ transport in plant salt tolerance. *Frontiers in Plant Science*, 10.

- Wu, X., Song, H., Guan, C., and Zhang, Z. (2020a). Boron alleviates cadmium toxicity in brassica napus by promoting the chelation of cadmium onto the root cell wall components. *Science of The Total Environment*, page 138833.
- Wu, X., Song, H., Guan, C., and Zhang, Z. (2020b). Boron mitigates cadmium toxicity to rape-seed (brassica napus) shoots by relieving oxidative stress and enhancing cadmium chelation onto cell walls. *Environmental Pollution*, page 114546.
- Xiong, Y., Uys, J. D., Tew, K. D., and Townsend, D. M. (2011). S-glutathionylation : from molecular mechanisms to health outcomes. *Antioxidants & redox signaling*, 15(1) :233–270.
- Ye, H., Yang, Z., Wu, X., Wang, J., Du, D., Cai, J., Lv, K., Chen, H., Mei, J., Chen, M., et al. (2017). Sediment biomarker, bacterial community characterization of high arsenic aquifers in jiangnan plain, china. *Scientific Reports*, 7 :42037.
- Yeo, A., Lee, L.-S., Izard, P., Boursier, P., and Flowers, T. (1991). Short-and long-term effects of salinity on leaf growth in rice (oryza sativa l.). *Journal of Experimental Botany*, 42(7) :881–889.
- Zhang, J., Martinoia, E., and Lee, Y. (2018). Vacuolar transporters for cadmium and arsenic in plants and their applications in phytoremediation and crop development. *Plant and Cell Physiology*, 59(7) :1317–1325.
- Zhang, J.-L. and Shi, H. (2013). Physiological and molecular mechanisms of plant salt tolerance. *Photosynthesis research*, 115(1) :1–22.
- Zhang, S.-Y., Zhao, F.-J., Sun, G.-X., Su, J.-Q., Yang, X.-R., Li, H., and Zhu, Y.-G. (2015). Diversity and abundance of arsenic biotransformation genes in paddy soils from southern china. *Environmental science & technology*, 49(7) :4138–4146.
- Zheng, M., Liu, X., Lin, J., Liu, X., Wang, Z., Xin, M., Yao, Y., Peng, H., Zhou, D.-X., Ni, Z., et al. (2019). Histone acetyltransferase gc5 contributes to cell wall integrity and salt stress tolerance by altering the expression of cellulose synthesis genes. *The Plant Journal*, 97(3) :587–602.
- Zhu, M., Zhou, M., Shabala, L., and Shabala, S. (2017). Physiological and molecular mechanisms mediating xylem na⁺ loading in barley in the context of salinity stress tolerance. *Plant, cell & environment*, 40(7) :1009–1020.
- Zörb, C., Geilfus, C.-M., and Dietz, K.-J. (2019). Salinity and crop yield. *Plant biology*, 21 :31–38.

L'impact de l'arsenic, du bore, du sel et de leurs différentes combinaisons sur *Atriplex atacamensis* et ses capacités d'accumulation

Raphaël Serckx

La pollution des sols par l'arsenic est responsable de perte de fertilité dans de nombreuses régions du monde. La contamination du sol est favorisée par les activités humaines et particulièrement par les activités minières.

C'est le cas du désert d'Atacama, situé dans le nord du Chili, qui est une zone fortement exploitée pour son cuivre. De nombreux polluants, comme le bore et l'arsenic, se trouvent dans les déchets produits par les mines et sont rejetés dans l'environnement. Certaines régions présentent des concentrations très importantes en sel, bore et arsenic. Le traitement de sol pollué est une opération coûteuse. La phytoremédiation est étudiée comme alternative moins coûteuse et plus écologique aux méthodes de traitement des sols classiques.

La plante *Atriplex atacamensis* constitue un candidat prometteur pour la phytogestion de sites pollués. Il s'agit d'une espèce halophyte, typique de la région d'Atacama, capable de résister à de fortes concentrations en bore, arsenic et sel. Sa survie, dans une zone où les conditions sont extrêmes et où pratiquement aucune autre végétation n'arrive à se développer, laisse penser qu'*A. atacamensis* a développé des mécanismes de résistances à de multiples toxicités même combinées. Les niveaux de résistance d'*Atriplex atacamensis* face à un excès de bore, d'arsenic et de sel (NaCl) individuellement ont déjà été identifiés précédemment, mais peu d'études sur les stress combinés ont été effectués. Cette étude a pour but d'identifier l'impact des toxicités multiples sur l'état de santé et les habitudes d'accumulation d'*A. atacamensis*.

L'expérience a été réalisée en deux parties :

Dans un premier temps, des plantules d'*A. atacamensis* ont été exposées à des doses croissantes de bore, d'arsenic et de sel individuellement en solutions hydroponiques pendant deux mois. Cela a permis d'identifier les concentrations entraînant des symptômes sans provoquer la mort de l'entièreté des individus. Ces concentrations ont été utilisées lors de la deuxième expérience.

Dans un second temps, une nouvelle série de cultures d'*A. atacamensis* a été préparée. Les plantes ont été cette fois elles ont été exposées aux différentes combinaisons possibles des trois polluants. Les concentrations qui furent choisies sont : As 100 mg/l ; B 100 mg/l ; NaCl 10 000 mg/l. Neuf traitements ont été préparés : témoins, NaCl, B, As, B-As, NaCl-As, B-NaCl, B-NaCl-As. Après deux mois de traitements, les teneurs en éléments minéraux ont été mesurées dans les racines, tiges et feuilles. Les concentrations en proline, malondialdéhyde et glutathion ont été mesurées sur les racines et les feuilles.

L'expérience a permis de confirmer qu'*A. atacamensis* est une plante résistante à des doses importantes de B, As et sel même en cas d'exposition combinée. L'As n'occasionne aucun effet mesuré à la concentration de 100 mg/l, le sel (NaCl 10 000 mg/l) a un effet positif sur la croissance tandis que le bore a un impact négatif. La présence de sel augmente l'absorption du bore tout en réduisant le stress subi. Les résultats laissent supposer que la présence de sel entraîne une séquestration ou une excrétion accrue du bore au niveau feuilles.

Le potentiel de cette plante en tant que phytostabilisateur d'As et phytoextracteur de B est confirmé par les résultats obtenus même en cas de toxicités multiples.