

# وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Université Badji Mokhtar  
ANNABA



جامعة باجي مختار  
عنابة

Faculté des Sciences  
Département de Biologie  
Laboratoire de Toxicologie Cellulaire

## THESE

Présentée en vue de l'obtention :  
du Diplôme de DOCTORAT

## Etude des effets du Cadmium sur la Tomate (*Lycopersicon esculentum* L.) : essai in vivo et in vitro

Option: **Ecotoxicologie végétale**

Présentée Par

M<sup>me</sup> SBARTAI Hana

DIRECTEUR DE THESE : M.R. DJEBAR

Prof. Université de Annaba

Devant le jury :

Président : BERREBBAH Houria

Pr. Université de Annaba

Examineurs : RAHMOUNE Chaabane

Pr. Université de Constantine

BOURGUIGNONS Jacques

Dr. CEA. Grenoble

MEKSEM Leila

MC. Université de Annaba

*«Les êtres vivants ne peuvent construire et maintenir leur existence, leur autonomie, leur individualité, leur originalité que dans la relation écologique, c'est-à-dire dans et par la dépendance à l'égard de leur environnement ; d'où l'idée alpha de toute pensée écologisée: l'indépendance d'un être vivant nécessite sa dépendance à l'égard de son environnement ».*

**Edgar Morin**  
**(La Méthode, tome I).**

## ***Résumé***

Des plants de tomate (*Lycopersicon esculentum*) préalablement cultivés sur une solution nutritive de base pendant 12 jours subissent un traitement par des concentrations croissantes en CdCl<sub>2</sub> pendant 07 jours. Les résultats obtenus ont montré que l'activité enzymatique (GST, CAT, APX, GPX) subit des variations dès l'induction du traitement (cd) c'est à dire après 1h d'application jusqu'à fin du traitement mais cette fluctuation reste régressive en fonction du temps et les différentes concentrations du métal alors que l'activité APX, GPX augmente pour les valeurs inférieure à 100µM et au delà de cette dernière ces activités chute progressivement avec la concentration du métal. La même chose a été observée dans l'étude des métabolismes respiratoires et photosynthétiques.

Entre autre, l'addition de 1mM de CaCl<sub>2</sub> dans le milieu améliore la quantité de protéine qui régresse légèrement en fonction des deux premières concentrations (cd1 et Cd2) et par conséquent la GSH et la GST. Alors que pour les doses Cd3 et Cd4, l'ajout de 1mM de CaCl<sub>2</sub> accentue le stress oxydatif et ceci est expliqué par une augmentation importante de protéines, et la diminution de la quantité de GSH et GST dans les racines de la plante. Des résultats similaires ont été observés pour l'activité APX, GPX, et CAT. L'ensemble de ces données suggère que l'incidence négative du cadmium sur les différents métabolismes peut être atténuée par un apport adéquat en calcium dans le milieu de culture.

En parallèle, une étude agronomique a été réalisée en plein champ dans la région d'El kous (El-Tarf) afin de démontrer l'effet du cadmium et de son interaction avec le calcium sur les paramètres de croissance, de qualité et de production.

**Mots-clés:** Cadmium, Calcium, GSH, GST, APX, GPX, CAT, Protéine, chlorophylles, Respiration, Photosynthèse, *Lycopersicon esculentum*.

# **REMERCIEMENTS**

*Mes respects et ma reconnaissance vont au Professeur BERREBBAH Houria, non seulement pour avoir accepté de présider ce jury mais également pour sa précieuse aide ainsi que sa disponibilité à mon égard, qu'elle trouve ici le témoignage de ma profonde considération.*

*Je tiens tout particulièrement à exprimer mes plus vifs remerciements et ma profonde gratitude au Professeur DJEBAR Med Reda de l'Université de Annaba, qui m'a fait l'honneur d'assurer mon encadrement et qui a su faire preuve de compréhension tout au long de ces années me permettant ainsi de mener à bien cette étude.*

*Ma plus profonde gratitude au Professeur RAHMOUNE Chaabane de l'Université de Constantine, pour l'attention qu'il portera à mon travail.*

*Mes remerciements au Dr. Jacques Bourguignons Université de Joseph Fourier CEA Grenoble, pour ses précieux conseils qui ont permis la réalisation de certaines expérimentations et pour toute la bibliographie qu'il a mise à ma disposition.*

*Mes plus vifs remerciements à Madame MEKSEM Leila de l'Université de Annaba, pour l'immense privilège qu'elle me fait en acceptant d'examiner ce travail.*

*Ma reconnaissance s'adresse également à ma famille et à mes proches amis qui ont du supporter mes écarts de rythme de vie et d'humeur et qui m'ont toujours soutenu et encouragé.*

*Un grand merci pour tous ceux qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de cette thèse, qu'ils trouvent ici l'expression de toute ma gratitude.*

## ملخص

شجيرات من الطماطم (*Lycopersicon esculentum*) التي سبق ان نمت على محلول مغذي لمدة 12 يوما تتلقي علاج عن طريق تركيزات متزايدة من اتكدميوم لمدة 07 أيام أظهرت النتائج أن النشاط الإنزيمي (GPX ، CAT ، APX ، GST) يخضع لتغييرات من بداية العلاج أي بعد 1 ساعة من تطبيق العلاج حتى نهايته. ولكن هذا الارتداد يبقى متناقص من حيث الوقت والتركيزات المختلفة للمعدن في حين أن نشاط GPX ، APX يتزايد للقيم اقل من 100 ميكرو مول وأبعد من ذلك تتناقص هذه الأنشطة تدريجيا مع التركيزات المختلفة. نفس الشيء لوحظ في دراسة الايض التنفسي والتمثيل الضوئي.

إضافة الكالسيوم بمقدار 1 ميلي مول في الوسط يحسن من كمية البروتين التي تنخفض بشكل طفيف تبعا للتركيزات (cd1 و cd2) وبالتالي GSH و GST ، في حين ان جرعة cd3 و cd4 ، فان إضافة 1 ميلي مول من الكالسيوم يبرز إجهاد مؤكسد وهذا يفسر بزيادة كبيرة في البروتينات ، وقلت كمية GST و GSH في جذور النبات. نتائج مماثلة لوحظت بالنسبة للنشاط APX ، GPX. كل هذه البيانات تشير إلى الأثر السلبي للكدميوم على مختلف العمليات الايضية قادر على التقليل من المقادير الملائمة من الكالسيوم في وسط النمو.

وفي الوقت نفسه ، أجرى دراسة زراعية في الحقول المفتوحة في المنطقة الكوس بالطارف لتبيين أثر الكدميوم و تفاعله مع الكالسيوم على معالم النمو و الجودة و الإنتاج.

الكلمات الرئيسية : الكدميوم ، كالسيوم ، GSH ، GST ، APX ، GPX ، والبروتين ، الكلوروفيل ،

والتنفس ، والتمثيل الضوئي ، *Lycopersicon esculentum*

## ***Abstract***

The tomato plants (*Lycopersicon esculentum*) previously grown on a nutrient solution base for 12 days and undergo treatment by increasing concentrations in CdCl<sub>2</sub> for 07 days. The results showed that the enzyme activity (GST, CAT, APX, GPX) suffers from variations due to induction treatment (Cd): after 1h apply until end of treatment but this fluctuation remains regressive in terms of time and different concentrations of the metal while the activity APX, GPX increases for values less than 100 μ M and beyond that these activities fall gradually with the concentration of metal. The same was observed in the study of metabolism and respiratory photosynthetic.

Among other, adding 1mM of CaCl<sub>2</sub> in the middle improves the amount of protein that is declining slightly depending on the first two concentrations (Cd1 and Cd2) and hence the GSH and the GST. While doses Cd3 and Cd4, adding 1mM of CaCl<sub>2</sub> accentuates oxidative stress and this is explained by a significant increase in protein, and reducing the amount of GST and GSH in the roots of the plant. Similar results were observed for the activity APX, GPX, and CAT. All these data suggest that the negative impact of cadmium on different metabolisms can be mitigated by an adequate intake of calcium in the culture medium.

In parallel, a study Agronomy was conducted in open fields in the region of El kous (El-Tarf) to demonstrate the effect of cadmium and its interaction with calcium on the parameters of growth, quality and production.

**Keywords:** Cadmium, Calcium, GSH, GST, APX, GPX, CAT, protein, chlorophyll, respiration, photosynthesis, *Lycopersicon esculentum*.

**Résumé en Arabe**

**Résumé en Français**

**Résumé en Anglais**

**Liste des figures**

**Liste des tableaux**

**Introduction**

**A. Les Métaux lourds.....9**

**1. Généralités.....9**

**2. Processus physiologique de Bioaccumulation des métaux.....11**

▪ Mécanisme de capture des Métaux lourds.....12

▪ Mécanisme d'excrétion des Métaux lourds.....15

▪ Mécanisme de stockage des Métaux lourds.....15

▪ Bioaccumulation et Bioamplification dans les réseaux trophiques.....16

▪ Facteurs affectant la bioaccumulation des métaux.....16

**3. Toxicité et Tolérance aux métaux lourds.....18**

3.1. La membrane plasmique.....19

3.2. Système antioxydant.....20

3.3. La chélation et la compartimentation cellulaire.....20

3.4. Autres systèmes de défense au stress métallique.....24

**4. Adaptation aux métaux lourds.....26**

**5. Les Métaux lourds dans la Plante.....28**

**6. Utilisation des Plantes dans la Réhabilitation des Sols.....31**

▪ Cas de la Tomate

**B. Le Cadmium.....35**

**1. Propriétés fondamentales.....35**

**2. Utilisation.....35**

**3. Cycle et source naturelle anthropique.....36**

**4. Propriétés biologiques et toxicité.....36**

**5. Bioaccumulation du Cadmium.....38**

**6. Réglementation.....39**

|  |           |
|--|-----------|
| <b>C. Le Stress Oxydant.....</b>                             | <b>39</b> |
| 1. Définition.....   | 39        |
| 2. La réponse adaptative au stress oxydant.....              | 41        |
| ▪ Les Espèces Réactives à l'Oxygène ROS.....                 | 42        |
| ▪ Source et formation des dérivés ROS.....                   | 42        |
| ▪ Les métaux lourds et l'accumulation des ROS.....           | 44        |
| ▪ Implication des mitochondries dans le stress oxydatif..... | 45        |
| 3. Les Biomarqueurs.....                                     | 45        |
| ▪ Les Biomarqueurs enzymatiques.....                         | 46        |
| ▪ Les Biomarqueurs non enzymatiques.....                     | 50        |
| 4. Mécanisme de détoxification cellulaire.....               | 52        |
| <b>D. Objectifs du travail.....</b>                          | <b>54</b> |
| <br>   |           |
| <b>Chapitre I : Matériel et Méthodes.....</b>                | <b>56</b> |
| A. Matériel expérimental .....                               | 56        |
| B. Produits chimiques utilisés.....                          | 56        |
| C. Etude in vivo.....  | 57        |
| 1. Dispositif expérimental.....                              | 58        |
| 2. Conduite de l'essai.....                                  | 58        |
| ▪ Précédent cultural.....                                    | 58        |
| ▪ Préparation de la pépinière.....                           | 58        |
| ▪ Semis et entretien de la pépinière.....                    | 59        |
| ▪ Repiquage et travaux d'entretien.....                      | 59        |
| ▪ La récolte des fruits.....                                 | 60        |
| 3. Paramètres étudiés.....                                   | 60        |
| <u>3.1. Paramètres de Croissance.....</u>                    | <u>60</u> |
| ▪ Hauteur moyenne du plant.....                              | 60        |
| ▪ Nombre moyenne de fleurs par plant.....                    | 60        |
| ▪ Nombre de bouquet de fleur par plant.....                  | 60        |
| ▪ Taux de nouaison.....                                      | 60        |



|  |           |
|--|-----------|
| <b><u>3.2. Paramètre de Production</u></b> .....           | 61        |
| ▪ Nombre moyen de fruits par plant.....                    | 61        |
| ▪ Production moyenne par plant.....                        | 61        |
| ▪ Poids moyen de fruit.....                                | 61        |
| ▪ Taux d'avortement.....                                   | 61        |
| ▪ Rendement moyen par traitement.....                      | 61        |
| <b><u>3.3. Paramètres de Qualité</u></b> .....             | 62        |
| ▪ Indice de Réfraction.....                                | 62        |
| ▪ pH du fruit.....   | 62        |
| ▪ Acidité titrable du fruit.....                           | 63        |
| <br>   |           |
| <b>D. Etude in vitro</b> .....                             | <b>63</b> |
| 1. Conditions de culture.....                              | 63        |
| 2. Techniques Analytiques.....                             | 65        |
| 2.1. Dosage des Protéines totales.....                     | 65        |
| 2.2. Dosage des Chlorophylles.....                         | 65        |
| 2.3. Dosage des Biomarqueurs.....                          | 66        |
| 2.3.1. Dosage Enzymatiques.....                            | 66        |
| ▪ Préparation de l'extrait enzymatique.....                | 66        |
| ▪ Dosage l'activité Ascorbate-peroxydases (APX).....       | 67        |
| ▪ Dosage de l'activité Guaïcol-peroxydases (GPX).....      | 67        |
| ▪ Dosage de l'activité catalase (CAT).....                 | 68        |
| ▪ Dosage de l'activité Glutathion S-Transférase (GST)..... | 68        |
| 2.3.2. Dosage non Enzymatiques : Le Glutathion (GSH).....  | 68        |
| 2.4. Etude du métabolisme Respiratoire.....                | 69        |
| 2.5. Etude du métabolisme photosynthétique.....            | 70        |
| <b>E. L'Analyse Statistique</b> .....                      | <b>71</b> |
| <br>   |           |
| <b>Chapitre II. Résultats</b> .....                        | <b>72</b> |
| <b><u>1. Etude in vivo</u></b> .....                       | <b>73</b> |
| 1.1. Paramètres de Croissance.....                         | 73        |

|   |           |
|---|-----------|
| ▪ Hauteur moyenne du plant.....                                 | 73        |
| ▪ Nombre de bouquet de fleur par plant.....                     | 74        |
| ▪ Nombre moyen de fleurs par plant.....                         | 75        |
| ▪ Taux de nouaison.....   | 76        |
| <b>1.2. Paramètre de Production.....</b>                        | <b>78</b> |
| ▪ Nombre moyen de fruits par plant.....                         | 78        |
| ▪ Poids moyen de fruit.....                                     | 79        |
| ▪ Taux d'avortement.....  | 80        |
| ▪ Production moyenne par plant.....                             | 81        |
| ▪ Rendement moyen par traitement.....                           | 82        |
| <b>1.3. Paramètres de Qualité.....</b>                          | <b>83</b> |
| ▪ L'indice de Réfraction.....                                   | 83        |
| ▪ Le pH du fruit.....   | 84        |
| ▪ L'acidité titrable du fruit.....                              | 85        |
| <b><u>2. Etude in vitro</u>.....</b>                            | <b>86</b> |
| 2.1. Effet du Cd et Cd/Ca sur les Protéines totales.....        | 87        |
| 2.2. Effet du Cd et Cd/Ca sur les Chlorophylles.....            | 88        |
| 2.3. Effet du Cd et Cd/Ca sur les Biomarqueurs.....             | 89        |
| 2.3.1. Dosages Enzymatiques.....                                | 89        |
| ▪ L'effet du Cd et Cd/Ca sur l'activité APX.....                | 89        |
| ▪ L'effet du Cd et Cd/Ca sur l'activité GPX.....                | 90        |
| ▪ L'effet du Cd et Cd/Ca sur l'activité (CAT).....              | 91        |
| ▪ L'effet du Cd et Cd/Ca sur l'activité GST.....                | 92        |
| 2.3.2. Dosages non Enzymatiques : Le Glutathion (GSH).....      | 93        |
| 2.4. Effet du Cd et Cd/Ca sur le métabolisme Respiratoire.....  | 95        |
| 2.5. Effet du Cd et Cd/Ca sur métabolisme photosynthétique..... | 97        |
| <b>Chapitre III. Discussion Générale.....</b>                   | <b>99</b> |
| <b>CONCLUSION</b>   |           |
| <b>Références Bibliographiques</b>                              |           |
| <b>Annexes</b>  |           |
| <b>Publications.</b>  |           |

## *Liste des figures*

| <b>Numéro de la figure</b> | <b>Titre</b>  | <b>Page</b> |
|----------------------------|---|-------------|
| <b>1</b>                   | Schéma général de la détoxification des ROS par les systèmes antioxydants cellulaires         | <b>53</b>   |
| <b>2</b>                   | Préparation des boîtes de culture   | <b>56</b>   |
| <b>3</b>                   | Protocole Expérimental de l'essai   | <b>58</b>   |
| <b>4</b>                   | Schéma de l'électrode à oxygène   | <b>70</b>   |
| <b>5</b>                   | Hauteur des plants de Tomate traités par différentes concentrations de cadmium.               | <b>73</b>   |
| <b>6</b>                   | Hauteur des plants de Tomate traités par différentes concentrations de Cd/Ca.                 | <b>73</b>   |
| <b>7</b>                   | Nombre de BF/plants de Tomate traités par différentes concentrations de cadmium.              | <b>75</b>   |
| <b>8</b>                   | Nombre de BF/plants plants de Tomate traités par différentes concentrations de Cd/Ca.         | <b>75</b>   |
| <b>9</b>                   | Nombre de fleur/plants de Tomate traités par différentes concentrations de Cd.                | <b>76</b>   |
| <b>10</b>                  | Nombre de fleur/plants plants de Tomate traités par différentes concentrations de Cd/Ca       | <b>76</b>   |
| <b>11</b>                  | Taux de nouaison de la Tomate traités par différentes concentrations de cadmium.              | <b>77</b>   |
| <b>12</b>                  | Taux de nouaison de la Tomate traités par différentes concentrations de Cd/Ca.                | <b>77</b>   |
| <b>13</b>                  | Nombre moyen de fruits/plants de la Tomate traités par différentes concentrations de cadmium. | <b>78</b>   |
| <b>14</b>                  | Nombre moyen de fruits/plants de la Tomate traités à différentes concentrations de Cd/Ca.     | <b>78</b>   |
| <b>15</b>                  | Poids moyen de fruits/plants de Tomate traités par différentes concentrations de cadmium.     | <b>79</b>   |
| <b>16</b>                  | Poids moyen de fruits/plants de Tomate traités par différentes concentrations de Cd/Ca.       | <b>79</b>   |

| <b>Numéro de la figure</b> | <b>Titre</b>   | <b>Page</b> |
|----------------------------|--|-------------|
| <b>17</b>                  | Taux d'avortement des fruits de Tomate traités par différentes concentrations de cadmium.              | <b>80</b>   |
| <b>18</b>                  | Taux d'avortement des fruits de Tomate traités par différentes concentrations de Cd/Ca.                | <b>80</b>   |
| <b>19</b>                  | Production moyenne par plants de Tomate Traités par différentes concentrations de cadmium.             | <b>81</b>   |
| <b>20</b>                  | Production moyenne par plants de Tomate traités par différentes concentrations de Cd/Ca.               | <b>81</b>   |
| <b>21</b>                  | Rendement moyen de Tomate traités par différentes concentrations de cadmium.                           | <b>82</b>   |
| <b>22</b>                  | Rendement moyen de Tomate traités par différentes concentrations de Cd/Ca.                             | <b>82</b>   |
| <b>23</b>                  | IR du fruit de Tomate traités par différentes concentrations de cadmium.                               | <b>83</b>   |
| <b>24</b>                  | IR du fruit de Tomate traités par différentes concentrations de Cd/Ca.                                 | <b>83</b>   |
| <b>25</b>                  | pH du fruit de Tomate traités par différentes concentrations de cadmium.                               | <b>84</b>   |
| <b>26</b>                  | pH du fruit de Tomate traités par différentes concentrations de Cd/Ca.                                 | <b>84</b>   |
| <b>27</b>                  | L'acidité titrable du fruit de Tomate traités par différentes concentrations de cadmium.               | <b>85</b>   |
| <b>28</b>                  | L'acidité titrable du fruit de Tomate traités par différentes concentrations de Cd/Ca.                 | <b>85</b>   |
| <b>29</b>                  | Quantité de protéines dans les racines de Tomate traités par différentes concentrations de Cd.         | <b>86</b>   |
| <b>30</b>                  | Quantité de protéines dans les racines de Tomate traités par différentes concentrations Cd/Ca.         | <b>86</b>   |
| <b>31</b>                  | Quantité des Chlorophylles dans les feuilles de Tomate traités par différentes concentrations de Cd.   | <b>87</b>   |
| <b>32</b>                  | Quantité des Chlorophylles dans les feuilles de Tomate traités par différentes concentrations de Cd/Ca | <b>87</b>   |

|           |   |            |
|-----------|---|------------|
| <b>33</b> | L'activité APX dans les racines de Tomate traités à différente concentration de cadmium.  | <b>88</b>  |
| <b>34</b> | L'activité APX dans les racines de Tomate traités à différente concentration de Cd/Ca   | <b>88</b>  |
| <b>35</b> | L'activité GPX dans les racines de Tomate. traités à différente concentration de Cadmium.   | <b>89</b>  |
| <b>36</b> | L'activité GPX dans les racines de Tomate. traités à différente concentration de Cd/Ca.   | <b>89</b>  |
| <b>37</b> | L'activité CAT des racines de Tomate traités par différentes concentrations de cd.  | <b>90</b>  |
| <b>38</b> | L'activité CAT des racines de Tomate traités par différentes concentrations de Cd/Ca.   | <b>90</b>  |
| <b>39</b> | L'activité GST dans les racines de Tomate traités à différente concentration de cadmium.  | <b>91</b>  |
| <b>40</b> | L'activité GST dans les racines de Tomate traités à différente concentration de Cd/Ca   | <b>91</b>  |
| <b>41</b> | L'activité GSH dans les racines de Tomate traités par différentes concentrations de cadmium.  | <b>92</b>  |
| <b>42</b> | L'activité GSH dans les racines de Tomate traités par différentes concentrations de Cd/Ca.  | <b>92</b>  |
| <b>43</b> | Effet du Cadmium sur le métabolisme respiratoire après 7 jours de traitement  | <b>94</b>  |
| <b>44</b> | Effet du Cd/Ca sur le métabolisme respiratoire après 7 jours de traitement  | <b>95</b>  |
| <b>45</b> | Effet du Cadmium sur le métabolisme photosynthétique après 7 jours de traitement  | <b>96</b>  |
| <b>46</b> | Effet du Cd/Ca sur le métabolisme photosynthétique après 7 jours de traitement  | <b>97</b>  |
| <b>47</b> | Hypothèse représentant la stratégie adoptée par les cellules racinaires de plants de tomate Traitées par de faibles concentrations de Cd (<100µM). Stratégie de tolérance | <b>113</b> |
| <b>48</b> | Hypothèse représentant la stratégie adoptée par les cellules racinaires de plants de tomate Traitées par de fortes concentrations de Cd (>100µM). Stratégie d'adaptation. | <b>114</b> |

## *Liste des tableaux*

| <b>Tableau</b> | <b>Titre</b>                      | <b>Page</b> |
|----------------|-----------------------------------|-------------|
| <b>1</b>       | Caractéristiques de la Rio-Grandé | <b>57</b>   |
| <b>2</b>       | Solution nutritive de Hoshang     | <b>64</b>   |

## **A. Les Métaux lourds**

### **1. Généralités :**

Depuis la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle, le secteur industriel s'est développé sans préoccupation des rejets d'éléments toxiques dans l'environnement et particulièrement les sols. De fait, le sol a été longtemps considéré comme une ressource renouvelable, voire même inépuisable à l'échelle des générations humaines, capable de recevoir sans conséquence les rejets de nos activités. On sait maintenant que les sols sont caractérisés par un équilibre fragile et sont vulnérables. Aujourd'hui, ce patrimoine est menacé à la fois par le lourd héritage du passé et par l'extension des surfaces consacrées au développement industriel (Lecomte, 1998).

En 1998, le sens des termes pollution et contamination, souvent employés confusément l'un pour l'autre, est fixé par le rapport 42 de l'Académie des Sciences (Bourrelier & Berthelin, 1998). Le terme de « contamination » qualifie un apport d'éléments, issus de l'extérieur du site ; la conséquence en est une élévation de leur teneur originelle, sans indication sur leurs conséquences sur le comportement des organismes vivants présents sur ou à proximité du site. Le terme de « pollution » par contre, doit être réservé à une contamination qui engendre une perturbation du milieu, ou de l'usage normal qui en est fait habituellement.

Parmi les principaux polluants générés par les activités industrielles, les métaux lourds (Cu, le Pb, le Cr, ...) posent effectivement des problèmes particulièrement préoccupants. Ces éléments, par nature non biodégradables, présentent une forte écotoxicité et pourraient être impliqués dans de nombreuses pathologies (atteintes du système nerveux central, du foie, des reins, mais aussi cancers et malformations embryonnaires ; Abrahams, 2002 ; Adriano, 2001).

Ainsi, pour reprendre les termes d'un récent rapport de l'Office Parlementaire des Choix Scientifiques et Technologiques, « si les métaux lourds ont fait la civilisation, ils peuvent aussi la défaire ». Il est donc aujourd'hui indispensable non seulement de mieux connaître les effets de ces polluants sur les organismes vivants, mais aussi de mettre en œuvre des solutions durables, visant à limiter leurs risques. Malgré leur forte toxicité potentielle, la plupart des sites contaminés par des métaux lourds, présentent souvent une flore diversifiée tolérant apparemment bien de fortes teneurs en métaux.

L'étude de ces plantes résistantes, par leurs capacités de détoxication, d'immobilisation ou d'absorption des métaux lourds, pourrait donc constituer un outil intéressant, non seulement pour estimer les risques de transfert potentiel des métaux lourds au sein de l'écosystème (Martin *et al.*, 1996), mais aussi comme outil de réhabilitation des sols.

Le phénomène de tolérance vis-à-vis des métaux lourds chez les plantes a focalisé l'intérêt des scientifiques, écologistes, physiologistes et biologistes mais aussi des ingénieurs et des chimistes depuis très longtemps. Dès le XVIème siècle, le célèbre savant Georgius Agricola rapporte que des végétaux semblent souffrir lorsqu'ils se développent sur des sols riches en minerais (Agricola, 1556). De même lorsque son but est de repérer les veines métallifères intéressantes, il précise qu'une végétation particulière, absente aux alentours, se développe au-dessus de ces ressources. Bien que le concept de tolérance n'apparaisse pas encore, il remarque ainsi l'effet nocif des métaux sur une végétation dite sensible, et la relative tolérance d'une végétation plus adaptée.

Dans les années 1950, la prospection de minerais de cuivre en Afrique s'est largement appuyée sur la découverte d'une petite Poacée, *Haumaniastrum katangense* et de deux Lamiacées, *Aeollanthus biformifolius* et *Becium homblei*, toutes les trois confinées à des sols riches en cuivre (Brooks, 1998). Avec l'épuisement progressif des minerais de surface, l'intérêt pour des stratégies de repérage des gisements potentiels par la



végétation spécifique a fortement diminué, mais pas l'intérêt pour les surfaces contaminées.

L'étude des communautés végétales, encore appelée phytosociologie, a permis de poursuivre et d'élargir l'analyse de la végétation des terrains riches en métaux toxiques, d'origine naturelle ou anthropique. Dans le cas des sites à serpentine, par exemple, le sol issu de l'altération de minéraux naturellement riche en métaux de transition, Cr, Ni, Cu et Co porte une flore spécifique adaptée aux fortes teneurs métalliques (Delaigue, 1989). Avec l'avènement de l'ère industrielle et son lot de pollutions métalliques, les observations commencent à s'étendre aux sites anthropisés riches en métaux lourds. Cependant, de nombreuses lacunes persistent encore.

### **2. Processus physiologique de Bioaccumulation des Métaux :**

Un métal est un élément chimique, issu le plus souvent d'un minerai doté d'un éclat particulier, bon conducteur de chaleur et d'électricité, ayant des caractéristiques de dureté et de malléabilité, se combinant aisément avec d'autres éléments pour former des alliages utilisés par l'homme depuis l'Antiquité. Si les métaux sont souvent indispensables au déroulement des processus biologiques (oligo-éléments), nombre d'entre eux peuvent s'avérer contaminants pour diverses formes de vie, lorsque leur concentration dépasse un seuil, lui-même fonction de l'état physico-chimique (spéciation) de l'élément considéré. C'est le cas du fer (Fe), du cuivre (Cu), du zinc (Zn), du nickel (Ni), du cobalt (Co), du vanadium (V), du sélénium (Se), du molybdène (Mo), du manganèse (Mn), du chrome (Cr), de l'arsenic (As) et du titane (Ti) (Miquel, 2001). D'autres ne sont pas nécessaires à la vie et peuvent être même préjudiciables comme le mercure (Hg), le plomb (Pb), le cadmium (Cd) et l'antimoine (Sb) (Chiffolleau *et al.*, 2001).

L'appellation « éléments en traces métalliques » (ETM) ou par extension « éléments traces » est communément utilisée pour désigner les éléments métalliques naturels, caractérisés par une masse volumique élevée, supérieure à  $5 \text{ g/cm}^3$ .

Les utilisations des métaux sont multiples et très diversifiées, depuis les additifs de plomb dans les carburants jusqu'aux sels d'argent de l'industrie photographique, au nickel ou au cadmium des batteries d'accumulateurs, au zinc des gouttières ou au chrome des aciers inoxydables, au cuivre de l'industrie électrique ou à l'arsenic des produits phytosanitaires. Les sources de contamination le sont par conséquent aussi. Durant toutes les phases d'élaboration, d'utilisation et/ou de recyclage de ces produits, des métaux sont rejetés dans l'environnement, soit directement dans les eaux continentales ou marines, soit dans l'atmosphère transportés par les vents, associés aux aérosols avant de se déposer par voie sèche ou humide à la surface de la terre ou de l'océan.

Ainsi, les métaux traces sont présents dans tous les compartiments de l'environnement, à la fois parce qu'ils sont naturellement présents (sources naturelles) ou parce que certaines activités de l'homme favorisent leur dispersion (source anthropique).

### ▪ **Mécanismes de capture des Métaux Lourds**

Pendant tout processus physiologique d'échange avec le milieu environnant, les molécules exogènes pénètrent à travers les barrières biologiques séparant l'environnement interne de l'organisme du milieu externe. Quand la contamination se fait, ces barrières (cutanées et respiratoires pour la contamination directe, et intestinale pour la contamination trophique) montrent des propriétés biologiques liées à leur structure et aux conditions physico-chimiques de l'environnement (température, pH, électrolytes, etc.).

Les caractéristiques de l'interface Environnement - Organisme ont une influence importante sur la forme métallique accumulée. Cette interface est une membrane lipidique, non polaire, imprégnée de molécules qui vont intervenir dans le transport de substances polaires essentielles à travers la membrane.

La concentration de l'ion libre métallique a une grande importance dans le contrôle de la capture métallique à partir des solutions. Le métal sous forme d'ion libre a été proposé comme l'espèce métallique dissoute la plus biodisponible (Campbell, 1995). Ce modèle a été mis en place au début des années 80 par Morel et a été appliqué avec succès pour interpréter la toxicité du métal. Ainsi, le transport de  $Hg^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  et  $Pb^{2+}$  passerait par la voie d'un canal protéique non spécifique sur la membrane cellulaire.

La majorité des ions ne traversent les membranes plasmiques hydrophobes que grâce à un ligand transporteur. Une fois dans la cellule, le métal sera capté par un autre ligand afin de prévenir sa diffusion vers l'extérieur. Ces différents ligands constituent un système de « piègeage cinétique » dont l'efficacité dépend de l'importance de leur synthèse et de la force de liaison avec le métal (Simkiss *et al.*, 1982; Simkiss et Taylor, 1995). Le transport dans la cellule et dans les organes de stockage se fait par déplacement, par affinités successives (jusqu'au puits cinétique ou jusqu'à l'excrétion). La vitesse d'assimilation sera fonction de la réaction la plus lente (réaction limitante), qui est souvent le transfert intracellulaire. Ainsi, le modèle de l'ion libre (FIAM, Free Ion Activity Model) traduit l'interaction d'un métal ( $MeZ^+$ ) chez un organisme en trois étapes successives: advection/diffusion du métal à l'équilibre dans la solution « baignant » l'interface entre la membrane biologique et le milieu d'exposition (1), réaction de complexations avec un site de surface (2), transport à travers la membrane (3).

Les limites d'application du modèle de l'ion libre sont une augmentation importante de la toxicité de certains métaux (Cd, Zn) en présence de métabolites de poids moléculaire faible (ex. le citrate), ainsi qu'un mécanisme responsable de cette toxicité accrue (prise en charge "accidentelle"; "piggy-back" transport) (Campbell, 1995; Errecalde *et al.*, 1998).

De plus, la découverte de l'implication de complexes de surface ternaires ("mixed-ligand" ou "ternary" surface complexes) dans la réponse biologique à l'aluminium constitue une exception plutôt subtile au modèle de l'ion libre, mais il est potentiellement lourd de conséquences en écotoxicologie.

En effet, s'il peut être généralisé à des métaux autres que l'Al, on ne pourra plus prétendre pouvoir prédire la réponse biologique à un métal en fonction uniquement de l'activité de l'ion métallique libre (Wilkinson *et al.*, 1990; Wilkinson *et al.*, 1993). Aussi, le modèle de l'ion libre ne tient pas compte du rôle tensioactif de la matière organique dissoute naturelle. La matière organique naturelle des eaux naturelles peut se concentrer non seulement à des surfaces inorganiques (argiles, oxydes de fer), mais également à des surfaces d'organismes vivants (surfaces cellulaires).

Le premier phénomène est connu depuis plus de 15 ans, mais le second, l'interaction des acides humiques et fulviques naturels avec des surfaces cellulaires, n'a pas été apprécié (Parent *et al.*, 1996; Campbell *et al.*, 1997; Roy et Campbell, 1997). Cette dernière interaction pourrait avoir des conséquences importantes en écologie et toxicologie aquatiques (protection accrue vis-à-vis des métaux toxiques).

Enfin, le potentiel de la métallothionéine a été évalué comme biomarqueur d'exposition à des métaux toxiques, notamment pour le Cd, et comme biomarqueur d'effets délétères provoqués par ces métaux.

▪ **Mécanisme d'excrétion des Métaux lourds**

Parallèlement aux étapes de pénétration et de répartition des contaminants au sein de l'organisme, de nombreux mécanismes physiologiques et biochimiques contribuent à les éliminer. Tous les organismes piègent des métaux en quantités importantes mais pour beaucoup d'espèces, l'excrétion des métaux accumulés n'est pas négligeable. Les quatre processus principaux sont: la défécation, la perte *via* la surface perméable, la désorption passive et les granules d'expulsion (Phillips et Rainbow, 1994).

▪ **Mécanisme de Stockage des Métaux lourds**

Après la capture et l'excrétion des métaux, le troisième facteur déterminant l'accumulation des éléments traces est la séquestration des métaux absorbés dans les tissus. Plusieurs mécanismes existent incluant les piègeages des métaux et la séquestration d'éléments dans des granules ou dépôts insolubles qui peuvent être ou non associés à des lysosomes (George *et al.*, 1978; George, 1980; Amiard-Triquet et Caurant, 1994; Phillips et Rainbow, 1994).

La présence du métal dans la phase dissoute traduit son absorption sous forme dissoute avec ou sans médiateur. Sa présence dans les éléments figurés résulte de la phagocytose de vésicules formées lors de l'absorption du métal particulaire par pinocytose et/ou de la phagocytose d'agrégats protéiniques riches en cations divalents (George, 1980).

Le cas des granules a été bien étudié en particulier par Martoja et Martoja (1982) qui les considère comme des sites d'accumulation pour les déchets métalliques de différents processus physiologiques, formés par la précipitation des métaux en phosphate, carbonate et sulfure (Martoja et Martoja, 1978; Martoja et Martoja, 1982).

▪ **Bioaccumulation et Bioamplification dans les réseaux trophiques**

Des études menées « in situ » ont révélé une augmentation des concentrations de certains polluants, au fur et à mesure des différents maillons de la chaîne trophique: la bioamplification. Le prédateur concentre une substance (ou un élément) à un niveau supérieur à celui où il se trouve dans sa proie. Cette amplification a été constatée pour plusieurs contaminants organiques et dans le cas des métaux, pour la forme méthylée du mercure (Fowler, 1982). Quasi-unanimement reconnu par les scientifiques pour le mercure, plus particulièrement pour les dérivés organiques, ce concept est très discuté pour les autres contaminants métalliques, voire contesté.

Pour Ramade (1979), la rémanence d'un contaminant associé à des transferts cumulatifs « proies contaminées - prédateurs » est à l'origine de ce processus. Au contraire, une dilution entre les échelons primaires et secondaires a été montrée à plusieurs reprises. La bioamplification des contaminants au sein des structures biocénotiques ne peut être abordée par une approche mono-factorielle. Ce processus est lié à une conjonction de facteurs favorables (Boudou, 1982): concentration du contaminant dans le milieu, stabilité des conditions, aptitude du contaminant à franchir les barrières biologiques, rémanence de la molécule à l'égard des mécanismes de dégradation (abiotiques et biotiques), transferts trophiques, types de réseaux alimentaires, durée de vie, etc. En fait, la bioamplification est due à une intégration de l'ensemble de la structure biologique des écosystèmes (réseaux alimentaires).

▪ **Facteurs affectant la bioaccumulation des métaux :**

Le concept de bioaccumulation résulte donc de plusieurs mécanismes, agissant simultanément ou avec un décalage dans le temps. Les capacités de bioaccumulation, pour un même produit chimique, peuvent varier considérablement selon l'espèce considérée, le stade de développement des individus, les caractéristiques écologiques du système et les propriétés du contaminant (Luoma, 1983).

Les processus de contamination et de décontamination sont superposés dans le temps et leur importance relative varie fortement selon les modalités de la contamination (voies d'entrée, doses absorbées, etc.), selon les niveaux d'accumulation dans l'organisme et dans les organes et selon les facteurs physicochimiques du milieu environnant (Boudou *et al.*, 1982; Boudou *et al.*, 1983; Simkiss et Taylor, 1995).

L'étude de l'interaction entre les contaminants et les barrières biologiques est d'un intérêt considérable pour la compréhension des phénomènes écotoxicologiques, particulièrement la bioaccumulation et les transferts à travers les chaînes trophiques.

Il est bien connu que les niveaux de concentrations métalliques dans les organismes ne sont pas le seul résultat de leur biodisponibilité dans l'environnement. Les processus impliqués sont très complexes et sont influencés par le contaminant (taille molécule, spéciation chimique, etc.), l'organisme récepteur (propriétés membranaires, composition chimique, processus actifs), et l'environnement intra et extracellulaire (température, pH, etc.).

Le concept de bioaccumulation résulte donc de plusieurs mécanismes, agissant simultanément ou avec un décalage dans le temps. Les capacités de bioaccumulation, pour un même produit chimique, peuvent varier considérablement selon l'espèce considérée, le stade de développement des individus, les caractéristiques écologiques du système et les propriétés du contaminant (Luoma, 1983).

Les processus de contamination et de décontamination sont superposés dans le temps et leur importance relative varie fortement selon les modalités de la contamination (voies d'entrée, doses absorbées, etc.), selon les niveaux d'accumulation dans l'organisme et dans les organes et selon les facteurs physicochimiques du milieu environnant (Boudou *et al.*, 1982; Boudou *et al.*, 1983; Simkiss et Taylor, 1995).

L'étude de l'interaction entre les contaminants et les barrières biologiques est d'un intérêt considérable pour la compréhension des phénomènes écotoxicologiques, particulièrement la bioaccumulation et les transferts à travers les chaînes trophiques. Il est bien connu que les niveaux de concentrations métalliques dans les organismes ne sont pas le seul résultat de leur biodisponibilité dans l'environnement. Les processus impliqués sont très complexes et sont influencés par le contaminant (taille molécule, spéciation chimique, etc.), l'organisme récepteur (propriétés membranaires, composition chimique, processus actifs), et l'environnement intra et extracellulaire (température, pH, etc.).

### **3. Toxicité et tolérance aux métaux lourds**

Le premier effet des métaux lourds observable chez les végétaux est une inhibition de la croissance. Celle-ci s'accompagne très souvent de nombreux autres indices de dysfonctionnement : chlorose foliaire, importantes lésions nécrotiques, jaunissement progressif, repliement ou dessèchement du feuillage... A l'heure actuelle, les bases moléculaires de ces perturbations sont encore mal connues, mais on admet généralement qu'elles résultent d'un stress oxydatif, dû à la production d'espèces réactives de l'oxygène ou « Réactive Oxygen Species » (ROS).

Les ROS altèrent toute une série de substrats biologiques importants, avec comme conséquence la modification des domaines fonctionnels des biomolécules : inhibition de l'activité enzymatique, perturbation du métabolisme végétal (notamment la photosynthèse et la respiration), oxydation de protéines, altération des membranes cellulaires via l'induction de phénomènes de peroxydation lipidique, apparition de cassures au sein de l'ADN, pouvant conduire à la mort cellulaire (Devi and Prasad, 1999 ; Dietz *et al.*, 1999 ; Cheng, 2003).



Pour éviter ces inconvénients, des systèmes de stockage ou de détoxification des métaux accumulés ont été sélectionnés chez certains végétaux. D'efficacité variée selon les espèces, il semble à l'heure actuelle que trois mécanismes, encore mal compris, soient largement prépondérants : la modification de la perméabilité membranaire, qui permet de réduire l'entrée des métaux dans la cellule, le système anti-oxydant, qui limite les dégâts des espèces réactives de l'oxygène et la chélation intracellulaire, qui empêche l'activité de l'ion métallique.

### 3.1. La membrane plasmique

Le transport actif à travers la membrane plasmique des cellules racinaires est un processus important, car les ions ne peuvent pas diffuser librement à travers la double couche phospholipidique (Lasat, 2002), même passivement. Le rôle du plasmalemmes dans la régulation du transport métallique est donc primordial.

La membrane plasmique peut limiter l'accumulation des ions toxiques, soit en modifiant l'ensemble du flux ionique, soit en employant des systèmes ultra spécifiques autorisant un flux ionique qui ne transporterait pas les ions toxiques (Meharg, 1993). Cependant, si la membrane plasmique apparaît comme étant la première barrière face à l'entrée des éléments métalliques dans le cytosol, elle constitue également une cible importante pour la toxicité métallique.

En effet, il a été montré que le cuivre pouvait endommager la membrane par oxydation des protéines membranaires, peroxydation lipidique (Dietz *et al.*, 1999) ou inhibition des ATPases (Meharg, 1993). Par conséquent, l'imperméabilité n'est plus assurée et l'entrée des métaux toxiques par diffusion est facilitée (Kabata-Pendias and Pendias, 2001). Dès lors, la tolérance pourrait être due en partie à un renforcement de la protection de l'intégrité membranaire.

Néanmoins, la fonction des protéines associées au plasmalemme joue un rôle essentiel dans le transport des métaux à travers la membrane plasmique. Récemment, le gène codant un transporteur du fer, *irt<sub>1</sub>*, a été cloné chez *Arabidopsis thaliana* à partir d'une levure (Eide *et al.*, 1996). Il est représenté par un peptide de 339 acides aminés avec 8 domaines transmembranaires. Chez *A. thaliana*, *irt<sub>1</sub>*, est exprimé dans les racines en réponse à une carence en fer. Les caractéristiques de ce transporteur et les données physiologiques indiquent que ce système n'est pas spécifique ; il pourrait également transporter d'autres ions divalents comme le zinc et le cadmium (Briart et Lebrun, 1999). Cette compétition entre différents ions entraînerait une déficience en fer responsable des signes visibles de chlorose.

En résumé, la tolérance pourrait être due à la protection de l'intégrité membranaire ou à la protection de la fonction des protéines associées au plasmalemme, tels que les transporteurs, les canaux ioniques et les pompes à protons.

### 3.2. Système anti-oxydant

Le système anti-oxydant jouerait un rôle central dans la détoxification des métaux lourds ayant pénétrés dans la cellule. Il est donc important de bien comprendre d'une part les événements conduisant à un stress oxydant et d'autre part les mécanismes biochimiques impliqués dans la réponse à ce stress.

### 3.3. La chélation et la compartimentation cellulaire

- **La chélation** : La présence intracellulaire de ligands organiques, qui assurent une complexation et donc la détoxification de nombreux ions métalliques constitue à l'heure actuelle un aspect fondamental de la résistance aux métaux lourds. Chez les végétaux, quatre groupes principaux de ligands intracellulaires ont été caractérisés :

- **Les métallothionéines (MT)** sont des protéines largement distribuées dans le monde vivant. On les rencontre chez de nombreux Procaryotes et chez la plupart des Eucaryotes. Ces protéines sont caractérisées par leur richesse en cations métalliques (essentiellement Cu et/ou Zn) et par leur forte proportion de résidus cystéines (environ 30 %). Elles se distinguent aussi par leur faible masse moléculaire (6 à 8 kDa et 60 à 75 acides aminés) et par l'absence de résidus aromatiques. Bien que leurs séquences en acides aminés soient très variables d'un organisme à un autre, il semblerait que la structure tridimensionnelle soit bien conservée.

Selon les études actuellement disponibles, la plupart des MT présentent deux domaines globulaires distincts, dépourvus de structure secondaire et reliés entre eux par une courte séquence de transition ; chaque domaine est responsable de la fixation de plusieurs cations métalliques divalents ou monovalents. Le rôle précis des MT dans la réponse aux métaux lourds est encore débattu, mais de nombreuses observations ont montré qu'elles pourraient être impliquées dans certains mécanismes de tolérance, notamment vis-à-vis du cadmium et du cuivre.

Chez *Arabidopsis thaliana* par exemple, il a été démontré que la présence de cuivre stimule la biosynthèse de MT et que la variation écotypique de la tolérance à ce métal est corrélée au taux de transcription des gènes MT (Murphy et Taiz, 1995).

En fait, il est aujourd'hui bien établi que la surexpression de gènes MT, dans des organismes aussi variés que des cyanobactéries, des levures, des cellules de Mammifères ou des plantes (Misra et Genamu, 1989), peut s'accompagner d'une augmentation de la tolérance à certains métaux lourds (Cu, Zn et Cd). Des travaux d'ingénierie moléculaire, visant à modifier les capacités de chélation (affinité et spécificité) des MT, sont actuellement en

cours. Cependant, il faut souligner que la synthèse de MT ne constitue probablement pas une réponse spécifique ; en effet, ces protéines s'accumulent également en réponse à d'autres stress (chocs thermiques) ou sous l'effet de facteurs telles que des hormones et des cytokines. Ainsi, la présence universelle des métallothionéines dans le monde vivant (chez les organismes sensibles comme chez les résistants) et leur synthèse dans des situations variées, suggèrent que ces protéines seraient plutôt impliquées dans le contrôle général de l'homéostasie cellulaire et non dans les réponses spécifiques aux métaux lourds.

- **Les phytochélatines (PC)** représentent le deuxième groupe de chélateurs intracellulaires, uniquement rencontrés dans le règne végétal. De nature peptidique, ces molécules sont classées dans une petite famille apparentée aux MT, avec lesquelles elles partagent d'assez nettes similarités de structure et de fonction : elles sont très riches en Cys [formule générale (Glu-Cys) $_n$ -Gly (avec  $n = 2$  à  $11$ )] et leur synthèse est stimulée par la présence de métaux lourds (Cd, Cu, Zn, etc...). Une différence essentielle avec les autres MT réside dans l'origine biosynthétique des PC ; elles ne sont pas directement codées par le génome mais sont synthétisées par une phytochélatine synthase, à partir d'un tripeptide précurseur, le glutathion (Glu-Cys-Gly). Bien que les PCs soient clairement impliquées dans la liaison des métaux intracellulaires, l'activité PC synthétase semble constitutive chez la plupart des plantes.

En effet, les écotypes tolérants ne présentent pas de concentrations accrues en PC (De Knecht *et al.*, 1992) ; il est donc difficile d'attribuer la tolérance des phytoextracteurs naturels à la présence de phytochélatines. Néanmoins, Zhu *et al.* (1999) ont montré, à partir de clones transformés de *Brassica juncea*, que la surexpression des gènes intervenant dans la synthèse du glutathion conduit à une augmentation de la tolérance au cadmium via une augmentation du pool de phytochélatines.

- **Les acides organiques** représentent un autre groupe de chélateurs naturels. Sous cette dénomination sont classées des molécules diverses tels que des acides dicarboxyliques (acides fumarique, malique, oxalique) ou des acides tricarboxyliques (comme l'acide citrique). Toutes ces petites molécules sont clairement impliquées dans les phénomènes d'accumulation. On observe souvent une stimulation de leur synthèse en présence de métaux lourds, ce qui laisse penser qu'elles assurent le transport xylémien des ions métalliques depuis les racines vers les parties aériennes de la plante.

De plus, des observations récentes ont clairement montré qu'au moins dans certains cas, des acides organiques pourraient être directement impliqués dans les mécanismes de tolérance. Ainsi, les capacités d'hyperaccumulation et de résistance de certaines variétés de blé noir (*Fagopyrum esculentum*) vis-à-vis de l'aluminium sont directement dépendantes de la synthèse d'acide oxalique (Ma *et al.*, 1997). De même, une synthèse accrue de malate a été observée chez une population tolérante de *Festuca rubra* se développant sur des dépôts riches en Cu et Zn, par rapport à une population sensible provenant d'une prairie (Harrington *et al.*, 1996).

- **Les acides aminés** libres, comme la proline, l'histidine et la cystéine, s'accumulent lors d'un stress métallique et pourraient être eux aussi impliqués dans la chélation de divers métaux lourds, notamment du zinc et du nickel (Briat et Lebrun, 1999 ; Bert, 2000). C'est ainsi que l'accumulation et la tolérance au nickel dans le genre *Alyssum* semblent principalement dues à une synthèse accrue d'histidine (Krämer *et al.*, 1996).
- **La compartimentation** : Une des hypothèses les plus fréquentes pouvant expliquer le phénomène de tolérance serait attribuée à la compartimentation accrue des métaux lourds sous forme ionique dans la vacuole, grâce à plusieurs familles de transporteurs protéiques. Par exemple, un transporteur tonoplastique

appartenant à la famille des protéines GTP a été identifié chez un écotype de *Silene vulgaris* tolérant au zinc. Le transport de zinc sous forme ionique dans les vacuoles dépend de la présence de magnésium et de GTP et permet la détoxification du zinc plus rapidement que chez l'écotype sensible (Chardonens *et al.*, 1999).

Chez *Rauvolfia serpentina*, le cadmium forme, avec les phytochélatines, des complexes de faible masse moléculaire (Low Molecular Weight (LMW)), qui s'agrègent les uns aux autres par des ponts sulfures pour former des complexes de masse moléculaire élevée (High Molecular Weight (HMW)). Les HMW pourraient alors être transportés par un complexe protéique spécifique dans la vacuole. Le pH vacuolaire provoquerait alors la dissociation du complexe, et les ions seraient pris en charge par les acides organiques présents, tels que le malate, le citrate ou encore l'oxalate (Sanita di Toppi et Gabbrielli, 1999).

### 3.4. Autres systèmes de défense au stress métallique

D'autres mécanismes agissant contre les effets néfastes des métaux lourds peuvent être mis en œuvre chez les plantes :

**Les transporteurs membranaires**, de type pompe ATPasique, spécifiques du cadmium seraient présents chez *A. thaliana* et réaliseraient un efflux actif des ions métalliques à l'extérieur des cellules (Briat et Lebrun, 1999).

**L'accumulation des métaux dans les feuilles âgées**, juste avant leur abscission diminuerait ainsi les concentrations métalliques dans la plante. En général, la concentration dans les feuilles augmente avec l'âge. Chez *Armeria maritima* subsp. *halleri*, dans les feuilles marron (les plus âgées), les concentrations en Cu, Cd, Zn et Pb sont 3 à 8 fois celles des jeunes feuilles (Dahmani-Muller, 1999). Cette observation suggère un transport interne depuis des feuilles vertes, encore actives d'un point de vue photosynthétique, vers les

feuilles qui sont sur le point de tomber, préservant ainsi la photosynthèse tout en détoxiquant la plante. Une accumulation de Cd a été également observée dans les trichomes de plusieurs espèces (Salt *et al.*, 1995).

**Les protéines de choc thermique (Hsp)**, déjà réputées pour leur implication dans le stress lié à un choc thermique, seraient également responsables de la tolérance aux métaux toxiques.

En effet, des stress très variés, ayant en commun de dénaturer des protéines (stress protéotoxique), sont capables d'induire cette réponse de type « choc thermique ». L'induction des Hsp par le stress protéotoxique permet à la cellule de réparer les dommages protéiques ainsi occasionnés par resolubilisation des agrégats, renaturation des polypeptides ou, si cela est impossible, par l'engagement des protéines dénaturées vers les voies de dégradation.

Ainsi, les résultats obtenus sur des cellules de tomate ont établi que l'action d' $H_2O_2$  induisait la synthèse de protéines de choc thermique (Banzet *et al.*, 1998). De la même façon, dans les cellules de *Lycopersicon peruvianum* exposées à 1mM de cadmium, des quantités significatives d'Hsp70 ont été relevées au niveau du plasmalemme, de la membrane mitochondriale et du réticulum endoplasmique, sièges de multiples dégâts du stress oxydant provoqué par les métaux lourds (Neumann *et al.*, 1994).

**La biosynthèse d'éthylène** dans les racines et les feuilles est provoquée par certains métaux, comme le cadmium. L'éthylène serait alors un messenger stimulant la lignification capable de limiter les flux de métaux dans les systèmes vasculaires et accélérant la réponse anti-oxydante par induction de l'activité ascorbate peroxydase, ainsi que la synthèse de métallothionéines (Sanita di Toppi et Gabbrielli, 1999).

#### **4. Adaptation aux Métaux lourds**

Seuls certains taxons sont donc observés préférentiellement sur des sites riches en métaux lourds, laissant supposer qu'outre la grande plasticité phénotypique de certaines variétés opportunistes, des processus évolutifs sont impliqués dans cette adaptation aux environnements métallifères. Les bases génétiques de la tolérance ont été largement étudiées (Antonovics *et al.*, 1971 ; Baker, 1987 ; Macnair, 1990 ; Macnair, 1993), mais peu de certitudes existent et beaucoup de travaux supplémentaires sont encore nécessaires.

Il est généralement présumé que le phénomène d'adaptation est progressivement acquis selon le processus classique de l'évolution, en réponse à de nombreuses années de pression de sélection. Il en résulterait que seul un petit nombre d'espèces bien définies seraient capables de se développer sur des terrains contaminés. Pourtant, il est maintenant largement reconnu qu'un nombre important d'espèces végétales communes sont capables de coloniser rapidement des milieux nouvellement contaminés.

Cette observation sous tend l'hypothèse qu'un écotype (ou une population) adapté(e) peut émerger rapidement après quelques années, voire même en une seule génération (Wu *et al.*, 1975). Ce phénomène est classiquement présenté comme un modèle de microévolution (Macnair, 1993) ; il repose sur l'inductibilité de la tolérance, au sein des populations qui se développent habituellement sur des sites non contaminés et présentent une tolérance moyenne plus faible. Cependant, en plus du phénomène adaptatif, il apparaît maintenant que la tolérance peut être un caractère constitutif.

L'une des premières études a été menée sur une espèce des milieux humides, *Typha latifolia* (McNaughton *et al.*, 1974). En comparant deux clones, l'un issu d'un terrain contaminé par du zinc et l'autre issu d'un terrain non pollué, les auteurs ont montré que cette espèce présentait une forte tolérance au zinc, mais aussi au plomb et au cadmium, et ceci sans distinction entre les deux clones. Par la suite, cette observation a



été confirmée pour différentes espèces telles que *Phragmites australis* (Ye *et al.*, 1997b), *Glyceria fluitans* (Matthews *et al.*, 2004), *Carex rostrata* (Matthews *et al.*, 2005), *Andropogon virginicus* (Gibson et Risser, 1982), *Calamagrostis epigejos* (Lehmann et Rebel, 2004), *Calluna vulgaris* (Monni *et al.*, 2000) et *Arabidopsis halleri* (Bert *et al.*, 2000).

Parmi les végétaux tolérants, il est possible de caractériser trois grands types différents de stratégies vis-à-vis des contaminants métalliques, basées sur les rapports entre les teneurs en métaux lourds du sol et celles des organes aériens des plantes considérées (Baker, 1981). On définit alors :

- . **Les accumulateurs** pour lesquels les métaux sont concentrés, souvent préférentiellement dans les parties aériennes, quelle que soit la concentration métallique dans le sol.
- . **Les « excluders »** qui présentent une faible concentration foliaire, maintenue constante par régulation du transport depuis les racines tant que la concentration dans le sol reste relativement peu élevée. Dans le cas contraire, le mécanisme de régulation est dépassé et une accumulation importante a lieu entraînant la mort de l'individu.
- . **Les indicateurs** ne présentent aucun contrôle de la translocation. Par conséquent, les concentrations racinaires et foliaires sont en équilibre, et proportionnelles aux teneurs du sol. C'est le cas, par exemple, du pissenlit (*Taraxacum officinale*) qui accumule divers métaux lourds en fonction de la pollution environnementale (Kuleff et Djingova, 1984). Ces stratégies d'adaptation semblent entraîner souvent une contrepartie pour les plantes, que l'on appelle « le coût de la tolérance » (Antonovics *et al.*, 1971 ; Baker, 1987 ; Macnair, 1993).

Certains éléments métalliques sont essentiels aux organismes vivants à de faibles concentrations, mais, ils agissent à de fortes concentrations comme un facteur de stress qui entraîne une modification de la réaction physiologique. Le terme «**sensibilité**» décrit les effets du stress, qui peuvent aller jusqu'à la mort de la plante.

Par opposition, le terme « **résistance** » fait référence à la réaction de la plante qui lui permet de survivre face au stress métallique et d'assurer sa descendance (Levitt, 1980).

Deux stratégies principales sont impliquées dans ce phénomène de résistance :

**La stratégie d'évitement** par laquelle les plantes se protègent du stress métallique en limitant leur absorption ;

**La stratégie de tolérance** (terme qui sera utilisé dans la suite de ce travail comme étant synonyme de résistance) qui fait référence aux réactions permettant de limiter les effets néfastes des métaux dans l'organisme. Ces différents aspects sont abordés dans ce chapitre de façon à comprendre la physiologie de la plante vis-à-vis des métaux lourds. Pour terminer, nous développerons les stratégies d'utilisation des plantes dans une optique de phytoremédiation des sols contaminés.

### **5. Les Métaux Lourds dans la plante.**

Parmi l'ensemble des métaux lourds, une vingtaine d'entre eux sont indispensables aux processus physiologiques majeurs, en particulier la respiration, la photosynthèse ou l'assimilation des macronutriments (azote, soufre...) (Kabata-Pendias et Pendias, 2001). Nombre de ces métaux, Cu, Zn, Ni, Fe, Co, Se et Ba sont aussi impliqués au niveau de processus moléculaires tels que le contrôle de l'expression des gènes ; la biosynthèse des protéines, des acides nucléiques, des substances de croissance, de la chlorophylle et des métabolites secondaires ; le métabolisme lipidique ou la tolérance au stress (Rengel, 1999).

En outre, certains éléments trace peuvent se présenter sous différents états d'oxydation ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^+$ ). Ils jouent ainsi un rôle d'accepteurs ou de donneurs d'électrons, très important dans les multiples systèmes enzymatiques mettant en jeu des réactions d'oxydoréduction (Chaignon, 2001).

Pour autant, les métaux lourds n'ont pas tous une fonction connue à ce jour dans le métabolisme de la plante, et malgré la grande diversité des besoins et des niveaux de tolérance aux métaux lourds chez les plantes, certains restent considérés comme des poisons cellulaires pour lesquels les doses admissibles sont très faibles. On retrouve parmi les plus toxiques, Hg, Cr, Ni, Pb et Cd (Kabata-Pendias et Pendias, 2001).

### **- Absorption racinaire**

La voie principale d'absorption des métaux se fait par simple diffusion au travers de l'apoplaste du cortex racinaire et de l'endoderme (voie apoplastique). Le transport des éléments métalliques à travers la paroi cellulaire se fait passivement (non métabolique et donc dans le sens du gradient de concentration) par les pores du réseau de la cellulose, de l'hémicellulose et des glycoprotéines. Cependant, une partie des ions peut être adsorbés par les charges négatives de surface de l'acide polygalacturonique des pectines, qui agissent comme des échangeurs d'ions (Briat et Lebrun, 1999).

Puis au niveau de l'endoderme, le transport peut devenir actif au niveau de la membrane plasmique des cellules de la bande de Caspary (voie symplastique), autorisant cette fois un transfert contre le gradient de concentration. Cependant, les mécanismes exacts de l'absorption sont encore mal connus, en particulier pour certains éléments comme le Cu (Greger, 1999 ; Chaignon, 2001), et différent selon l'espèce métallique.

On considère de nos jours que le plomb et le nickel sont absorbés passivement via certaines protéines de type purine, alors que le zinc et le cuivre sont absorbés activement par une protéine de transport sélective, nécessitant de l'énergie (Kabata-Pendias et Pendias, 2001).

Par ailleurs, bien que le transport actif soit en principe spécifique, certains cations toxiques (Cs, Cd, Pb ou Cr) sont des compétiteurs potentiels vis-à-vis des cations essentiels. Par exemple, le cadmium semble être un compétiteur connu du calcium en empruntant les canaux calciques membranaires (Sanita di Toppi et Gabbrielli, 1999 ; Greger, 1999) Où 70% du Cd entrerait par ce biais dans la racine (Greger, 1999). Une partie des métaux apoplastiques peut donc rejoindre la voie symplastique puis le xylème par les plasmodesmes.

### **- Translocation**

Après leur absorption, le transport des éléments dans le xylème de la plante vers les parties aériennes, appelé « translocation », peut nécessiter ou non la prise en charge des éléments par des agents complexants, tels que les acides organiques, les acides aminés et divers peptides : le fer est pris en charge par le citrate ; le zinc peut être transporté par un complexe anionique (Alloway, 1995); la majorité du cuivre et une partie du nickel sont chélatées par un acide polyaminopolycarboxylique encore non identifié chez la tomate (Foy *et al.*, 1978) ; le cadmium est transporté sous forme libre (Greger, 1999).

Chez certaines espèces la translocation d'éléments toxiques est plus importante que chez d'autres, pouvant conduire à une accumulation des métaux dans les feuilles et les autres parties aériennes, sans que l'on sache avec rigueur si elle est due à un transport plus actif ou une absence d'immobilisation dans les racines (Foy *et al.*, 1978).

Le transport des éléments toxiques par le phloème est moins évident du fait que les cellules qui le constituent sont vivantes et forment un piège supplémentaire (Greger, 1999). Toutefois, chez certaines plantes, la nicotianamine, dérivée de la méthionine, pourrait être responsable du transport des métaux, Fe, Cu, Zn et Mn, dans la sève du phloème (Briat et Lebrun, 1999).

### - Accumulation

Certaines plantes accumulent des quantités inhabituelles d'éléments métalliques ; 100 mg/kg de matière sèche pour le Cd, 1000 mg/kg pour le Ni, le Cu, le Co ainsi que 10 000 mg/kg pour le Zn et le Mn. Ces espèces sont alors qualifiées de plante « hyperaccumulatrice » (*Alyssum bertolonii*, *Sebertia acuminata*, *Silene cobalticola*, *Thlaspi caerulescens*, *Brassica napus*, *Pteris vittata*) (Brooks, 1998). Ainsi, plus de 400 espèces hyperaccumulatrices sont recensées, dont plus de 300 pour le nickel et seulement une pour le cadmium. A part une possible résistance à la sécheresse et aux herbivores (Boyd, 1998), il est encore impossible d'attribuer ce phénomène à un avantage sélectif quelconque. Dans la cellule, les métaux ayant pénétré dans le cytoplasme sont pris en charge par diverses molécules afin de les stocker ou d'éviter tout dommage cellulaire.

## 6. Utilisation des plantes dans la réhabilitation des sols

Afin de pallier les principales limitations des méthodes actuellement disponibles dans les stratégies de dépollution, les recherches s'orientent depuis quelques années vers l'utilisation de plantes supérieures. On sait en effet depuis longtemps que la présence d'un couvert végétal induit ou stimule la biodégradation d'une grande variété de contaminants organiques (Reilley *et al.*, 1996)

Par ailleurs, certaines plantes, dites métallobytes, sont capables de se développer normalement sur des sites fortement contaminés par divers métaux et certains de ces végétaux, qualifiés d'hyperaccumulateurs (Brooks, 1998), sont capables de stocker massivement les métaux dans leurs parties aériennes. Ainsi, les études concernant l'écophysiologie et le métabolisme des plantes supérieures en milieu contaminé, ont progressivement permis d'insérer le concept de phytoremédiation à côté de celui de bio-remédiation des sites pollués.

Aujourd'hui, le terme de phytoremédiation est largement accepté et regroupe toutes les méthodes basées sur l'utilisation de végétaux supérieurs dans un but de dépollution. Malgré leur développement récent, ces méthodes sont variées et des résultats encourageants ont d'ores et déjà été obtenus pour des problématiques diverses. Plus précisément, les quelques études réalisées à ce jour permettent d'envisager cinq types de stratégies de phytoremédiation particulièrement prometteuses :

**La phytoextraction** est basée sur l'utilisation de végétaux hyperaccumulateurs, qui absorbent les métaux du sol et les accumulent dans des organes aériens faciles à récolter (Mc Grath, 1998). Cette méthode, qui se révèle efficace pour une grande variété de métaux lourds (Pb, Cd, Ni, Zn, ...), est aujourd'hui proposée par de nombreuses sociétés américaines.

**La phytostimulation** exploite l'effet stimulant de la rhizosphère sur la dégradation microbiologique des composés organiques. Cette démarche est notamment utilisée depuis plusieurs années par l'armée américaine dans le cadre de la dépollution de sites contaminés par des explosifs (TNT) ou par des herbicides.

**La phytovolatilisation** permet la transformation en produits volatiles puis le relargage dans l'atmosphère d'éléments tels que le mercure ou le sélénium. Cette approche, encore au stade expérimental, fait actuellement l'objet de recherches très actives ; les

résultats récents (Bizily *et al.*, 1999) dans ce domaine sont particulièrement encourageants.

**La rhizofiltration** utilise les capacités élevées du système racinaire de certains végétaux pour fixer les polluants d'un milieu liquide. Cette méthode a notamment été testée en Ukraine dans le cadre de la dépollution du site de Tchernobyl.

**La phytostabilisation** n'est pas une méthode de dépollution *sensu stricto*, mais elle permet de diminuer la mobilité des contaminants en limitant l'érosion et le lessivage du sol. Cette approche vise ainsi à limiter les risques de transfert de la pollution en dehors du sol contaminé et permet en même temps une meilleure intégration paysagère pour des sites présentant d'importants volumes impossibles à stocker en décharge.

Ces quelques exemples, loin d'être exhaustifs, montrent que le recours aux végétaux supérieurs dans les stratégies de dépollution est considéré avec un intérêt croissant. Cette tendance est particulièrement marquée sur le continent Nord-Américain où une vingtaine de brevets a été déposée au cours de ces 7 dernières années. Certains d'entre eux protègent une méthodologie spécifique et bénéficient d'une couverture internationale (Raskin *et al.*, 1994 ; Chaney *et al.*, 1998), alors que les autres ont trait à des mises au point techniques ou à l'utilisation d'espèces végétales. Cependant, à l'heure actuelle, le principal obstacle au développement de la phytoremédiation réside dans le faible nombre d'espèces potentiellement utilisables à l'échelle industrielle. En effet la plupart des métalphytes connues sont caractérisées par un enracinement peu profond, une croissance assez lente et une faible production de biomasse, autant de critères qui limitent considérablement les taux prévisibles d'extraction. Par ailleurs, un rendement optimal nécessite que les conditions de culture (climatiques et édaphiques) sur les sites pollués correspondent aux exigences naturelles des végétaux utilisés ; ce paramètre est par essence très difficile à contrôler et représente une limitation supplémentaire de la méthode. Par conséquent, il est nécessaire de poursuivre les recherches afin de sélectionner de nouvelles plantes tolérantes et/ou accumulatrices et de mieux comprendre leur comportement sur site pollué.

### ▪ Cas de la Tomate

La tomate (*Lycopersicon esculentum*) est originaire de l'Amérique du sud (Bolivie, Mexique et Pérou). Les mexicains l'appelaient « tomati » appellation dérivé d'un mot aztèque « zitomati » (laummonier, 1979). Au 18<sup>ème</sup> siècle, la tomate a été introduite en Espagne et en Italie et de là dans les autres pays du bassin méditerranéen et d'Europe où on la pour longtemps considérée comme une plante ornementale on la croyait aussi toxique comme d'autres plantes (belladone, morelle) de la famille des Solanacées. Ce n'est qu'au 19<sup>ème</sup> siècle que la tomate a commencée à être consommée. Depuis cette époque, elle a connu un développement considérable et cela dans tous les pays du monde (Bourgeois, 1999).

La tomate cultivée « *Lycopersicon esculentum*, Mill » appartient à la famille des Solanacées, espèce diploïde avec  $2n = 24$  chromosomes, chez laquelle il existe de nombreux mutants mono géniques dont certains très importants pour la sélection (Gallais et Bannerot, 1992).

Il semble y avoir peu de renseignement au sujet de la sensibilité de la tomate et sa réponse physiologique au stress oxydatif induit par le cadmium bien qu'elle est classée en seconde rangée parmi les végétaux les plus importants dans le domaine de plantation (Jing Dong et al, 2006).

Plusieurs études ont été réalisées sur la tomate afin de mettre en évidence l'effet des métaux lourds sur différents paramètres physiologiques (croissance, respiration, .....), biochimiques (protéines, chlorophylle, activités enzymatiques, ...) et agronomiques d'une part et de son effet accumulateur capable d'absorber les métaux du sol et de le concentrer dans des parties qui seront récoltées d'autre part.



## **B. Le Cadmium**

### **1. Propriétés fondamentales**

Le cadmium a une grande résistance à la corrosion ; son point de fusion est bas ; il a une bonne conductivité de l'électricité ; ses produits dérivés ont une bonne résistance aux fortes températures ; il présente des caractéristiques chimiques proches de celles du calcium, en particulier le rayon ionique, facilitant ainsi sa pénétration dans les organismes (Borchardt, 1985).

Le cadmium est un élément rencontré en milieu aquatique sous diverses formes physiques (dissoute, colloïdale, particulaire) et chimiques (minérale ou organique). Un ensemble de variables physicochimiques du milieu (salinité, pH, potentiel redox, caractéristiques sédimentologiques, nature géochimique des particules, concentration en chlorures) gouvernent les transformations du cadmium dans l'environnement (Gonzalez *et al.*, 1999; Chiffolleau *et al.*, 2001

### **2. Utilisation**

Le cadmium est naturellement présent à l'état de traces dans les roches superficielles de l'écorce terrestre, ce qui en fait un élément plus rare que le mercure et le zinc. Il y a deux origines principales de présence de cadmium:

Le cadmium primaire est principalement associé au zinc dans les minerais de zinc (blende) (0,01 à 0,05%) et donc sous-produit de la métallurgie du zinc qui donne en moyenne 3 kg de cadmium par tonne de zinc. Le cadmium est également présent dans des minerais de plomb et de cuivre ainsi que dans des phosphates naturels (Jordanie, Tunisie). Les usages de cadmium se situent principalement en électricité (accumulateurs), en électronique, en métallurgie (traitement des surfaces par cadmiage) et dans l'industrie des matières plastiques (stabilisateur de polymères) (Ramade, 1992).

Le cadmium secondaire est produit par recyclage (accumulateurs Ni/Cd, alliages Cu/Cd, poussières d'aciéries, incinération d'ordures ménagères) représentant des causes de pollution de l'environnement. A l'image du mercure, les combustions des dérivés fossiles du carbone introduisent également ce métal dans l'atmosphère (combustion produits pétroliers et charbon). Aussi, le transport de ce polluant peut couvrir de grandes distances.

### **3. Cycle et source naturelle anthropique**

Le cadmium rejeté dans l'atmosphère provient de sources naturelles et anthropiques. Le cadmium présent dans la croûte terrestre peut être dispersé dans l'air par entraînement de particules provenant du sol et par les éruptions volcaniques. Cependant, les activités industrielles telles que le raffinage des métaux non ferreux, la combustion du charbon et des produits pétroliers, les incinérateurs d'ordures ménagères et la métallurgie de l'acier constituent les principales sources de rejet atmosphérique. Dans l'eau, le cadmium provient de l'érosion naturelle, du lessivage des sols (engrais phosphatés) ainsi que des décharges industrielles et du traitement des effluents industriels et des mines.

### **4. Propriété biologique et toxicité**

Contrairement à de nombreux métaux, le cadmium n'a aucun rôle métabolique connu et ne semble pas biologiquement essentiel ou bénéfique au métabolisme des êtres vivants. Il remplace parfois le Zn dans des systèmes enzymatiques carencés en Zn chez le plancton (Price et Morel, 1990; Lane et Morel, 2000).

Le cadmium présente des risques chez le consommateur. Même à de faibles concentrations, il tend à s'accumuler dans le cortex rénal sur de très longues périodes (50 ans) où il entraîne une perte anormale de protéines par les urines (protéinurie) et provoque des dysfonctionnements urinaires chez les personnes âgées. Chez l'homme, le phénomène de toxicité aiguë est connu depuis 1950 sous le nom de syndrome d'Itai-

Itai défini par l'association d'une insuffisance rénale avec ostéoporose (déminéralisation et fragilisation des os) et ostéomalacie (déminéralisation et déformation des os). Son nom provient des cris poussés par les malades, riziculteurs âgés de 40 à 60 ans, du bassin de la rivière Jintsu au Japon, intoxiqués par l'eau de boisson et la consommation de riz contaminés par les rejets d'une usine de métaux non ferreux.

Le Cd n'est pas un nutriment pour les plantes, il est toxique et peut être accumulé dans différents tissus et organes (Thévenod et *al*, 1999) et préférentiellement au niveau des racines des plantes supérieures (Kovacevic et *al*, 1999 ; Vitoria et *al.*, 2001), et dont les concentrations diminuent dans l'ordre suivant : racines vieilles > racines nouvelles > tiges > feuilles > organes reproducteurs ( Leita et *al*, 1991). Il a été montré que le Cd interfère avec la biosynthèse de la chlorophylle et peut inhiber les enzymes du cycle de Calvin (Van Assch et Clijters , 1990). En plus, il inhibe les activités des autres enzymes impliqués dans le métabolisme du nitrogène (Boussama et *al*, 1999a ; Boussama et *al*, 1999b ; Kumar et Dubey, 1999), la glycolyse , la voie des pentose (Chugh et Sawhney , 1999) et l'assimilation du sulfate (Lee et Leustek, 1999). Un groupe de peptides qui est relié au glutathion et phytochelatine (Leopold et *al*, 1999) peut lier le Cd à d'autres métaux lourds (Grill et *al*, 1987 ; Freiderich et *al* , 1998 ; DiToppi et *al* ,1999). Il a été souvent montré que le Cd peut induire des stress thermiques et oxydatives (Kavita Shah et *al* , 2001).

Chez les plantes le Cd peut causer la production des espèces réactives à l'oxygène (ROS) (Ferreira et *al* , 2002), il provoque aussi une baisse de la respiration mitochondriale (Penada-Saraiva , 1975).

Le JECFA (Joint Expert Committee for Food Additives) comité mixte FAO/OMS, a recommandé chez l'homme une dose hebdomadaire tolérable (DHT) de 7 µg de cadmium par kilogramme de poids corporel et par semaine. Il faut noter que, outre la boisson et la nourriture, le tabagisme est une source importante de cadmium notée dans toutes les études épidémiologiques. De la même façon que pour le mercure, le

règlement (CE) n° 466/2001 fixe les quantités maximales de cadmium dans les denrées alimentaires (1mg.kg-1 poids humide).

## **5. Bioaccumulation du Cadmium**

Dans les premiers temps de la cinétique de bioaccumulation, la pénétration du cadmium dans les cellules est linéaire en fonction du temps et directement proportionnelle à sa concentration dans l'eau (George *et al.*, 1978; Kohler et Riisgard, 1982; Poulsen *et al.*, 1982; Chong et Wang, 2001). Elle n'est pas affectée par la température. Borchardt (1983 et 1985), en marquant les algues avec du Cd109 et l'eau avec du Cd115 met en évidence la prépondérance de la voie dissoute par rapport à la voie particulaire et montre que seulement 1% de la quantité de Cd dans la chair de moules a pour origine la voie particulaire. La principale entrée se fait donc par l'eau à travers les surfaces externes, principalement par les branchies qui représentent une surface considérable (Carpene et George, 1981; Borchardt, 1983; Borchardt, 1985; Riisgard *et al.*, 1987). En parallèle, il montre que l'absorption de Cd en solution est en corrélation linéaire avec la quantité de nourriture ingérée.

Les branchies sont donc l'organe d'entrée principal. La biodisponibilité des espèces de cadmium dissous dépend des mécanismes de capture. La diffusion passive ou facilitée *via* les canaux à Ca<sup>2+</sup> à travers la bicouche lipidique semble être le processus de capture le plus fréquent (Simkiss et Taylor, 1995). Les formes ionisées avec des chlorures et des hydroxydes doivent être considérées principalement.

Enfin, il est à noter qu'aucune donnée convaincante ne permet de constater une biomagnification du cadmium dans les réseaux trophiques. Au contraire, il semble qu'une diminution des concentrations avec l'augmentation du niveau trophique soit la situation la plus couramment observée (Amiard-Triquet *et al.*, 1982; Amiard-Triquet *et al.*, 1993).

## **6. Réglementation**

Du fait de la gravité des effets des métaux sur la santé et des contaminations dans l'environnement, des réglementations ont été adoptées, à tous niveaux, visant à limiter les émissions ou réduire les usages des valeurs sanitaires et environnementales utilisées pour la population générale et concentration sans effet prévisible pour l'environnement (PNEC: Previsible Non Effect Concentration).

Pour les PNEC Inéris, la date de la dernière mise à jour de la fiche est pour le Hg (2003), le Cd (2004), le Pb (2003), le Zn (2003) et le Cu (2004). Ces fiches suivent les évaluations des risques en cours et pour certaines les propositions doivent être revisitées.

### **C. Le stress oxydant :**

#### **1. Définition**

Pour définir le stress oxydant, il faut avant tout définir ce que sont les radicaux libres. Un radical libre est une espèce chimique contenant un électron célibataire non apparié au niveau de son orbitale électronique périphérique, cet état confère à la molécule une grande instabilité et une réactivité vis-à-vis d'autres molécules. Ce déséquilibre n'est que transitoire et est comblé soit par l'acceptation d'un autre électron soit par le transfert de l'électron libre sur une autre molécule. La probabilité entre ces deux possibilités dépend essentiellement de l'instabilité du radical libre (Kohen R. et Nyska A., 2002 ; Klein J.A. et Ackerman S.L., 2003). Les Radicaux Oxygénés Libres (ROL) sont nommés également « Dérivés Réactifs de l'Oxygène » (DRO) ou, pour les anglo-saxons « Reactive Oxygen Species » (ROS), « Reactive Oxygen Intermediates » (ROI) ou encore « Reactive Oxygen Métabolites » (ROM) (Aurousseau B., 2002).

Le stress oxydant cellulaire est classiquement défini comme étant l'altération de la balance redox intracellulaire en faveur des conditions oxydantes. Les agents et stimuli endogènes ou exogènes à l'organisme induisant la production de substances pro-oxydantes hautement cytotoxiques sont nombreux, citons par exemple : le métabolisme cellulaire (respiration oxydative mitochondriale, dégradation de composés étrangers par le système du cytochrome P450) ; l'action d'enzymes (xanthine oxydase, lipoxygénases (LO), cyclooxygénases (COX), NADPH oxydase, etc.), de cytokines et de mitogènes ; la réponse immunitaire ; l'exposition excessive à des facteurs environnementaux (xénobiotiques, sels métalliques, irradiation ionisante, pathogènes, etc.).

La production de substances oxydantes est un phénomène normal ! Elles possèdent de nombreuses propriétés bénéfiques incluant l'émission de signaux de prolifération, la régulation de nombreuses activités enzymatiques, etc. *A contrario*, l'émergence d'un stress oxydant perturbe l'équilibre redox intracellulaire.

L'accumulation excessive des substances pro-oxydantes représente une attaque potentiellement toxique. Elles exercent des effets délétères incluant la peroxydation des lipides et l'oxydation des protéines qui induisent des dysfonctionnements membranaires, l'oxydation de l'ADN et des autres composants cellulaires. Ces phénomènes induisent à leur tour la production de substances toxiques secondaires contribuant à l'aggravation des effets précités. Enfin, l'exposition aux agents du stress oxydant induit potentiellement de nombreuses atteintes tissulaires aiguës ou chroniques, des pathologies inflammatoires, la carcinogenèse et le vieillissement.

La cellule possède au moins trois niveaux de défense contre les espèces réactives de l'oxygène :

\* La première ligne de défense antioxydante est assurée par des systèmes de piègeurs non-enzymatiques très réactifs. Les trois systèmes redox les plus importants trouvés communément dans les cellules sont le nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH/NADP<sup>+</sup>), la thioredoxine (TRX<sub>red</sub>/TRX<sub>ox</sub>), et enfin le GSH qui est le thiol cellulaire prédominant dont les changements de concentrations [GSH]/[GSSG] reflètent directement les altérations redox intracellulaires.

\* La seconde ligne de défense agit en synergie avec les agents antioxydants non enzymatiques. Elle est constituée d'enzymes de détoxification telles la superoxyde dismutase (SOD) et la catalase qui limitent la propagation des espèces réactives de l'oxygène et, par conséquent, les dommages provoqués par leurs interactions avec les macromolécules cellulaires. Cependant, pour pallier à leur spécificité de substrats limitée, l'action de ces enzymes est secondée par l'activité de certaines isoformes des glutathion peroxydases (GPX) et glutathion S-transférases (GST) capables de réduire les peroxydes en composés moins toxiques,

\* Une troisième ligne de défense doit être signalée mais ne sera pas discutée ici. Les produits finaux des enzymes de détoxification peuvent être conjugués au GSH et évacués par des transporteurs membranaires appelés protéines de multi-résistance aux drogues.

## **2. La réponse adaptative au stress oxydant**

La capacité de résister au stress oxydant est essentielle pour la survie de l'organisme. De nombreux mécanismes protègent les cellules contre les éléments étrangers et les espèces réactives de l'oxygène.

L'accumulation intracellulaire des substances pro-oxydantes toxiques est empêchée par l'action de composés antioxydants mais aussi par l'action de systèmes enzymatiques antioxydants.

Un certain nombre de gènes codant pour des protéines impliquées dans ces processus peuvent être induits par les composés contre lesquels ils fournissent une protection, permettant ainsi aux cellules de survivre à l'exposition aux xénobiotiques et aux oxydants. Un des mécanismes d'adaptation de la transcription au stress oxydant implique les régions génétiques régulatrices nommées «Antioxidant Response Elements » (ARE) ou, alternativement, « Electrophile Response Elements » (EpRE).

- **Les espèces Réactive à l'Oxygène ROS**

Parmi toutes les espèces radicalaires susceptibles de se former dans les cellules, il convient de distinguer un ensemble restreint de composés radicalaires qui jouent un rôle particulier en physiologie et que nous appellerons radicaux primaires. Les autres radicaux libres, dits radicaux secondaires, se forment par réaction de ces radicaux primaires sur les composés biochimiques de la cellule, ces radicaux primaires dérivent de l'oxygène par des réductions à un électron tels l'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ) et le radical hydroxyle ( $^{\cdot}OH$ ), ou l'azote tel le monoxyde d'azote ( $NO^{\cdot}$ ) (Favier A., 2003). D'autres espèces dérivés de l'oxygène dites espèces actives de l'oxygène comme l'oxygène singulet ( $^1O_2$ ), le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) ou le nitroperoxyde ( $ONOOH$ ) ne sont pas des radicaux libres mais sont aussi réactives et peuvent être des précurseurs de radicaux.

- **Source et formation des dérivés ROS**

L'environnement dont lequel nous vivons mais aussi notre mode de vie sont à l'origine d'une augmentation de la production des ROS dans notre organisme (Castronovo V., 2003).



Les médicaments par exemple, substances étrangères, sont capable d'induire un état du stress oxydatif sévère. Aux niveaux hépatiques, les médicaments sont soumis aux réactions de détoxification qui diminuent rapidement leurs réactivités. Deux types de réactions biochimiques sont utilisés :

La première phase de la détoxification est assurée par les enzymes de la famille des cytochromes oxydases P450 et implique notamment des réactions d'oxydation, la deuxième phase consiste à la conjugaison des substrats oxydés avec des molécules comme l'acide gluconique ou les groupements sulfates (Castronovo V., 2003).

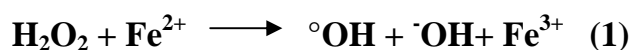
D'autres sources exogènes peuvent induire un stress oxydant tel que : Les rayonnements électromagnétiques, certains métaux de transition, les fumées de combustions (de cigarette, de bois, de matériaux de construction), les produits chimiques (antiseptiques, médicaments, pesticides, produits toxique tel le CCL4 et les solvants, les poussières d'amiante et de silice) sont autant des facteurs qui contribuent à la genèse des radicaux libres. Signalons également qu'un stress intellectuel ou thermique, agents infectieux ainsi qu'un exercice physique intense mal géré peut générer un stress oxydant (Castronovo V., 2003 ; Favier A., 2003).

Il existe également des sources endogènes, au niveau cellulaire, potentielles des radicaux libres que ce soit au niveau des mitochondries, des membranes, du réticulum endoplasmique ou tout simplement du cytosol. De manière générale, toute réaction biochimique faisant intervenir de l'oxygène moléculaire est susceptible d'être à l'origine d'une production des radicaux libres oxygénés. Les sources cellulaires des ROS sont enzymatiques et non enzymatique (Thannickal V.J. et Fanburg B., 2000 ; Servais S., 2004;).

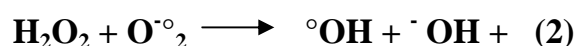
▪ **Les métaux lourds induisent l'accumulation de ROS**

Le rôle des métaux lourds dans la formation des ROS est lié à leur capacité à exister sous différents états d'oxydation.

En effet, les cations d'éléments comme Fe, Cu, Cr ou Mn sont capables de céder un ou plusieurs électrons susceptibles de réduire l'oxygène et ses dérivés. La plus connue de ces réactions est la réaction de Fenton (1) qui se produit en présence de fer ferreux et qui conduit à la réduction du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en radical hydroxyl (°OH) et en anion hydroxyl (·OH) :



Les radicaux libres sont des espèces chimiques qui possèdent un électron célibataire qui, parce qu'il n'est pas apparié à un autre électron de spin opposé, confère à la molécule une très forte réactivité. Le radical hydroxyle °OH, produit au cours de cette réaction, est un puissant agent oxydant. D'autres réactions de ce type faisant intervenir des métaux réduits ont également été décrites, telle que la réaction d'Haber-Weiss (2) au cours de laquelle le peroxyde d'hydrogène réagit avec un radical superoxyde, comme l'anion superoxyde O<sup>•-</sup><sub>2</sub>, aboutissant, là encore, à la production du radical hydroxyle.



Par ailleurs, même des métaux qui n'existent que sous un seul état d'oxydation, tels que le cadmium et le nickel par exemple, peuvent induire une accumulation de ROS pour trois raisons : une perturbation de certaines voies métaboliques, une inactivation et un « down régulation » des enzymes du système anti-oxydant ou un épuisement du stock de molécules de faible masse moléculaire comme l'ascorbate, le glutathion, la vitamine E ou les caroténoïdes, qui présentent des capacités anti-oxydantes (Sanita di Toppi et Gabbrielli, 1999).

▪ **Implication des mitochondries dans le stress oxydatif des ROS**

En addition à la synthèse d'ATP, la chaîne respiratoire mitochondriale est une source puissante des ROS et de ce fait elle est impliquée dans la genèse de la plupart des pathologies humaines et animales. Il est estimé que dans les conditions normales 1-4% de l'oxygène consommé est incomplètement réduit en superoxyde.

Dans la mitochondrie, il existe neuf sites responsables de cette production qui sont ubiquitaires dans les mitochondries des mammifères, mais l'expression et la capacité de production diffèrent selon les tissus. Bien que ces sites aient été montrés comme producteurs de ROS en quantité appréciable, l'évolution des concepts a permis de confirmer l'importance des complexes I et II dans la production de ROS (Morin D., et *al.*, 2004 ; Andreyev A.Y. et *al.*, 2005).

**3. Les Biomarqueurs**

Les biomarqueurs sont des variations biochimiques, physiologiques, histologiques ou morphologiques, mesurées chez des organismes exposés à des conditions de stress liées à la présence de substances chimiques dans l'environnement (Huggett et *al.*, 1992). Ils présentent la réponse biologique initiale des organismes face à des perturbations ou des contaminations du milieu dans lequel ils vivent. En conséquence ils sont en général plus sensibles que les paramètres mesurés à un niveau supérieur d'organisation biologique tel que l'organe, l'individu ou la population (Stegman et *al.*, 1992)

Parmi les mécanismes de défense qui contribuent à la détoxification des espèces réactives, il est possible de distinguer des systèmes enzymatiques et non enzymatiques.

- **Les Biomarqueurs Enzymatiques**

- **La superfamille des glutathion peroxydases**

Les GPX catalysent la réduction du peroxyde d'hydrogène et des hydroperoxydes organiques en eau et en alcool, respectivement, aux dépens de l'oxydation du GSH réduit, c'est-à-dire avec production concomitante de GSSG.

Plusieurs familles d'enzymes possèdent une activité GPX. Leur classification élémentaire repose sur leur dépendance vis-à-vis du sélénium, aussi l'on distingue les GPX dont l'activité peroxydase est dépendante ou non du sélénium (Hayes et McLellan, 1999 ).

- **Les glutathion peroxydases dépendantes du sélénium**

Les GPX dépendantes du sélénium constituent une sous-famille de peroxydases. L'enzyme prototype de la famille multigénique des GPX est GPX1. Trois autres peroxydases apparentées ont été identifiées et baptisées GPX2 ; des protéines non-apparentées possédant une activité peroxydase ont également été identifiées.

- **Les glutathion peroxydases indépendantes du sélénium**

GPX5 présente 50% d'identités de séquence avec GPX1 mais son activité GPX est indépendante du sélénium. GPX5 est une isoforme sécrétée trouvée dans les fluides épидидymaux présentant une faible réactivité pour H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et les hydroperoxydes organiques. Il semble que sa fonction biologique soit liée à la protection des spermatozoïdes contre les dommages du stress oxydant.

➤ **La superfamille des glutathion S-transférases**

Les Glutathion S-Transférases (GST) forment une superfamille d'enzymes multifonctionnelles pour la plupart cytosoliques, que l'on trouve dans la plupart des organismes animaux comme végétaux (Pascal et Scalla, 1999). Les GST existent sous forme d'homo- ou hétérodimères avec une masse moléculaire aux alentours de 25KDa. Elles peuvent être classées en plusieurs familles, à savoir alpha, mu, pi, sigma et thêta, cette dernière famille comprenant les GST végétales, mais aussi bactériennes et d'insectes (Marrs, 1996).

Les GST catalysent la réaction de conjugaison (attaque nucléophile) du tripeptide glutathion (GSH) sur des substrats électrophiles endogènes ou exogènes (Pascal et Scalla, 1999 ; Plaisance et Gronwald, 1999 ; Reade et *al.*, 1999). Les conjugués GSH-substrat résultants sont plus polaires et moins toxiques que les composés d'origine. Ils sont transloqués dans les vacuoles cellulaires des plantes par des pompes ATP-dépendantes, et accessibles pour les étapes métaboliques ultérieures (Marrs, 1996).

De nombreuses GST possèdent également une activité peroxydase indépendante du sélénium contribuant à la réduction d'hydroperoxydes organiques (hydroperoxydes d'acides gras, de phospholipides et d'ADN générés par la peroxydation des lipides et lors des dommages d'oxydation de l'ADN, respectivement) dans leurs alcools correspondants. Elles protègent les membranes : la détoxification des hydroperoxydes de lipides peut être réalisée *in situ* par les GST microsomales alors que leur détoxification par les GST cytosoliques requiert la libération préalable des hydroperoxydes d'acides gras de la membrane par la phospholipase A2. Les GST complètent l'action des GPX dans la seconde ligne de défense enzymatique antioxydant.

➤ **La Catalase (CAT) :**

La catalase (CAT) est une enzyme cytosolique inductible dont la fonction est de protéger les systèmes biologiques contre les espèces réactives de l'oxygène (Roméo et *al.*, 2000). Il s'agit d'une hémoprotéine tétramérique qui, avec un atome de fer par sous unité, a une masse d'environ 240KDa. Ces enzymes agissent en synergie avec les SODs puisque leur rôle est de catalyser la réduction du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire selon la réaction suivante :  $2\text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$

Très ubiquitaire, sa localisation peroxysomale fait de la catalase une enzyme antioxydante complémentaire de la SeGPX contre la peroxydation induite par le peroxyde d'hydrogène (Cossu et al., 1997).

➤ **Les superoxyde-dismutases, (SODs)**

Ils sont responsables de la dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), selon la réaction suivante:  $2\text{O}^{\circ}_2 + 2\text{H}^+ \longrightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$ . Ces enzymes existent sous différentes isoformes, dont la structure d'ensemble est très bien conservée au cours de l'évolution : le repliement tridimensionnel forme un puits hydrophobe au centre de la protéine, dans lequel se glisse l'anion superoxyde. Le mécanisme réactionnel est catalysé par un métal divalent situé au cœur de l'enzyme. Selon la nature de ce métal on distingue les superoxyde-dismutases à manganèse (Mn-SOD) localisées dans les mitochondries, les superoxyde-dismutases à cuivre-zinc (Cu/Zn-SOD), cytosoliques et enfin, les superoxydedismutases à fer ferreux (Fe-SOD), localisées dans le chloroplaste.

➤ **Les peroxydases (POX)**

Ils permettent, comme les catalases, la réduction de  $H_2O_2$  en eau et en oxygène moléculaire. Cependant, à la différence des catalases, les POX nécessitent la présence d'un substrat particulier pour réaliser leurs activités.

Deux types principaux de « molécules antioxydantes » sont utilisés comme substrat par les peroxydases : l'acide ascorbique (ASC) et le glutathion (GSH). Ces deux molécules participent au cycle « ascorbate/glutathion » (Noctor et Foyer, 1998 ; Foyer et Noctor, 2000), dont la première étape consiste en une réduction du peroxyde d'hydrogène en  $H_2O$ , couplée à une oxydation de l'ascorbate en monodéhydroascorbate (MDHA) ; cette étape est catalysée par l'ascorbate peroxydase (APX). Pour permettre la poursuite de cette réaction, l'ascorbate oxydé doit être à nouveau réduit. Pour cela, deux voies (directe et indirecte) de régénération de l'ascorbate coexistent :

La réduction directe du MDHA par la monodéhydroascorbate réductase (MDHAR) via l'oxydation d'une molécule de NAD(P)H. Cependant, le MDHA est une molécule relativement instable qui a tendance à se dismuter spontanément en déhydroascorbate (DHA) et ascorbate.

La seconde voie de régénération de l'ascorbate consiste donc en une réduction du DHA par la déhydroascorbate réductase (DHAR), couplée à une oxydation du GSH. Enfin, le glutathion oxydé, produit au cours de cette dernière réaction, est régénéré en GSH grâce la glutathion réductase (GR).

▪ **Les Biomarqueurs non Enzymatiques**

Pour ce qui est des mécanismes non-enzymatique, la recherche de biomarqueurs s'est orientée vers de nombreux composés intervenant habituellement en tant que ligand intracellulaire des métaux ou participant à l'exclusion et la détoxification de ceux-ci (groupements thiols, et en particulier glutathion réduit (GSH) et phytochélatines). En effet, le GSH et les autres thiols protègent contre les oxyradicaux et les métaux pro-oxydants (Cu, Fe) (Rijstenbil et *al.*, 1994).

➤ **Le Glutathion**

Le glutathion (L- $\gamma$ -glutamyl-L-cystéinyl-glycine) est un (voire « le ») composant vital de la protection antioxydante cellulaire. C'est un tripeptide ubiquitaire retrouvé chez les mammifères, la plupart des plantes et les microorganismes. Dans les conditions physiologiques, le glutathion réduit (GSH), résistant à l'oxydation spontanée, est maintenu en équilibre dans le cytosol avec sa forme oxydée disulfure (GSSG). Sa concentration cytosolique, de l'ordre du millimolaire, en fait le thiol non-protéique prédominant. De plus, la liaison carbone-azote entre les résidus glutamate et cystéine N-terminaux lui confère une grande stabilité.

La forme biologiquement active du glutathion est sa forme réduite qui contient le résidu cystéine porteur d'un thiol hautement réactif et résistant à l'oxydation spontanée. Le GSH réduit exerce de nombreuses fonctions protectrices vitales, notamment dans la défense antioxydante. De façon générale, le GSH maintient l'équilibre redox intracellulaire et les antioxydants non-enzymatiques (thiols et vitamines) sous leur forme biologiquement active réduite, régule l'expression et/ou l'activation de facteurs de transcription sensibles à l'oxydation et nécessaires au fonctionnement de la réponse antioxydante, exerce un effet



cytoprotecteur en neutralisant les métabolites du stress oxydant à l'aide de ses propriétés réductrices et en servant de co-enzyme aux GST et GPX, sert de forme de stockage et de transport permettant l'approvisionnement cellulaire en L-cystéine, un acide aminé essentiel, sert de cofacteur à plusieurs enzymes (glyoxylases, formaldéhyde déshydrogénase, etc.). Enfin, le GSH module des processus neuro-immunoendocrines, la synthèse de l'ADN, le métabolisme des micro-tubules, la prolifération cellulaire et la réduction des leucotriènes, etc. (Meister, 1988; Meister, 1989).

Le GSH joue également un rôle antioxydant en synergie avec des enzymes. La superfamille des GPX est constituée de nombreuses molécules à activité peroxydase impliquée dans la réduction/détoxication d' $H_2O_2$  et/ou d'hydroperoxydes organiques aux dépens du GSH réduit dans la réponse cellulaire au stress oxydant. Leur fonction biologique est complétée par l'action des GST qui, grâce à la réponse cellulaire antioxydant adaptative régule la réaction en chaîne stress oxydant-inflammation.

Le GSH est synthétisé par la  $\gamma$ -GCS et la GS. Il est consommé soit par une GPX cytosolique, soit par les GST et GPX pour réduire le peroxyde d'hydrogène ou les peroxydes organiques générés par le métabolisme aérobie, respectivement. Pour maintenir l'équilibre redox cellulaire, le GSSG est réduit en GSH par la GSSG réductase aux dépens du NADPH, formant ainsi un cycle redox. Dans des conditions sévères de stress oxydant, la capacité de la cellule à réduire le GSSG en GSH peut être dépassée induisant alors son accumulation dans le cytosol. Pour maintenir l'équilibre redox cellulaire, le GSSG est activement exporté ou conjugué à un thiol protéique (PSH) pour former un conjugué mixte disulfure (PSSG).

En résumé le GSH et les enzymes dépendantes du GSH (GST et GPX) constituent un mécanisme de détoxification critique impliqué dans au moins deux de ces niveaux de défense contre le stress oxydant (Hayes *et* McLellan, 1999).

### ➤ **Le Glutathion réductase (GR) :**

Le GR est une flavoprotéine dimérique. Elle a un fonctionnement qui va de pair avec l'action des glutathion peroxydases puisqu'elle contribue au maintien à un niveau faible et constant du rapport GSSG/GSH par le maintien à une teneur élevée en GSH au sein de la cellule (Cossu *et al.*, 1997).

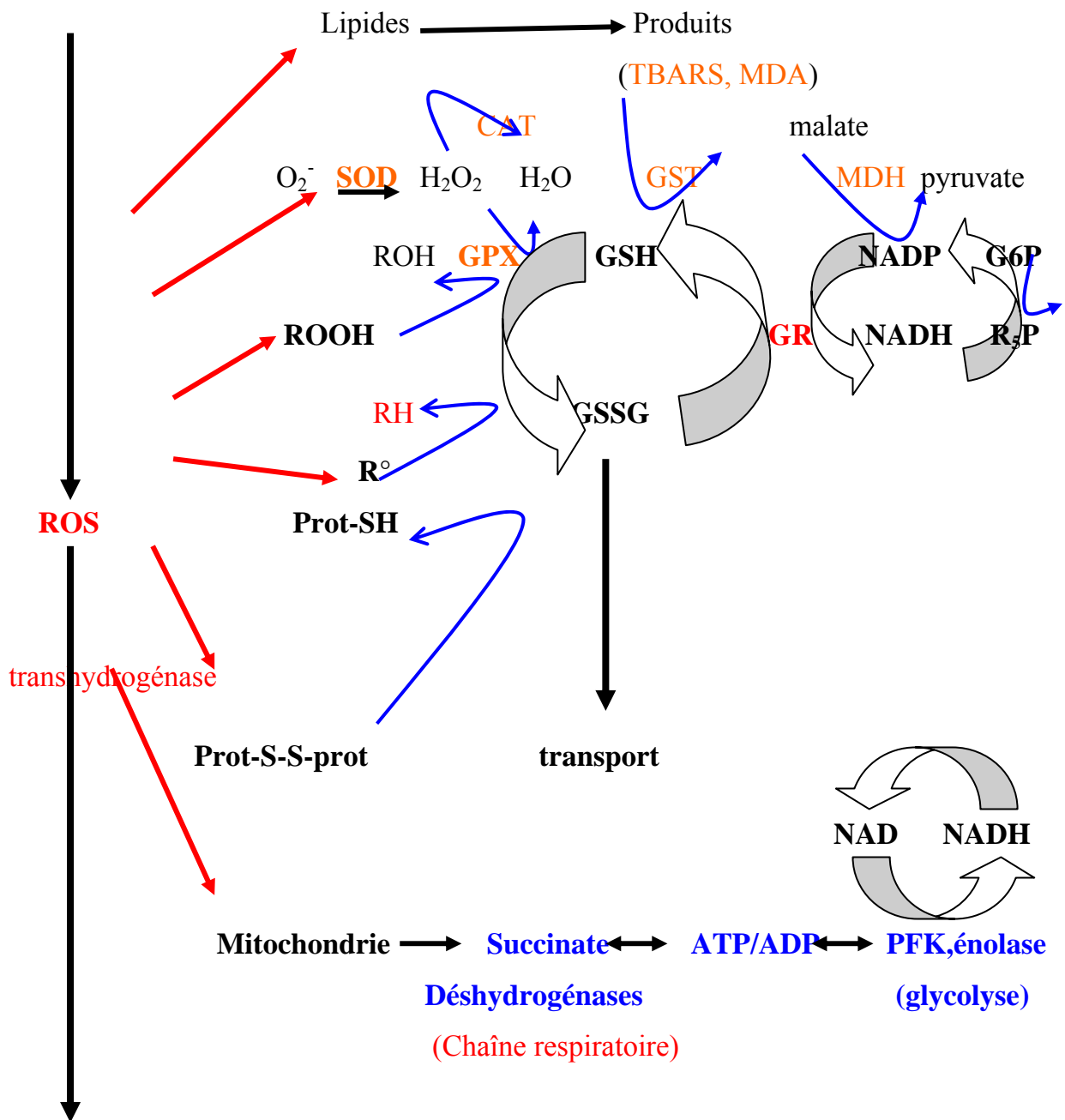
**NB :** Outre le GSH il existe d'autres antioxydants non enzymatiques, leur pouvoir antioxydant réside dans leur capacité à piéger les radicaux libres par réduction : la vitamine E, la vitamine C, le  $\beta$ - carotène et l'acide lipoïque.

## **4. Mécanisme de détoxification cellulaire**

La défense antioxydante doit tamponner la réponse pro-oxydante mise en place contre l'agresseur (en piégeant les substances pro-oxydantes en excès) tout en participant à la défense de l'hôte. Il s'agit de neutraliser et/ou d'éliminer le stress ou l'agresseur, de préserver au mieux l'environnement tissulaire puis de le réparer.

L'ensemble des mécanismes antioxydants enzymatiques et des systèmes non enzymatiques est résumé dans la figure 1 qui illustre la complexité des réactions qui coexistent au sein de la cellule lors d'un stress oxydant. Il faut noter qu'il existe une répartition non équivalente des moyens de défense antioxydants dans différents tissus.

Xénobiotiques  
(métaux lourds)



Piégeurs de  
Radicaux libres

Vit E

Vit C

Figure n°1 : Schéma général de la détoxification des ROS par les systèmes antioxydants cellulaires (selon Ritter et al., 1999)

## **D. Objectifs du travail**

Dans ce travail, nous proposons une approche directement réalisée sur une végétation ciblée *Lycopersicon esculentum* hautement contaminés par des métaux lourds particulièrement le Cadmium. Cette étude devrait contribuer à mieux comprendre :

**les phénomènes de tolérance :** Aborder les phénomènes de tolérance notamment la réponse au stress oxydatif induit par le cadmium et l'interaction cadmium/calcium chez la Tomate qui pourrait se révéler un bon modèle pour étudier la tolérance et l'accumulation des métaux lourds in vivo et in vitro.

**les phénomènes d'accumulation :** Accumulation des métaux dans les végétaux, leurs transferts dans les plantes et la tolérance aux métaux lourds, sont les critères fondamentaux qui seront abordés.

L'objectif des essais entrepris sur les plants de tomates (1<sup>ère</sup> culture maraichère cultivé dans la région de Annaba) est de réaliser une exposition à des concentrations croissantes de cadmium et cadmium/calcium, de façon à permettre l'étude des effets de ces derniers sur différents phénomènes physiologiques.

Notre travail s'est déroulé au laboratoire de Toxicologie Cellulaire de l'Université de Annaba et à l'Institut Technique des Cultures Maraichères (ITCMI) station El-kous (El-Tarf).

**A-Matériel expérimental :**

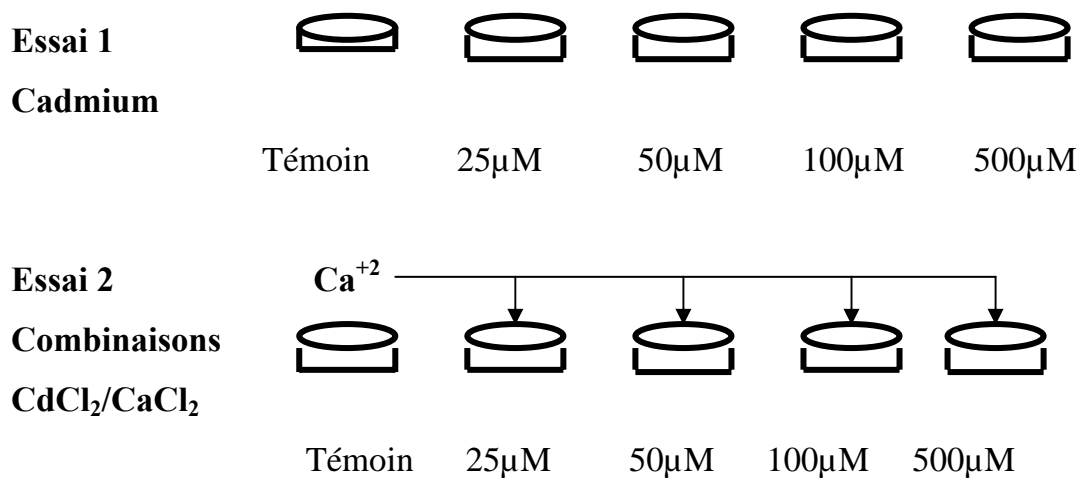
Le matériel expérimental utilisé dans notre travail est un végétal comestible la Tomate *Lycopersicon esculentum*. On a choisi une variété fixée (Rio-Grandé) très utilisée en conserverie dans la région de Annaba.

**B- Produits chimiques utilisés :**

Le produit chimique utilisé est un métal lourd : le chlorure de Cadmium  $CdCl_2$ . Nous avons aussi utilisé le Chlorure de Calcium  $CaCl_2$  afin d'étudier les interactions  $Cd^{2+}/Ca^{2+}$ .

Quatre concentrations sont choisies pour le Cadmium :  $50\mu M$ ,  $100\mu M$ ,  $250\mu M$  et  $500\mu M$ , tandis que pour le Calcium nous avons choisi une seule dose  $1\text{ mM}$ , appliqué à des échantillons préalablement traités par le cadmium à différentes concentrations (les tests sont répétés trois fois et les résultats obtenus sont exprimés par la moyenne).

Le  $Cd^{2+}$  ainsi que le  $Ca^{2+}$  sont additionnés directement dans les boites de culture de tomate (Figure n°2).



**Figure 2 : Préparation des boites de culture**

**C- Etude in vivo :**

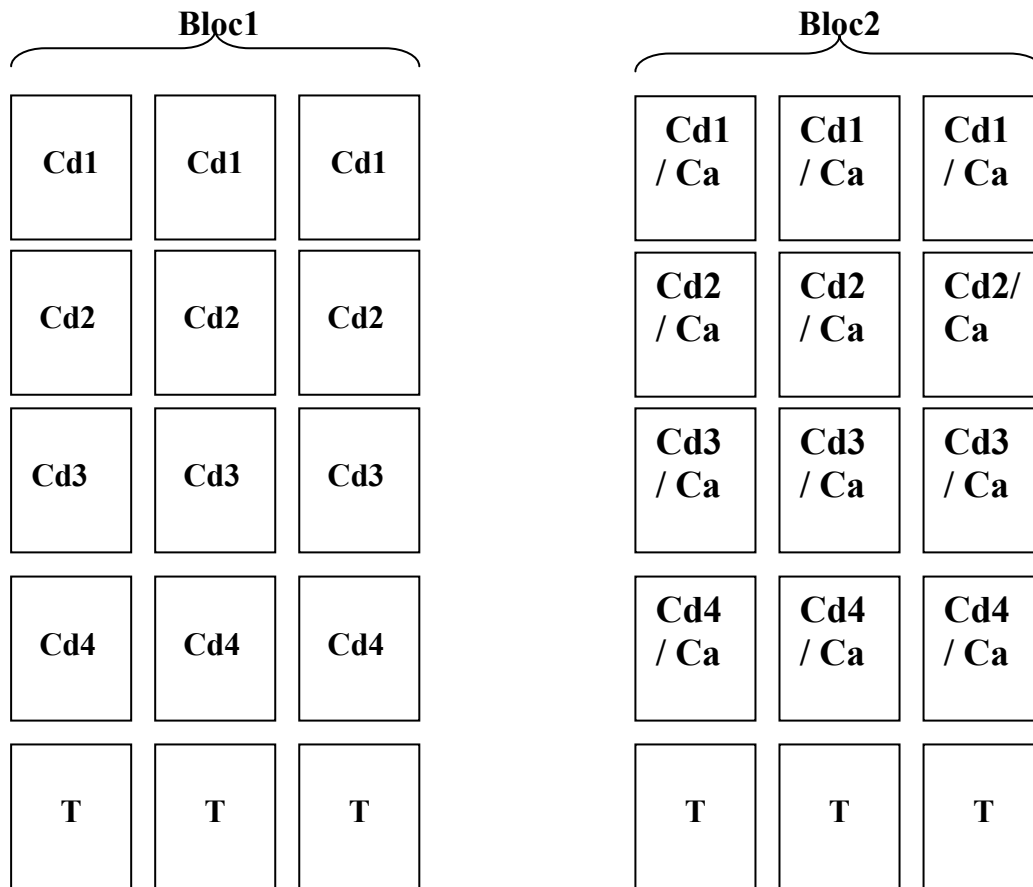
L'essai se déroule en plein champ a l'ITCMI au niveau de la station expérimentale de d'EL-Kous (EL-Tarf).

L'expérimentation est réalisé sur une variété de tomate industrielle de lignée fixée « Rio-Grandé » dont les caractéristiques sont résumés dans le tableau suivant :

**Tableau 1 : Caractéristiques de la Rio-grandé (ITCMI Annaba, 1995)**

| <b>Variétés</b>             | <b><u>Rio-Grandé</u></b> |
|-----------------------------|--------------------------|
| <b>Paramètres</b>           |                          |
| <b>Origine</b>              | France 2006              |
| <b>Type</b>                 | Déterminée               |
| <b>Nature</b>               | Fixée                    |
| <b>Destination</b>          | Transformation           |
| <b>Hauteur plant (cm)</b>   | 47                       |
| <b>Diamètre tige (cm)</b>   | 12                       |
| <b>Bouquets/ plant</b>      | 23                       |
| <b>Fleurs/ bouquet</b>      | 06                       |
| <b>Taux de nouaison (%)</b> | 12,20                    |
| <b>Forme de fruit</b>       | Ovoïde allongée          |
| <b>Couleur</b>              | Rouge foncé              |
| <b>Poids moyen (g)</b>      | 70                       |
| <b>Fermeté</b>              | Ferme                    |
| <b>Nombre de loge</b>       | 2-3                      |
| <b>IR</b>                   | 5                        |
| <b>Précocité</b>            | Tardive                  |

1. **Le Dispositif expérimental :** Le dispositif expérimental utilisé est représenté dans la figure n°4:



**Figure n°3 : Protocole Expérimental de l'essai**

T : Témoin, Cd1= 50 $\mu$ M, Cd2= 100 $\mu$ M, Cd3= 250 $\mu$ M, Cd4= 500 $\mu$ M,  
et Ca=1mM

## 2. Conduite de l'essai :

- **Le précédent cultural :** La parcelle de l'essai avait servi comme pépinière de culture maraichère.
- **Préparation de la pépinière :** Le terreau utilisé est d'origine désinfecté et stérile

▪ **Semis et entretien de la pépinière :**

**Le semis** a été réalisé le 04/02/2007 dans des petits pots au niveau du laboratoire, 12 pots par traitement (Cd et Cd/Ca) à différentes concentrations (50, 100, 250, et 500 $\mu$ m) donc un total de 24 pots pour les deux traitements, en plus des trois pots utilisés pour les contrôles.

**NB :** Après 7 jours d'application du traitement, la pépinière est déplacée à la station El-Kous.

**L'arrosage :** Il est assuré en permanence de la date du semis à la levée. Les fréquences sont ensuite réduites pour être définitivement arrêtées au moins 10 jours avant le repiquage, pour permettre l'acclimatation du jeune plant aux conditions de plein champ.

▪ **Le repiquage et travaux d'entretien :**

**Le repiquage :** Le repiquage est réalisé manuellement le **08/04/07** au niveau de la station El-kous.

**Méthodes culturales :** Le binage manuel est réalisé le **20/04/07** favorisant l'aération des plants et en même temps l'enfouissement. Un buttage unique est effectué le **23/05/06** pour favoriser l'émission de nouvelles racines. Un scarifiage, qui permet une oxygénation de la rhizosphère, coïncidente en général avec le début de la floraison. Deux scarifiages sont réalisés en date du **08/05/06 et 22/05/06**.



- **La récolte des fruits** : Nous avons réalisé 02 passages de récolte en date du 16/07/2007 et du 25/07/2007.

### **3. Les Paramètres étudiés :**

Nous avons procédé à des mesures en plein champ et au laboratoire relatif aux paramètres suivants :

#### **3.1. Paramètres de croissance :**

- **Hauteur moyenne du plant** : Mensuration réalisée à l'aide d'une règle graduée sur la tige principale du collet à la pointe de l'apex. Cette mesure est réalisée sur les plants choisis aléatoirement par bloc et par traitement.
- **Nombre moyen de fleurs / plants** : Le comptage mensuel est effectué sur les mêmes plants en fonction du traitement et du bloc.
- **Nombre moyen de bouquets / plant** : Le comptage de ce paramètre est effectué sur les mêmes plants, aux mêmes dates et aux mêmes stades phénologiques.
- **Taux de nouaison** : Le taux de nouaison exprime le pourcentage de fleur ayant évolué en fruits. La méthode utilisée pour le calcul de ce paramètre est la suivante :

$$\text{TDN (\%)} = \frac{\text{Rdt ( Qx / ha )}}{\text{NF x PMF x n plant}} \times 1000$$

**TDN** : taux de nouaison

**Rdt** : rendement (Qx/ha)

**MF** : Nombre de fleurs / plant

**PMF** : Poids moyen du fruit

**N Plant** : Nombre de plants de chaque parcelle élémentaire

### 3.2. Paramètres de production :

- **Nombre moyen de fruits / plant** : Un comptage visuel nous a permis de dénombrer les fruits noués/plant sur les 30 plants repérés par traitement et par bloc à chaque passage de récolte.
- **Production moyenne / plant** : C'est le rapport de la production globale par traitement sur le nombre total de plants. Observation retenue au cours de chaque passage de récolte.
- **Poids moyen du fruit** : Le calcul de ce paramètre est réalisé grâce à une balance de précision, et sur les fruits récoltés de plants.

$$\text{Poids moyen} = \frac{\text{Poids total des fruits récoltés}}{\text{Nbre de fruits récoltés}}$$

- **Taux d'avortement** : C'est la relation entre le nombre total de fleurs et le nombre total de fruits noués.
- **Rendement moyen / traitement (Qx/ha)** : Ce résultat concerne la production moyenne par plant que multiplie le peuplement à l'hectare de l'essai

### 3.3. Paramètres de qualité :

- **Détermination du résidu sec soluble (IR) :** Le résidu sec soluble détermine selon la méthode réfractométrique la concentration en saccharose d'une solution aqueuse ayant le même indice de réfraction que le produit analysé, dans des conditions déterminées de préparation et de température, cette concentration est exprimée en pourcentage de masse.

Principe : mesure, au moyen de réfractomètre de l'indice de réfraction d'une solution d'essai à la température de 20°C et conversion, à l'aide d'une table de l'indice de réfraction en résidu sec soluble (exprimé en saccharose), en lecture directe du résidu sec soluble sur le réfractomètre. Le réfractomètre doit être ajusté de façon à donner à la température de 20°C pour l'eau distillée, un indice de réfraction de 1,330. Si la détermination a été effectuée à une température de 20°C ± 0,5 °C, les corrections suivantes sont nécessaires :

$$n_D = n_P + 0,00013(t - 20)$$

- **pH des fruits :** La méthode utilisée est celle de Lecoq (1965), qui consiste à ajouter à 5g de jus de fruits (tomate) à 50 ml d'eau distillée tiède. Après agitation et filtration, le pH est déterminé par la lecture au moyen d'un pH mètre. Selon Montiguad *et al* (1983), le pH est un paramètre qui a son importance car il permet la sécurité de la maintenance de la conserve. La tomate doit toujours avoir un **pH < 4,5**.

- **Acidité titrable** : L'acidité des fruits et des légumes est donnée en grande partie par quelques acides organiques tel que : l'acide malique, l'acide tartrique, l'acide citrique et plus rarement l'acide oxalique (Tanislav, 1978).

Chez la Tomate, l'acidité qui domine est l'acide citrique avec 75% à 80% de l'acidité totale dans le jus de Tomate transformée. La détermination de l'acidité titrable consiste à neutraliser les acides contenus dans un extrait de jus de fruits en présence d'un indicateur coloré (phénolphthaléine), à l'aide d'une solution 0,1 normale jusqu'au virage de la solution au rose. Au point équivalent on calcule le taux d'acidité comme suit :

$$X = \frac{A \cdot K \cdot 100}{B}$$

**K** : Coefficient de correction (K= 0,006)

**A** : Quantité de soude en (ml) pour la titration

**B** : Poids nécessaire en (g)

**X** : Quantité d'acide en (%)

## D. Etude in vitro

### 1. Conditions de culture

Les graines de tomate (*Lycopersicon esculentum*, var. Rio-grandé) sont désinfectées par une solution d'eau oxygénée à 10% (v/v), rincées abondamment à l'eau distillée, puis mises à germer dans des boîtes de Pétri tapissées de papier filtre imbibé d'eau distillée.

La germination est réalisée à l'obscurité et à température moyenne de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ . Les plantules âgées de 6 jours sont ensuite repiquées et maintenues sur des solutions nutritives de base de Hoshang, dont le pH est maintenu entre 5,5 et 6,5. Sa composition est résumée dans le tableau suivant :

**Tableau n°2 : Solution nutritive de Hoshang**

| Sels                                | Poids (g /l) | Quantité (ml/l) |
|-------------------------------------|--------------|-----------------|
| <b>KNO<sub>3</sub></b>              | 100,1        | 5               |
| <b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b> | 136,09       | 1               |
| <b>Citrate de fer</b>               | 38,91        | 1               |
| <b>ZnSO<sub>4</sub></b>             | 0,28         | 1               |
| <b>H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub></b>  | 1,85         | 1               |
| <b>MgSO<sub>4</sub></b>             | 246,4        | 1               |
| <b>CaCL<sub>2</sub></b>             | 147          | 1               |
| <b>CuSO<sub>4</sub></b>             | 0,25         | 1               |
| <b>MnSO<sub>4</sub></b>             | 0,84         | 1               |

Après 12 jours de culture, les plantules sont transférées sur le même milieu additionné ou non de différentes doses de CdCl<sub>2</sub> (0–50–100– 250 et 500µM) pendant 7jours. Pour l'étude de l'interaction cadmium–calcium, le Ca<sup>+</sup> est ajouté aux solutions de base préalablement traitées par les différentes concentrations de CdCl<sub>2</sub>, sous forme de CaCl<sub>2</sub> (1mM).

## **2. Techniques analytiques**

### **2.1. Dosage des Protéines totales :**

Les protéines sont dosées par colorimétrie selon la méthode de Bradford, (1976). Le principe de la méthode est basé sur la fixation d'un colorant acide (bleu de coomassie) sur les protéines au niveau de résidus basiques et aromatiques, cette fixation provoque un transfert de sa couleur qui passe du rouge au bleu. Ce changement de coloration est mesuré à une longueur d'onde de 595nm par spectrophotomètre ( JENWAY 3600) en utilisant l'Albumine Sérum bovine (BSA) comme standard.

### **2.2. Dosage des chlorophylles :**

L'extraction des chlorophylles est effectuée selon la méthode de Holden (1975), qui consiste en une macération du végétal dans de l'acétone. Le traitement des échantillons se fait comme suit : on pèse 1g des feuilles du végétal coupé en petits morceaux et broyées dans un mortier avec 20ml d'acétone à 80% et environ 100mg de bicarbonate de calcium ( $\text{CaCO}_3$ ). Après le broyage total, la solution est ensuite filtrée et mise dans des boîtes noires afin d'éviter l'oxydation des chlorophylles par la lumière.

La lecture se fait aux deux longueurs d'onde 645nm et 663nm, après étalonnage de l'appareil avec la solution témoin d'acétone à 80%. L'équation qui nous permet de calculer les valeurs des chlorophylles (Arnon, 1949) est :

$$\text{Chl.a} = 12,70 \cdot \text{DO}(663) - 2,69 \cdot \text{DO}(645)$$

$$\text{Chl.b} = 22,90 \cdot \text{DO}(645) - 4,60 \cdot \text{DO}(663)$$

## 2.3. Dosage des Biomarqueurs

### 2.3.1. Dosages Enzymatiques

- **Préparation de l'extrait enzymatique :** La méthode utilisée afin d'obtenir l'extrait enzymatique des racines de la tomate traité avec du cadmium est celle de Loggini *et al.*,(1999). L'extrait sera utilisé pour la mesure de l'activité ascorbate-peroxydase (APX), gaïacols-peroxydase (GPX) et le Glutathion transférase (GST).

Après 12 jours de traitement, les racines fraîches (1g) sont broyées à froid à l'aide d'un mortier dans 5ml de tampon phosphate (50mM phosphate, pH=7,5). L'homogénat est ensuite filtré à l'aide d'une toile adéquate avant de procéder à une centrifugation à froid de 12000g pendant 20min (centrifugeuse Sigma 3-16K). Le surnageant obtenu sera utilisé comme extrait pour la détermination des différentes activités enzymatiques.

**Quantification des mesures spectrophotométrique :** La formule suivante est utilisée dans la quantification des différentes mesures spectrophotométriques suite aux dosages enzymatiques de la GPX, APX et CAT (Servais, 2004).

$$\text{Act.} = \frac{\Delta A \cdot V_t}{\epsilon \cdot \Delta t \cdot L \cdot V_e \cdot p}$$

**Act:** Activité enzymatique en nmole/min/mg de Protéines

**ε :** Coefficient d'extinction linéique molaire en M

**ΔA :** Différence moyenne de l'absorbance

**V<sub>t</sub>:** Volume total du mélange réactionnel en ml

**Ve:** Volume de l'extrait enzymatique en ml

**L:** Largeur de la cuve de mesure en cm

**P:** Teneur en protéine en mg.

**T:** temps de lecture en min

- **Dosage de l'activité Ascorbate-peroxydases (APX):** Le dosage spectrophotométrique de l'activité ascorbate-peroxydase est réalisé suivant le protocole adopté par Nakano et Azada (1987). Le volume réactionnel final de 3ml contient : 100 $\mu$ l d'extrait enzymatique, 50 $\mu$ l d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 0,3% et 2850 $\mu$ l de tampon phosphate NaK-Ascorbate (50mM NaK, 0,5mM ascorbate, pH= 7,2). L'étalonnage de l'appareil se fait en l'absence de l'extrait enzymatique. La lecture est effectuée à 290nm (spectrophotomètre GeneSys 8) pendant 1min et ce pour un coefficient d'extinction linéique molaire  $\epsilon = 2800M^{-1}.cm^{-1}$ . l'activité APX est exprimée en nmol/min/mg de protéines.
- **Dosage de l'activité Gaïacol-peroxydases (GPX):** L'activité gaïacol-peroxydase (GPX) est déterminée spectrophotométriquement (spectrophotomètre Jenway 6300) à 470nm suivant la technique de Fielding et *al.* (1978) le coefficient d'extinction linéique molaire utilisé est  $\epsilon = 2470M^{-1}.cm^{-1}$ . pour un volume final de 3ml, le mélange réactionnel contient : 100 $\mu$ l d'extrait enzymatique, 50 $\mu$ l d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 0,03% et 2850 $\mu$ l de tampon phosphate-Gaïacol (50mM NaK, 8mM de gaïacol, pH=7,20). L'étalonnage de l'appareil se fait en l'absence de l'extrait enzymatique. La réaction est déclenchée par l'ajout du peroxyde d'hydrogène. L'activité GPX est exprimée en nmol/min/mg de protéines.



- **Dosage de l'activité Catalase (CAT) :** Le dosage spectrophotométrique de l'activité catalase (CAT) est réalisé suivant la méthode de Cakmak et Horst, 1991). La décroissance de l'absorbance est enregistrée pendant trois minutes (spectrophotomètre Jenway 6300) pour une longueur d'onde de 240nm et un coefficient d'extinction linéique molaire  $\epsilon = 39400 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{L}$ . Pour un volume final de 3ml, le mélange réactionnel contient : 100 $\mu\text{l}$  de l'extrait enzymatique brut, 50 $\mu\text{l}$  de peroxyde d'hydrogène  $\text{H}_2\text{O}_2$  à 0,3% et 2850 $\mu\text{l}$  de tampon phosphate (50mM, pH= 7,2). L'étalonnage de l'appareil se fait en l'absence de l'extrait enzymatique. La réaction est déclenchée par l'addition d'eau oxygénée. L'activité catalase est exprimée en nmol/min/mg de protéines.
- **Dosage de l'activité Glutathion S-Transférase (GST) :** Le dosage de la glutathion S-transférase est réalisé par la méthode de (Habig *et al.*, 1974) les échantillons sont homogénéisés dans un tampon phosphate à pH 6,5 et à 100mM et centrifugés à 9000g pendant 30 min. La méthode consiste à faire réagir les GST<sub>S</sub> sur un mélange CDNB (20mM)-GSH (100mM) la variation de la densité optique due à l'apparition du complexe CDNB-GSH est mesurée toutes les 15 secondes pendant 2 minutes à 340nm. Les concentrations de la GST sont exprimées en nmole /min/ mg de protéines.

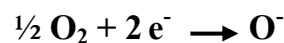
### 2.3.2. Le Dosage non Enzymatique

- **Le Glutathion (GSH) :** L'extrait enzymatique est homogénéisé dans une solution d'E.D.T.A à 0,02M et subit une déprotéinisation par l'acide sulfo-salicylique 0,25%. Après centrifugation à 2000 g pendant 10 minutes le surnageant est utilisé pour le dosage spectrophotométrique avec le réactif DTNB à 0,01M à 412nm.

Les concentrations du GSH sont dosées par la méthode de (Weckbecker et Cory, 1988) et exprimées en  $\mu\text{M}$ / mg de protéines.

**NB : le dosage de la GST et GSH est réalisé après 1h, 24h, 48h et 7jours afin de suivre le comportement de ces derniers durant le stress oxydatif.**

**2.4. Etude du métabolisme respiratoire :** L'appareil utilisé est une électrode à oxygène, de type HANSATECH, qui permet la mesure de la production ou de la consommation d'oxygène. L'appareil comprend une cathode polarisé (-) en platine et une anode polarisé (+) circulaire en argent. Le contact entre les deux électrodes est établi par un pont de solution saturée de KCl, la suspension cellulaire est constamment remuée par un agitateur magnétique. L'application d'une faible tension électrique va provoquer la réduction électrolytique de l'oxygène présent dans la solution. Le courant qui traverse le circuit des deux électrodes quand la tension appliquée est en moyenne de 0,7mV, varie linéairement en fonction de la concentration en oxygène dissout dans la suspension cellulaire selon la réaction :



La jaquette est maintenant à une température constante de 25°C. Cet appareil est relié à un ordinateur sur lequel les spectres apparaissent et sont ensuite enregistrés sur une imprimante de type (Epson-LQ 1027). La méthode utilisée est adaptée aux racines isolées. (Djebar et Djebar, 2000).

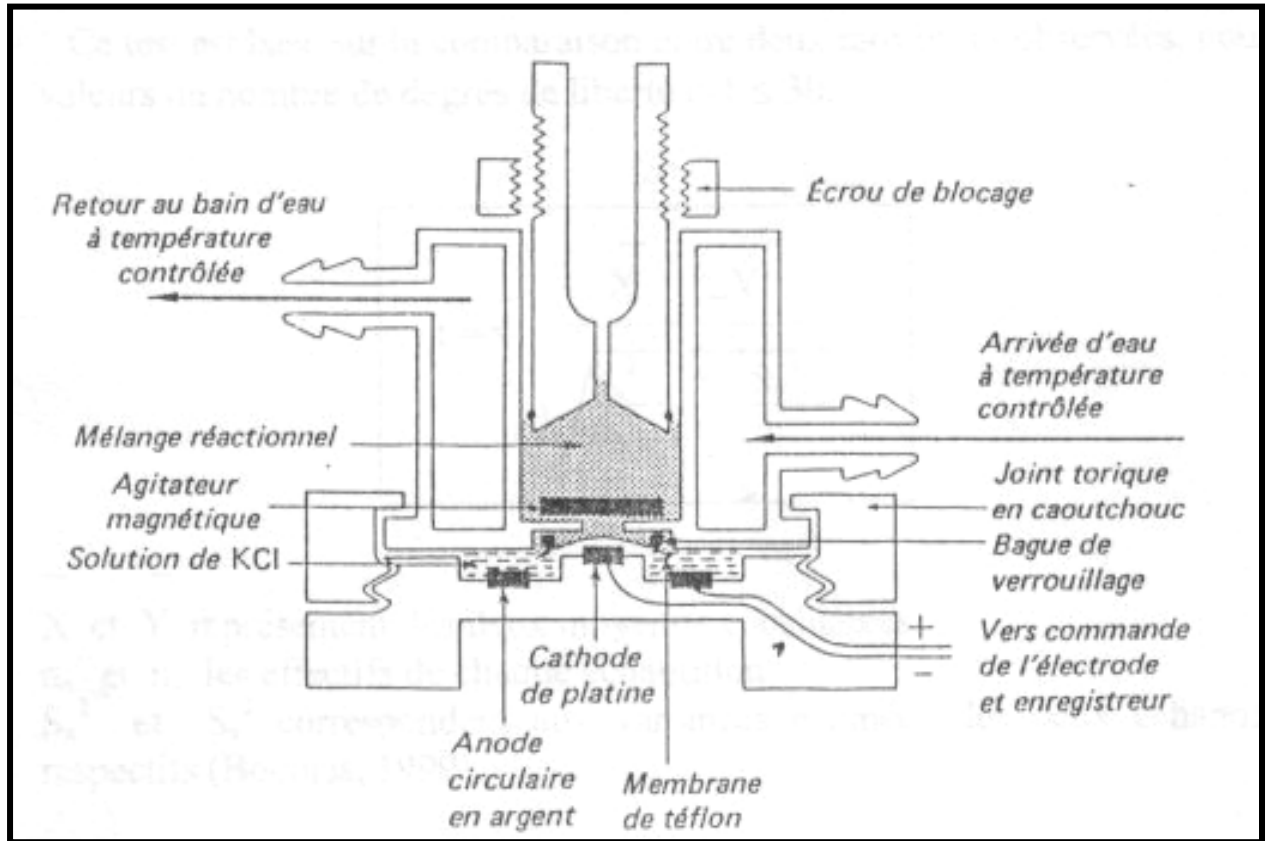


Figure 4 : Schéma de l'électrode à oxygène

### 2.5. Etude du métabolisme photosynthétique :

L'intensité photosynthétique des feuilles isolées est mesurée par l'électrode à oxygène comme pour l'intensité respiratoire où l'échantillon (feuilles) est caché par une boîte noire afin d'accélérer le processus métabolique.

### E. L'Analyses statistiques :

L'analyse de la variance à un facteur contrôlé pour effectuer des tests de comparaisons multiples afin d'expliquer les différences entre les moyennes des différentes activités enzymatiques et facteurs Agronomique.

L'analyse de la variance à deux facteurs contrôlés est utilisée pour l'estimation des différences signalées pour les différents paramètres étudiés sous l'effet des deux types de traitements et en fonction des différentes concentrations du métal.

Les résultats sont interprétés comme suit :

Si  $P = 0,05 \rightarrow RHO \rightarrow$  il existe des différences significatives \*

Si  $P = 0,01 \rightarrow RHO \rightarrow$  il existe des différences hautement significatives\*\*

Si  $P = 0,001 \rightarrow RHO \rightarrow$  il existe des différences très hautement significatives \*\*\*

## 1. Etude in vivo

Au préalable à l'étude des effets du cadmium et la combinaison Cd/Ca sur la tomate à l'échelle cellulaire, l'essai au champ a d'abord été réalisé sur des plants entiers préalablement cultivés en laboratoire puis repiqués sur champ.

L'étude a concerné quelques paramètres physiologiques (hauteur, nombre de bouquet, nombre de fleurs, taux de nouaison), des paramètres de production (nombre de fruit, poids moyen des fruits, taux d'avortement, production par plant et rendement par traitement) et des paramètres de qualité (indice de réfraction, pH du fruit, acidité du fruit).

### 1.1. Paramètres de Croissance

#### ▪ Hauteur moyenne du plant

Les résultats obtenus quant aux variations de la hauteur moyenne du plant de tomate traité par les différentes concentrations de cadmium et par le traitement combiné Cd/Ca sont reportés dans les figures 5 et 6.

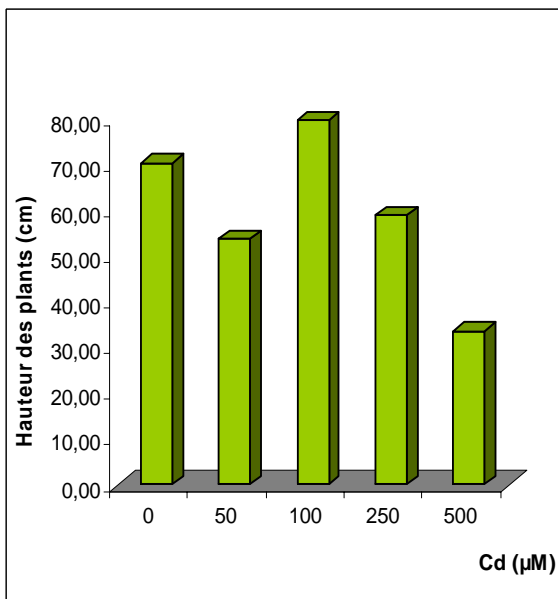


Fig n°5: hauteur des plants de Tomate traités par différentes concentrations de cd

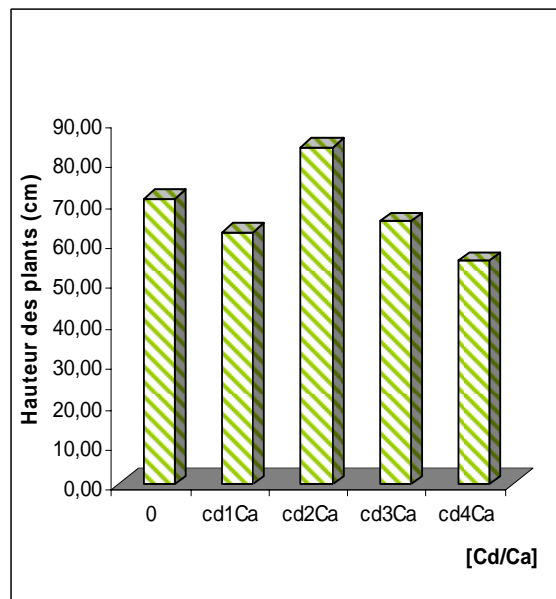


Fig n°6 : hauteur des plants de Tomate traités par différentes concentrations de Cd/Ca.

Sur la figure 5 on constate que les hauteurs moyennes des plants ont tendance à diminuer en fonction des concentrations de cadmium particulièrement à la concentration de Cd1= 50 $\mu$ M où on enregistre près de 25% de baisse. On note ensuite une légère augmentation pour Cd2 et Cd3 et une baisse pour Cd4. Ainsi le traitement par les différentes concentrations de cadmium a tendance à diminué les hauteurs moyennes aux faibles concentrations.

Parallèlement sur la figure 6 on constate que les traitements combinés Cd/Ca provoquent une baisse des hauteurs moyennes des plants. La plus forte diminution de la hauteur est reportée pour la plus forte concentration de cadmium, elle est de 20% environ. Ainsi on remarque que le traitement combiné Cd/Ca suit le traitement par le cadmium en fonction des différentes concentrations.

L'analyse de variance a décelé des différences non significatives entre la taille du plant et la concentration du métal (cd, Cd/Ca), et en fonction des différents traitements.

▪ **Nombre de bouquet de fleur par plant**

Concernant ce paramètre les résultats obtenus sont repris dans la figure 7 pour le traitement par le cadmium et la figure 8 pour les traitements combinés Cd/Ca.

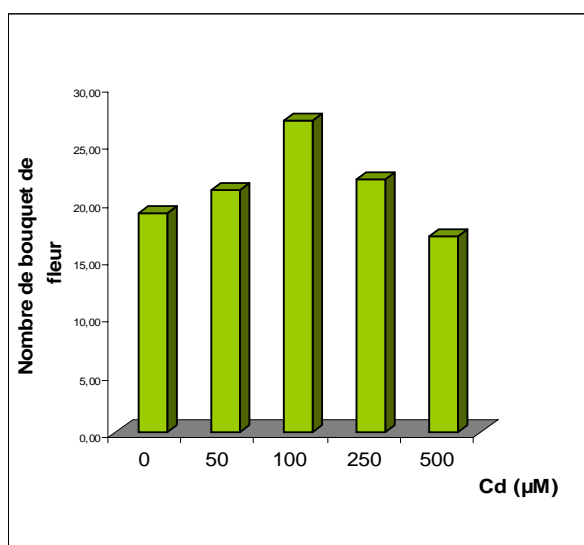


Fig n° 7: Nombre de BF/plants de Tomate traités par différentes concentrations de cadmium.

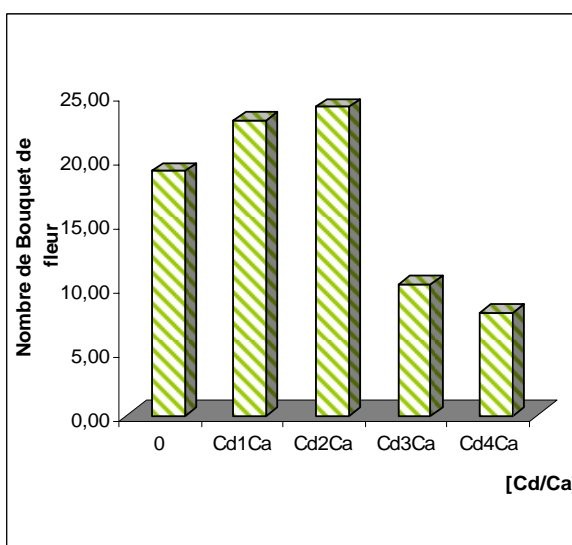


Fig n°8: Nombre de BF/plants plants de Tomate traités par différentes concentrations de Cd/Ca.

Sur la figure 7 on constate que le cadmium stimule le nombre de bouquet de fleur par plant pour atteindre un maximum à 100 $\mu$ M. A cette concentration un pic est même observé avec plus de 40% d'augmentation par rapport au témoin. Au-delà de cette concentration le NBF par plant baisse de façon importante pour atteindre à la plus forte concentration de cadmium une valeur moyenne de 20 bouquets par plant.

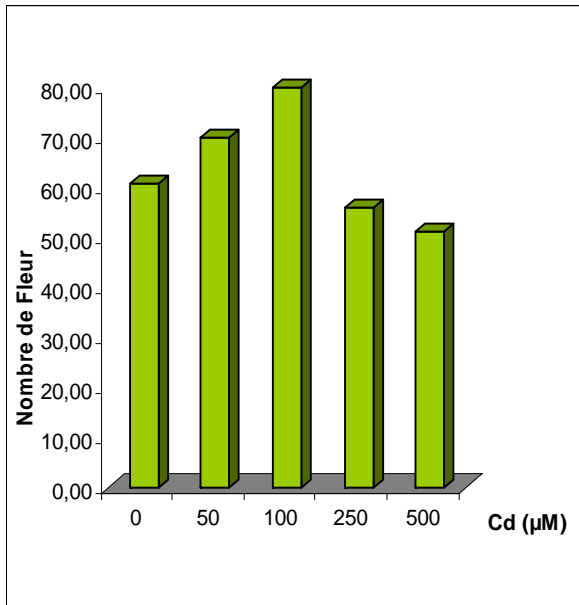
Les traitements combinés Cd/Ca (figure 8) montrent que le NBF par plant présentent le même profil que celui obtenu par les traitements au cadmium avec un maximum observé pour le Cd2 mais une baisse plus importante notée à Cd3 et Cd4 (environ 80%).

L'analyse de variance à deux facteurs contrôlés a révélé des différences très hautement significatives entre les deux traitements et en fonction des différentes doses.

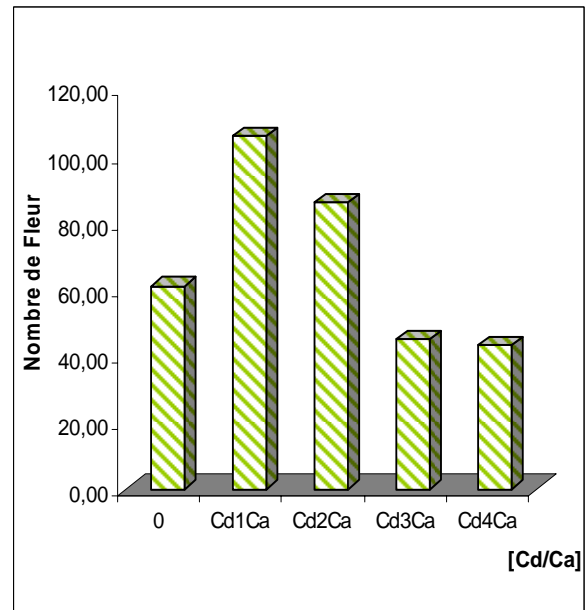
- **Nombre moyen de fleurs par plant**

Les résultats obtenus du nombre moyen de fleur (NF) par plant de tomate traité par les différentes concentrations de cadmium sont représentés sur la figure 9 et ceux des traitements combinés sur la figure 10.

On constate ainsi que le nombre de fleur par plant augmente en fonction de la concentration en cadmium jusqu'à atteindre un maximum à la concentration 100 $\mu$ M, puis une baisse est observée avec Cd3 et Cd4. celles-ci constitue près de 30% par rapport aux plants témoins.



**Fig n°9: Nombre de fleur/plants de Tomate traités par différentes concentrations de Cd.**



**Fig n°10: Nombre de fleur/plants de Tomate traités par différentes concentrations de Cd/Ca.**

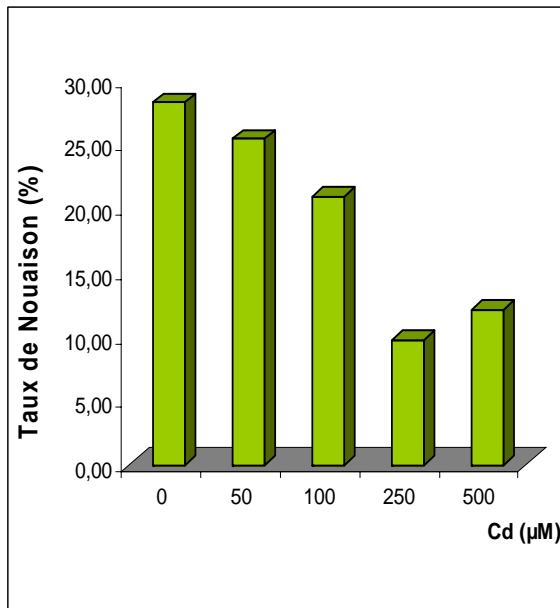
Le traitement combiné Cd/Ca montre qu'à la plus faible concentration de Cd une forte stimulation du NF par plant est obtenue, elle est de 50% environ. Au-delà de cette concentration de cadmium, la combinaison Cd/Ca provoque plutôt une forte chute de ce paramètre (60% par pic observé).

L'étude statistique a révélé des différences significatives entre le nombre de fleur et les différentes concentrations du cadmium et combinaison Cd/Ca.

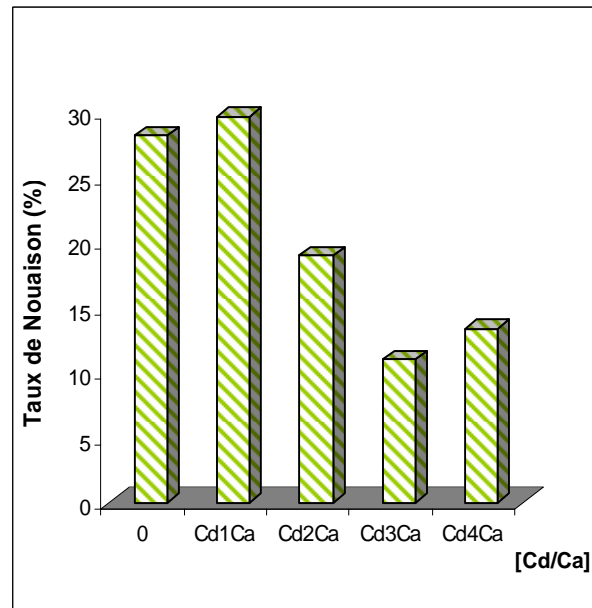
#### ▪ Taux de nouaison

Le taux de nouaison est la capacité de la fleur à se transformer en fruit. Ce phénomène peut être largement lié à la potentialité génétique variétale pour la nutrition d'un certain nombre, et aux conditions climatiques. Les résultats de ce paramètre sont reportés sur les figures 11 et 12.





**Fig n°11: Taux de nouaison de la Tomate traités par différentes concentrations de cadmium.**



**Fig n°12 : Taux de nouaison de la Tomate traités par différentes concentrations de Cd/Ca.**

D'après la figure 11, on remarque que le taux de nouaison semble diminuer en fonction des concentrations de Cd. En effet, pour la plus faible concentration de Cd, une chute du taux de nouaison de près de 25% est observée. En augmentant la concentration en Cd, cette baisse s'accroît pour atteindre près de 70% comparée aux plants témoins.

Concernant les traitements combinés Cd/Ca (figure 12), on constate une très forte inhibition du TMN et ce pour la plus faible concentration de Cd (70%). Une légère augmentation est obtenue avec l'augmentation des concentrations de Cd.

Ces résultats ont été confirmés par l'analyse de variance qui montre une différence hautement significative entre le taux de nouaison et les différentes concentrations du métal.

## 1.2. Paramètres de Production

### ▪ Nombre moyen de fruits par plant

Le premier paramètre de production mesuré est le nombre de fruit. Les résultats obtenus sont représentés sur la figure 13 pour le traitement par le cadmium et la figure 14 pour le traitement combiné Cd/Ca.

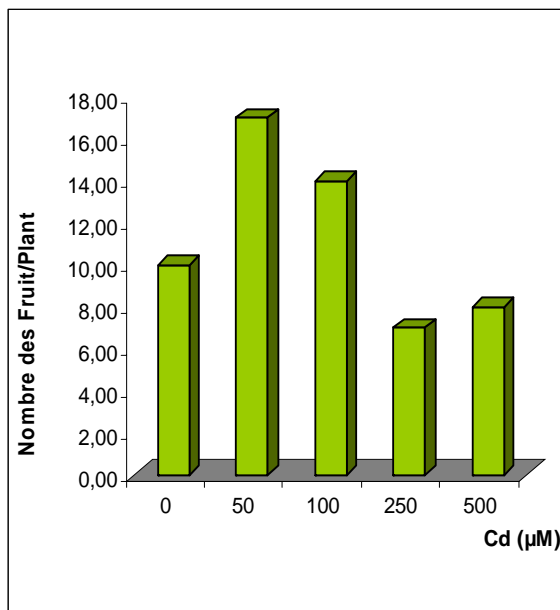


Fig n°13:Nbre moyen de fruits/plants de la Tomate traités à différente concentration de cadmium.

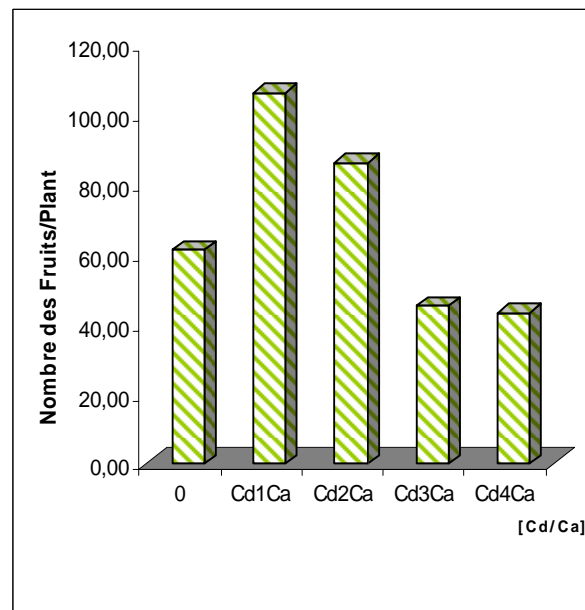


Fig n°14:Nbre moyen de fruits/plants de la Tomate traités à différente concentration de Cd/Ca.

On remarque que le nombre de fruits augmente en fonction des concentrations du cadmium pour les deux premières doses (50 et 100µM). Au-delà de ces concentrations il y a diminution de leur nombre (figure 13). Ainsi le Cd à faible concentration stimule le nombre moyen des fruits et à forte concentration il provoque plutôt une chute de ce paramètre.

Pour le traitement combiné le même profil est ainsi obtenu avec un nombre de fruits légèrement inférieur à ceux traités par le cadmium (figure 14).

L'analyse de variance à deux facteurs contrôlés a révélé des différences hautement significatives entre le nombre de fruit avec les deux types de traitements et en fonction des doses.

#### ▪ Poids moyen de fruit

Le deuxième paramètre de production mesuré est le poids moyen de fruit. Les résultats obtenus sont représentés sur la figure 15 pour les différentes concentrations de cadmium et sur la figure 16 pour le traitement combiné.

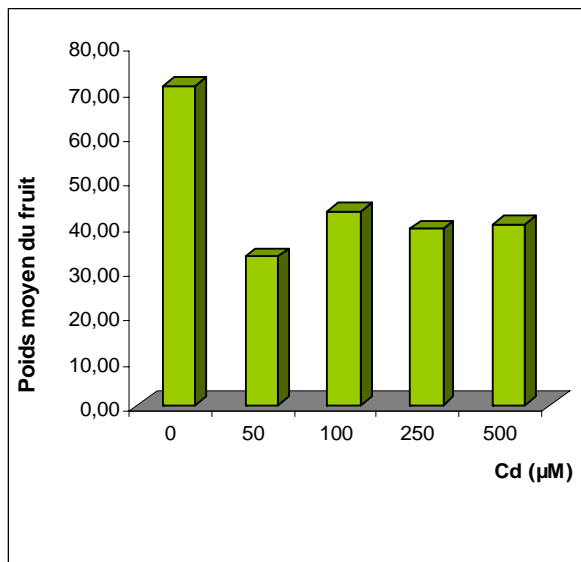


Fig n°15: Poids moyen de fruits/plants de Tomate traités par différentes concentrations de cadmium.

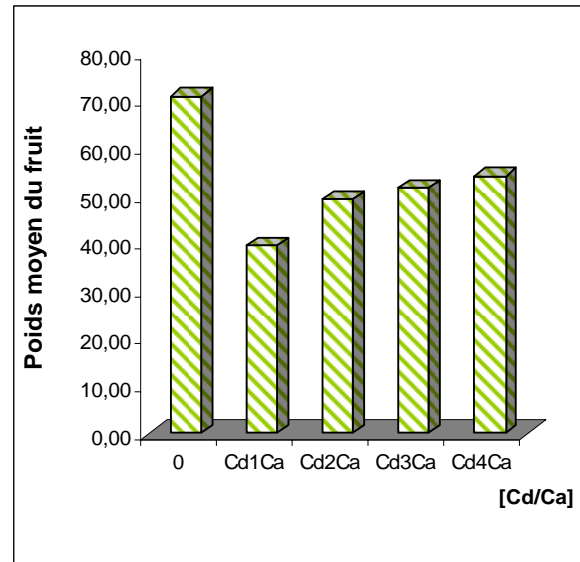


Fig n°16 Poids moyen de fruits/plants de Tomate traités par différentes concentrations de Cd/Ca.

On observe d'après la figure 15 que le poids moyen des fruits récoltés par plant augmente légèrement en fonction des différentes concentrations de Cd mais reste toujours inférieure au témoin avec un maximum de 43g pour Cd2.

Le traitement combiné Cd/Ca provoque aussi une diminution du poids moyen du fruit par rapport au témoin mais subit une légère élévation en fonction de la concentration du Cd (figure 16). La plus grande valeur est observée chez le traitement Cd4/Ca avec 54,28g.

L'analyse de variance à deux facteurs contrôlés montre une différence très hautement significative entre le poids moyen de fruits et les deux traitements en fonction des différentes concentrations de cadmium et cadmium/calcium.

▪ **Taux d'avortement**

L'avortement des fleurs est lié à plusieurs facteurs d'origine intravariétale ou extravariétale. Nos résultats sont représentés dans les figures 17 et 18.

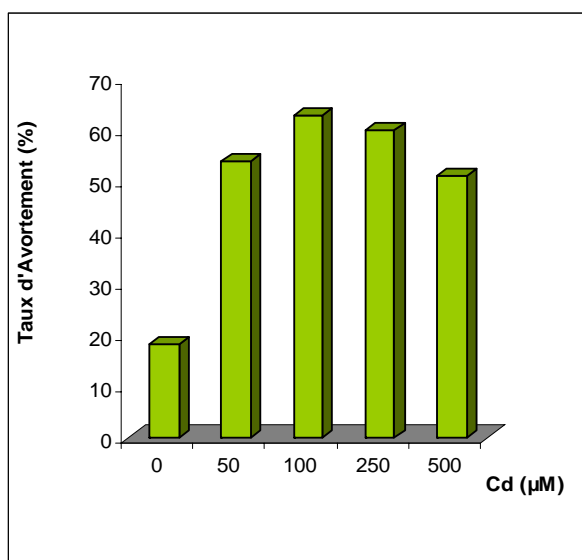


Fig n°17: Taux d'avortement des fruits de Tomate traités par différente concentration de cadmium.

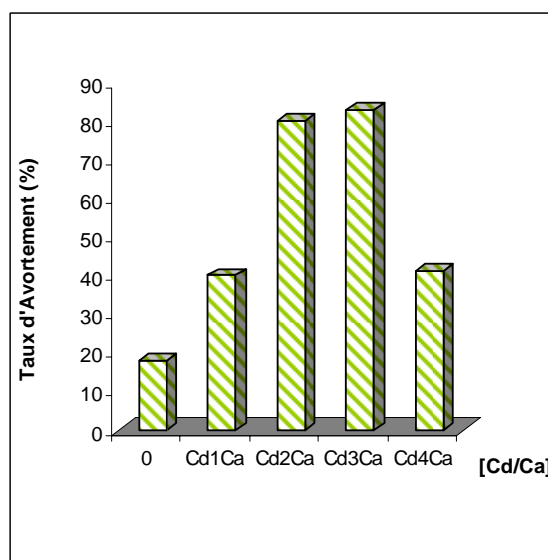


Fig n°18: Taux d'avortement des fruits de Tomate traités par différente concentration de Cd/Ca.

Ainsi on constate que le traitement par le cadmium provoque une forte stimulation du taux d'avortement et ce déjà dans la plus faible concentration. On effet, on observe dans la figure 17 un taux d'avortement trois fois plus élevé pour Cd1, il continue d'augmenter à Cd2, se stabilise au Cd 3 pour diminuer légèrement au Cd4.

Parallèlement les traitements combinés semblent aussi provoquer une stimulation moins importante par rapport au traitement par le Cd mais assez importante par rapport au témoin (50%).

L'augmentation des concentrations en Cd s'accompagne d'une stimulation du taux d'avortement par Cd2 et Cd3. On enregistre une baisse avec Cd4 mais le taux obtenu reste deux fois supérieur à celui enregistré chez les plants témoins (figure 18).

Ces résultats ont été confirmés par l'étude statistique qui a décelé des différences hautement significatives entre le taux d'avortement des fleurs et les différentes concentrations du cadmium et interaction Cd/Ca.

▪ **Production moyenne par plant**

Les résultats obtenus sont reportés sur la figure 19 pour le traitement par le Cadmium et la figure 20 pour le traitement combiné.

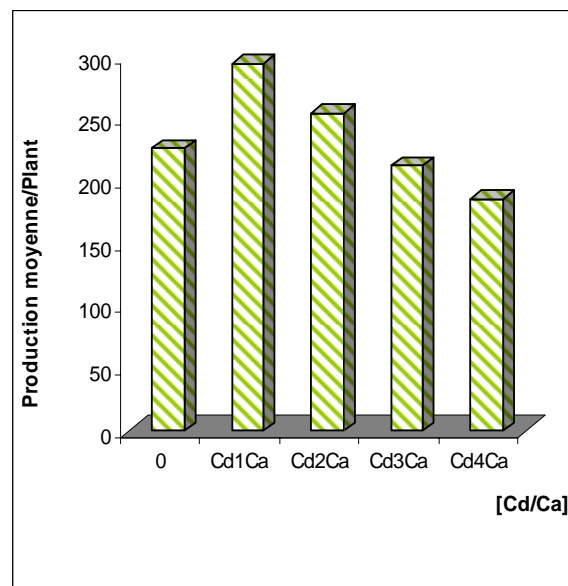
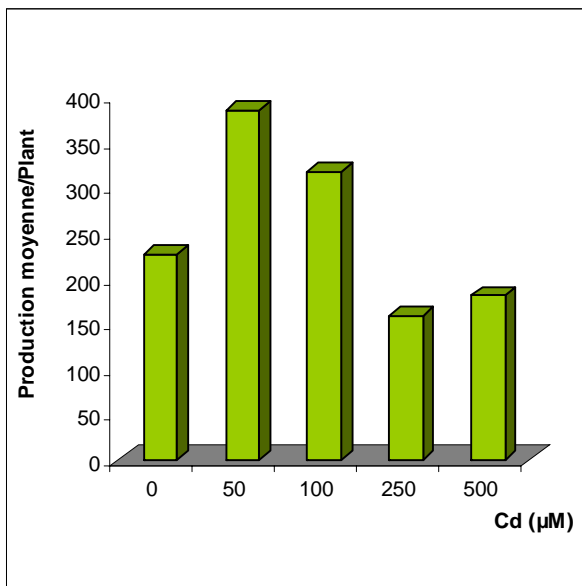


Fig n°19: Production moyenne par plants de Tomate traités par différentes concentrations de cadmium.

Fig n°20 : Production moyenne par plants de Tomate traités par différente concentration de Cd/Ca.

D'après la figure 19, on remarque que le cadmium à faible concentration (50 et 100µM) provoque une très forte stimulation de la production moyenne par plant alors que les fortes concentrations de cadmium induisent la diminution de celle-ci.

Les traitements combinés montrent que la production moyenne par plant suit le même profil que celles traitées par le cadmium. Ces résultats ont été confirmés par l'étude statistique qui a révélé des différences significatives de la production moyenne entre les deux traitements (Cd, Cd/Ca<sup>+</sup>) et hautement significative pour la production en fonction des différentes doses.

▪ **Rendement moyen par traitement**

Les résultats obtenus sont représentés sur la figure pour le traitement par le Cd et sur la figure pour le traitement combiné.

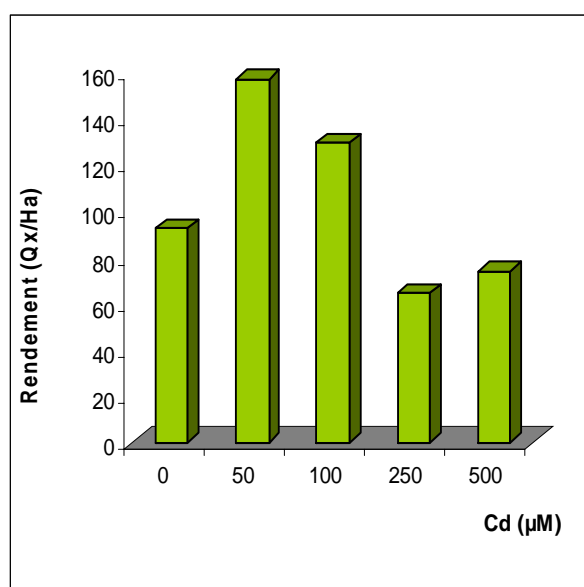


Fig n°21: Rendement moyen de Tomate traités par différentes concentrations de cadmium.

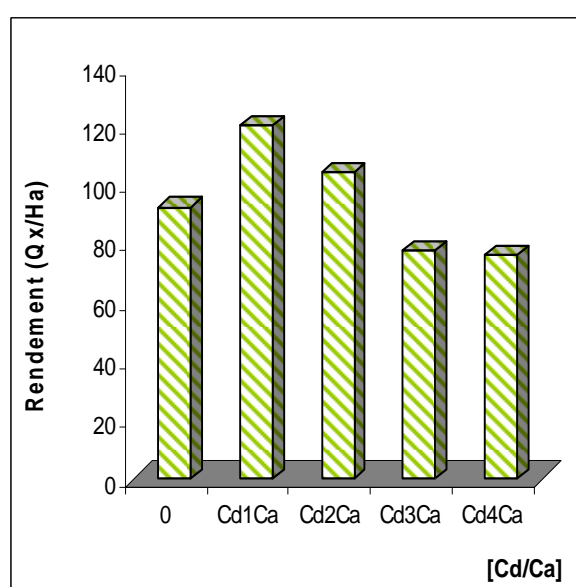


Fig n°22 : Rendement moyen de Tomate traités par différentes concentrations de Cd/Ca.

La figure 21 montre que le traitement par le cadmium commence d'abord par stimuler le RDT de près de 50% à la première concentration utilisée. Une faible baisse est observée après traitement au Cd2, celle-ci est suivie par une plus forte diminution aux concentrations Cd3 et Cd4.

Le traitement combiné Cd/Ca (figure 22) montre une stimulation du RDT à la dose Cd1, une légère baisse avec Cd2 qui continue avec Cd3 et Cd4. Ainsi on peut dire que les deux types de traitements présentent deux profils similaires.

L'analyse de variance a décelé des différences hautement significatives entre le rendement et les différentes concentrations pour les deux types de traitement.

### 1.3. Paramètres de Qualité

Plusieurs paramètres ont été réalisés dans notre étude. Parmi ces derniers on peut citer les plus importants.

#### ▪ L'indice de Réfraction

L'indice réfractométrique est défini comme une valeur de matière soluble contenue dans le jus. Les fruits d'un même plant peuvent enregistrer une différence au niveau de ce paramètre, cette valeur n'est pas fixe pour chaque variété et demeure variable selon, le sol, climat et période de récolte (Anonyme, 1995).

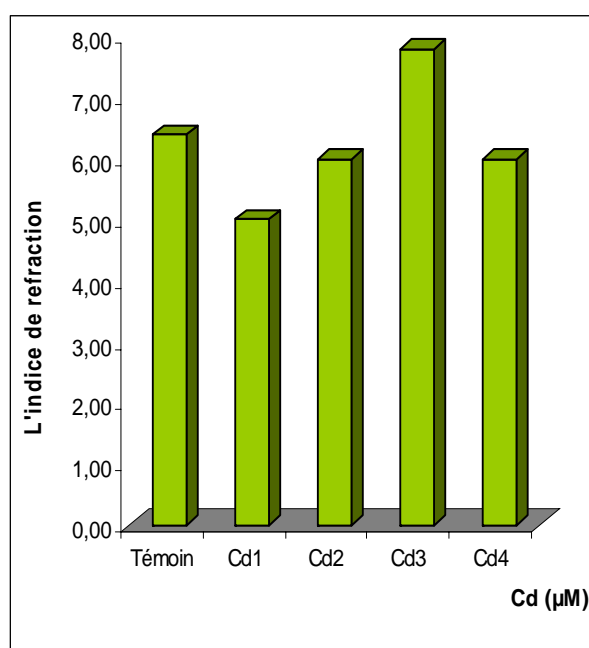


Fig n°23 : IR du fruit de Tomate traités par différentes concentrations de cadmium.

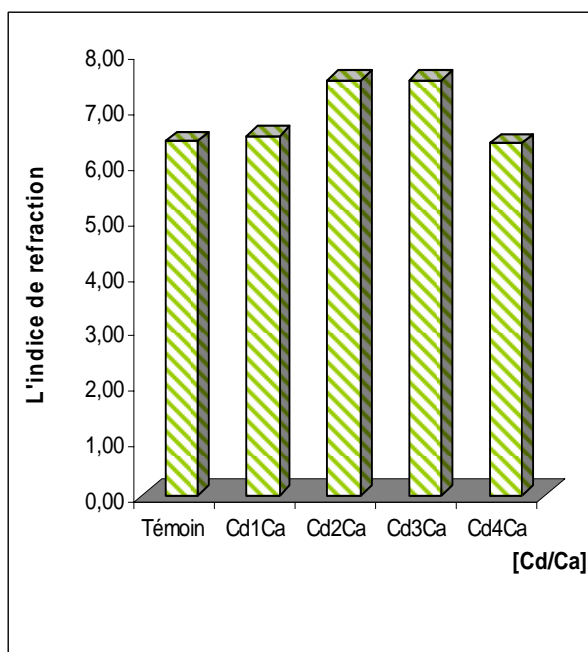


Fig n°24 : IR du fruit de Tomate traités par différentes concentrations de Cd/Ca.

Les résultats de la figure 23 montrent que le traitement par les différentes concentrations de cadmium ne semble pas modifier de façon importante les volumes de l'IR comparé à la valeur de ce dernier chez les plants témoins. Il faut cependant noter que les valeurs de l'IR les plus élevées sont observées avec Cd2 et Cd3. La même chose est observée chez le traitement combiné (figure 24) qui demeure supérieur au témoin.

L'analyse de variance à deux facteurs contrôlés a révélé des différences significatives entre l'indice de réfraction et les deux traitements en fonction des différentes concentrations.

▪ **Le pH du fruit**

Selon Montigaud et al (1983), le pH est un paramètre qui a son importance car il permet la sécurité de la maintenance de la conserve. La tomate doit avoir toujours un pH inférieur à 4,5. Nos résultats sont enregistrés dans la figure 25 pour le traitement par le cadmium et la figure 26 pour le traitement combiné.

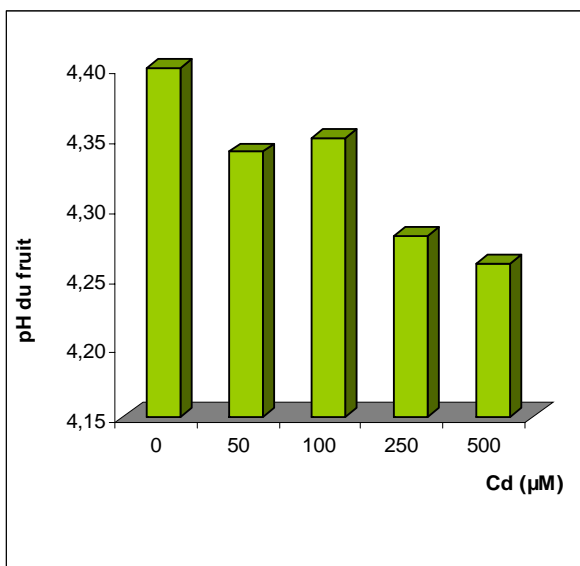


Fig n°25: pH du fruit de Tomate traités par différentes concentrations de cadmium.

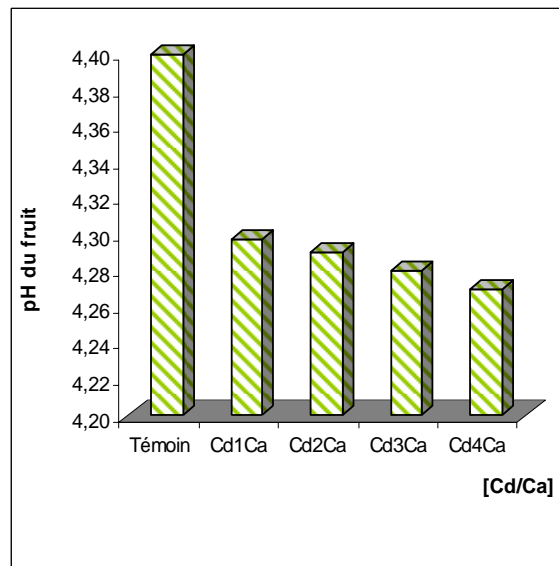


Fig n°26 : pH du fruit de Tomate traités par différentes concentrations de Cd/Ca.



D'après les figures 25 et 26 on remarque que le pH baisse légèrement avec les différentes concentrations du métal et en fonction des deux types de traitements. Ainsi, on peut dire que le pH répond parfaitement à la norme fixée pour une bonne conservation de la tomate. Ces valeurs sont comprises entre (4,26 et 4,49) pour les fruits traités au cadmium et entre (4,29 et 4,40) pour les fruits traités au Cd/Ca.

L'analyse statistique a révélé des différences significatives entre les deux traitements et en fonction des concentrations.

▪ **L'acidité titrable du fruit**

Ce dernier paramètre mesure la teneur en acidité totale exprimée en acide citrique dans la tomate fraîche. Celle-ci ne doit pas être inférieure à 35% (Miladi, 1970). Les résultats obtenus sont reportés sur la figure pour les traitements combinés.

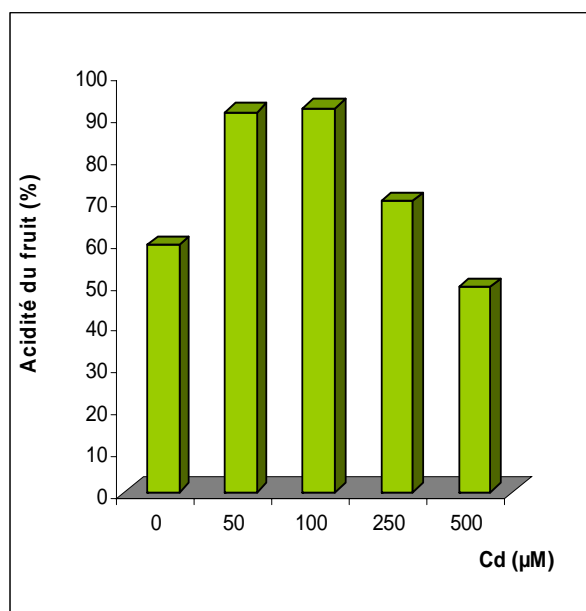


Fig n°27: L'acidité titrable du fruit de Tomate traités par différentes concentrations de cadmium.

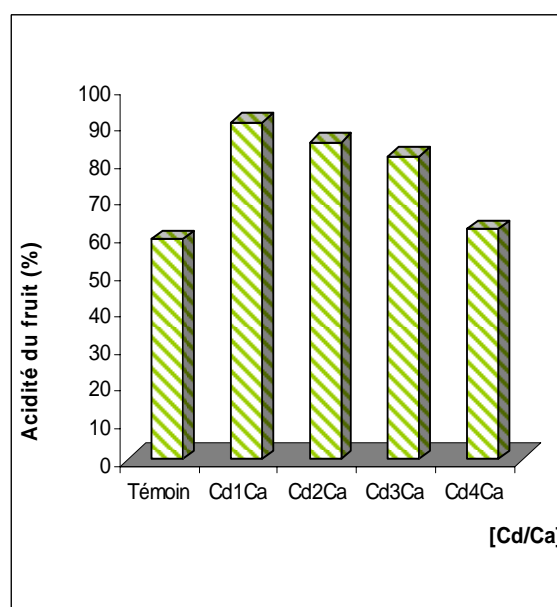


Fig n°28 :L'acidité titrable du fruit de Tomate traités par différentes concentrations de Cd/Ca.

Dans ce cas de figure, on voit clairement que les deux types de traitements semblent provoquer les mêmes effets à savoir une forte stimulation de l'acidité du fruit aux concentrations Cd1 et Cd2 suivie d'une baisse de ce paramètre aux concentrations Cd3 et Cd4. Il faut noter aussi que les différences enregistrées entre les pics obtenus et les taux les plus bas d'acidité sont les même (30%) pour les deux types de traitements et que le calcium ne semble pas intervenir de façon importante dans les effets provoqués par le cadmium.

L'analyse de variance a révélé des différences très hautement significatives du taux de l'acide citrique en fonction des concentrations du métal.

## **2. Etude in vitro**

Dans cette partie nous avons présenté les principaux résultats obtenus concernant les essais réalisés au laboratoire. Les paramètres mesurés sont les protéines totales, la chlorophylle totale a et b, les activités enzymatiques intervenant dans les phénomènes de détoxification telle l'APX (Ascorbate Peroxidases), la GPX (Guaigol Peroxydase) et la CAT (catalase).

Parallèlement à ses mesures nous avons étudiés les effets des traitements combinés Cd/Ca sur l'activité GST (Glutathion S- transférase) et GSH (Glutathion).

Enfin, une étude tout à fait originale concerne, les effets du cadmium et la combinaison Cd/Ca sur le métabolisme énergétique des racines isolées à partir des plants de tomate. Les deux phénomènes énergétiques mesurés sont la respiration et la photosynthèse.

## 2.1. Effet du Cd et Cd/Ca sur les Protéines totales

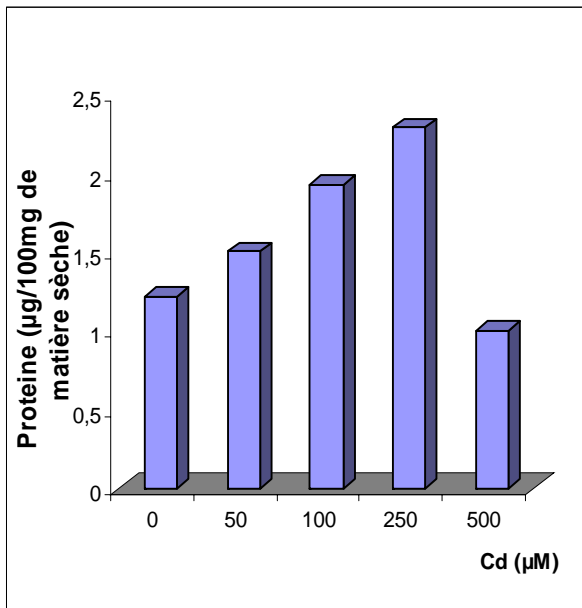


Fig n°29: Quantité de protéines dans les racines de Tomate traitées par différentes concentrations Cd.

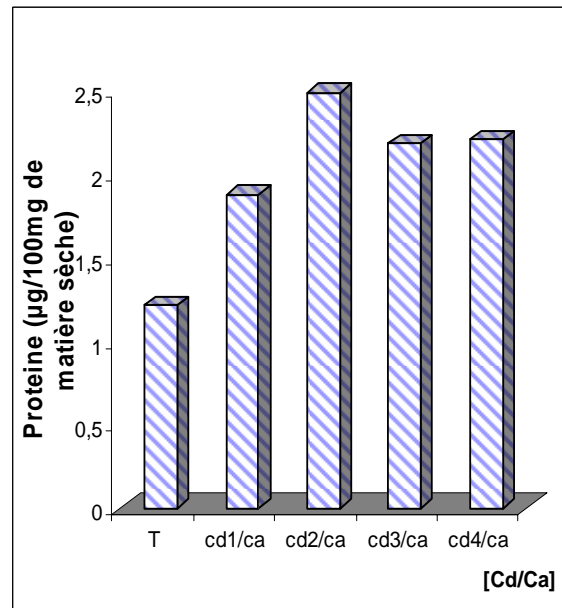


Fig n°30 : Quantité de protéines dans les racines de Tomate traitées par différentes concentrations Cd/Ca

D'après la figure 29 on observe une augmentation de la quantité de protéines en fonction des différentes concentrations du cadmium à l'exception de la dose Cd4. ces résultats ont été confirmés par l'analyse de variance qui a décelé des différences significatives entre les deux traitements.

Les mêmes observations ont été retenues pour l'effet de l'interaction Cd/Ca sur la quantité de protéine qui augmente légèrement en fonction des concentrations du métal qui atteint son maximum pour la dose Cd2/Ca, au delà de cette dernière ce même taux diminue (figure 30). Ces résultats ont été confirmés par l'étude statistique qui a révélé des différences non significative entre la quantité de protéine et la concentration du métal.

## 2.2. Effet du Cd et Cd/Ca sur les Chlorophylles

Les effets des deux types de traitements sont représentés sur les figures 31 et 32.

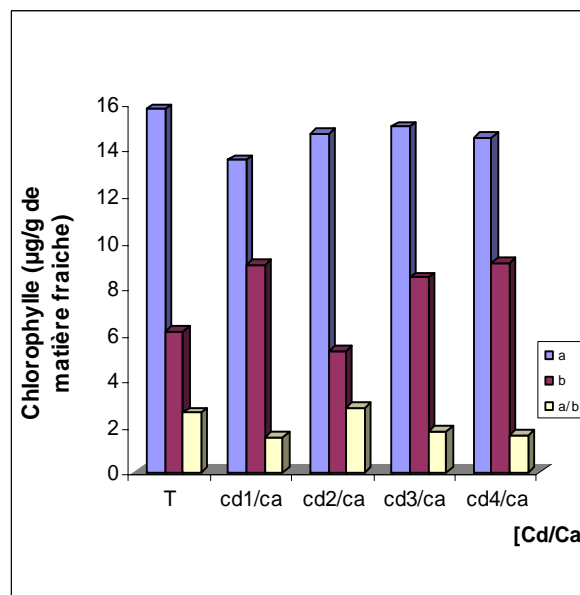
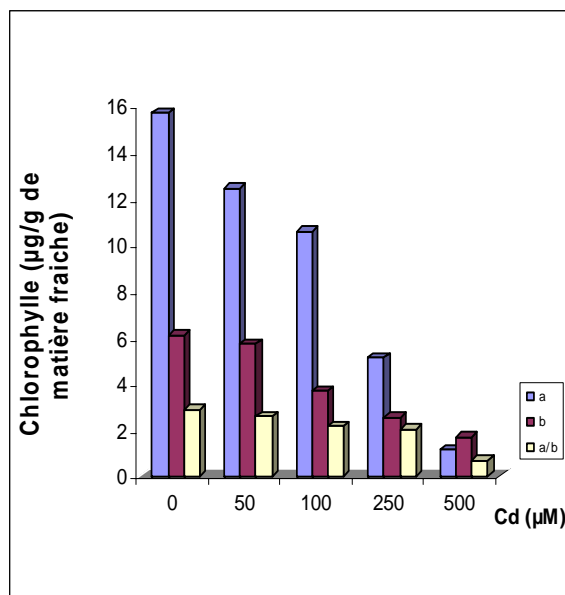


Fig n°31: Quantité de Chlo dans les feuilles de Tomate traités par différentes concentrations de Cd. Fig n°32 : Quantité de Chlo dans les feuilles de Tomate traités par différentes concentrations de Cd/Ca

Sur la figure 31 on constate que le taux de chlorophylle a est plus élevé que celui de la chlorophylle b ( $\approx 3$  fois) et du rapport a/b ( $\approx 4$  fois). Le traitement par le cadmium provoque une baisse progressive de ce taux qui atteint plus de 90% à la plus forte concentration. Cette baisse est aussi observée pour la chlorophylle b où elle atteint les 80% à la plus forte concentration de cadmium. Il en est de même pour le rapport a/b.

Avec l'ajout du calcium on constate que le taux de chlorophylle a sont pratiquement le même que celui des témoins et ne semble pas varié en fonction des différentes concentrations. Il en est de même pour la chlorophylle b et le rapport a/b (figure 32).

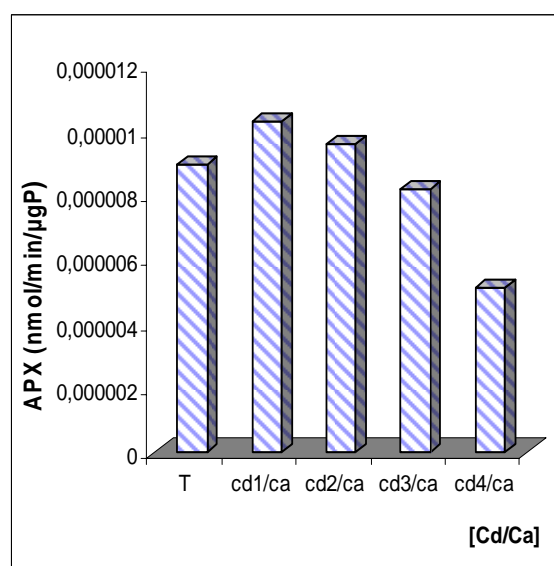
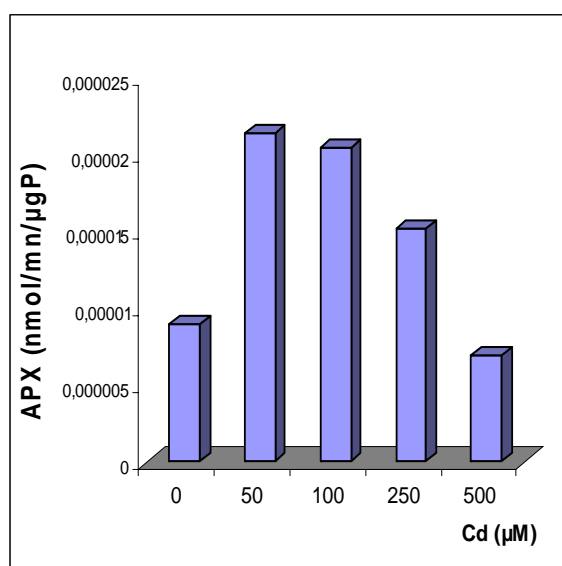
L'analyse de variance à deux facteurs contrôlés a décelé des différences hautement significatives entre les deux types de traitement en fonction des différentes concentrations pour la chlorophylle a et chlorophylle b.

## 2.3. Effet du Cd et Cd/Ca sur les Biomarqueurs

### 2.3.1. Dosages Enzymatiques

- **L'Effet du cadmium et interaction Cd/Ca sur l'activité Ascorbate Peroxydase (APX) :**

Sur la figure 33 on constate que le traitement par le cadmium aux faibles concentrations a tendance à stimuler l'activité enzymatique APX ( $\approx 2$  fois), alors qu'une baisse est observée à partir de la concentration Cd3. Ceci a été confirmé par l'analyse de variance qui a révélé des différences significatives (\*).

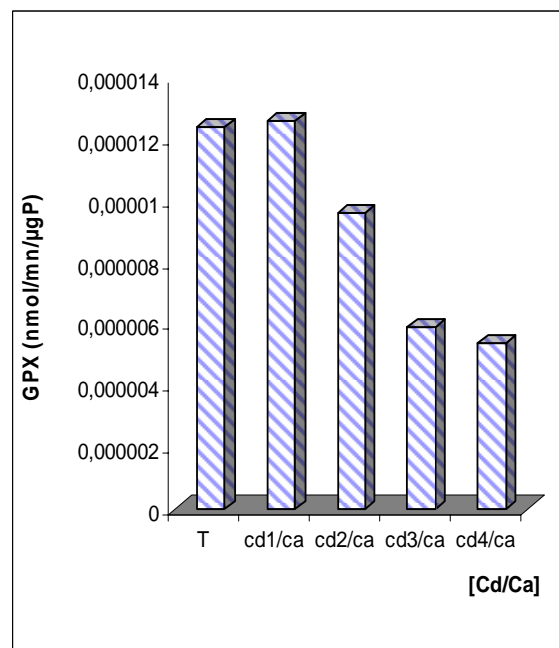
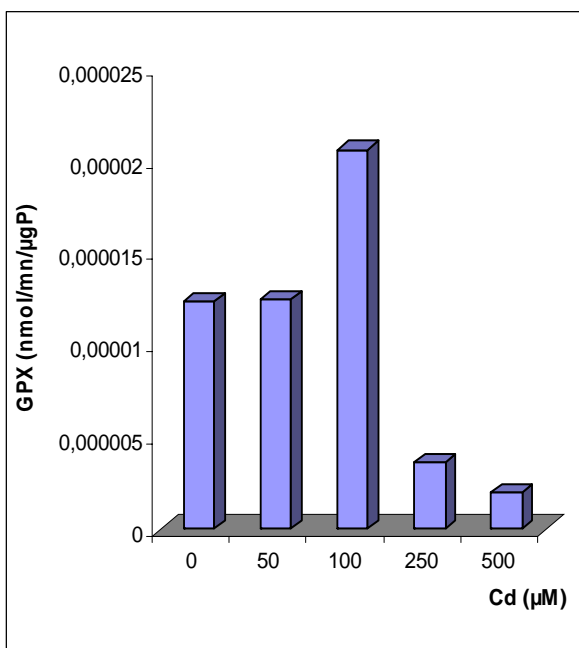


**Fig n°33: L'activité APX dans les racines de Tomate traités à différente concentration de cadmium.** **Fig n°34 : L'activité APX dans les racines de Tomate traités à différente concentration de Cd/Ca.**

En présence de calcium (1mM) associé au cadmium à différentes concentrations (figure 34), l'activité APX augmente pour des valeurs inférieures à 100μM et chute directement à partir de cette même dose sauf que ces dernières sont nettement inférieures à celles induites uniquement par le Cd. L'analyse statistique a décelé des différences significatives (\*) entre l'activité APX et concentration du métal induit.

▪ **L'Effet de cadmium et interaction Cd/Ca sur l'activité Guaiacol-peroxydase (GPX) :**

D'après la figure 35, l'activité GPX n'est sollicitée qu'aux faibles concentrations de cadmium alors que pour les autres (250, 500 $\mu$ M) elle est fortement inhibé. L'analyse statistique décele une régression significative (\*) entre l'activité GPX et la dose du métal dans la plante.

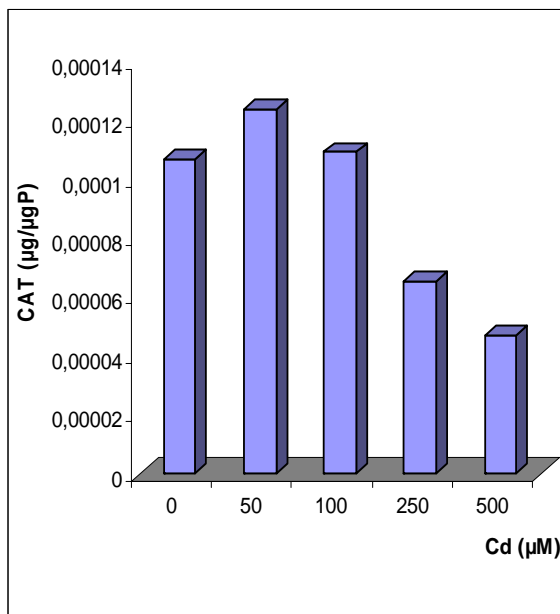


**Fig n°35: L'activitéGPX dans les racines de Tomate traités à différente concentration de cadmium.** **Fig n°36 : L'activité GPX dans les racines de Tomate traités à différente concentration de Cd/Ca.**

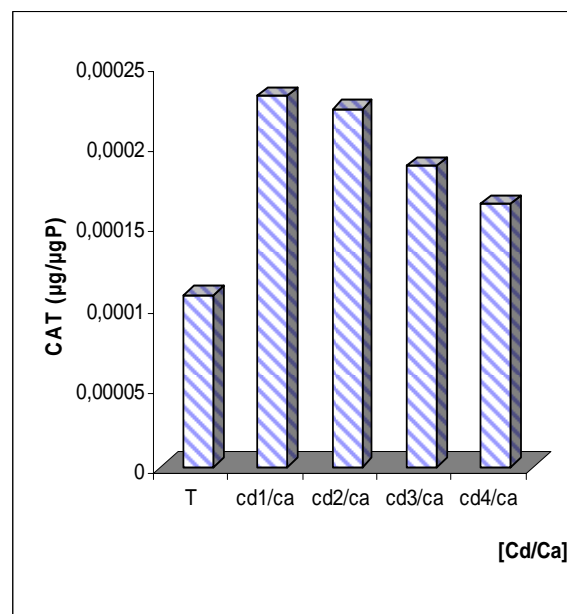
Pour la combinaison Cd/Ca (figure 36), on observe une croissance régressive significative (\*) de l'activité GPX par rapport au témoin et aux différentes concentrations.

▪ **Effet du Cd et Cd/Ca sur l'activité catalase (CAT)**

Les résultats obtenus de l'activité CAT en fonction des différentes concentrations de cadmium sont représentés sur la figure 37 et la combinaison Cd/Ca sur la figure 38.



**Fig n°37: L'activité CAT des racines de Tomate traités par différentes concentrations de cd.**



**Fig n°38: L'activité CAT des racines de Tomate traités par différentes concentrations de Cd/Ca.**

Les résultats du suivi de l'activité catalase, enregistré dans la figure 37, révèlent que cette dernière augmente légèrement par rapport au contrôle pour les deux premières concentrations (Cd1 et Cd2) alors qu'elle diminue progressivement pour les deux dernières (Cd3 et Cd4).

Parallèlement le traitement combiné Cd/Ca (figure 38) provoque une très forte augmentation de l'activité catalase et ce dès la première concentration de Cd/Ca, il en est de même pour toutes les autres. A la différence des résultats obtenus dans le cas du traitement par le cadmium seul, le traitement combiné semble présenter une activité catalase élevée de façon maintenue.

L'analyse de variance a décelé des différences très hautement significatives entre les racines traitées par le cadmium par rapport à ceux traités par l'interaction Cd/Ca.

▪ **Effet du Cd et Cd/Ca sur l'activité GST :**

Les données obtenues après dosage de l'activité spécifique GST exprimées en nmoles/min/μg de protéines mesurées au niveau des racines sont regroupées dans les figures 39 et 40.

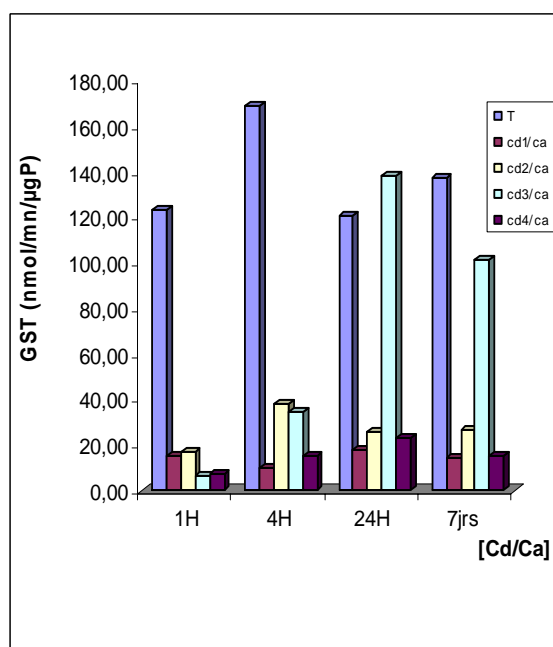
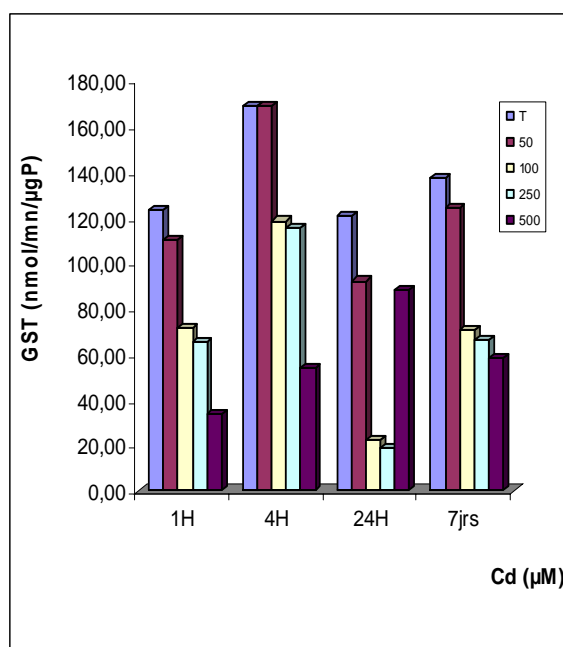


Fig n°39: L'activité GST dans les racines de Tomate traités à différente concentration de cadmium. Fig n°40: L'activité GST dans les racines de Tomate traités à différente concentration de Cd/Ca.

D'après la figure 39, on remarque que la GST diminue en fonction des différentes concentrations croissante du cadmium après 1h, 4h et 7jours. Alors qu'une induction apparente de la GST est observée à Cd4 (500μM) après 24heures du traitement. Ceci a été confirmé par l'étude de variance a deux facteurs contrôlés qui montre une différence hautement significative (\*\*) entre l'activité du GST et les concentrations du métal.



En présence de calcium (1mM), l'activité de la GST n'est pas apparente par rapport à celle induite par le Cd pour les trois doses (50, 100 et 500µM) alors qu'elle est très élevée pour Cd2/Ca après 24h du traitement (figure 40).

La comparaison entre l'activité GST induite par le Cd et la GST induit par l'interaction Cd/Ca montre une différence très hautement significative (\*\*\*) dans un intervalle de temps et en fonction des différentes concentrations du cadmium.

### 2.3.2. Dosage non Enzymatique : La GSH

Les résultats obtenus sont résumés dans les figures 41 et 42 qui représentent la variation de la quantité du GSH en fonction des différentes concentrations de cadmium dans un intervalle de temps (1h – 4h- 24h et 7jrs).

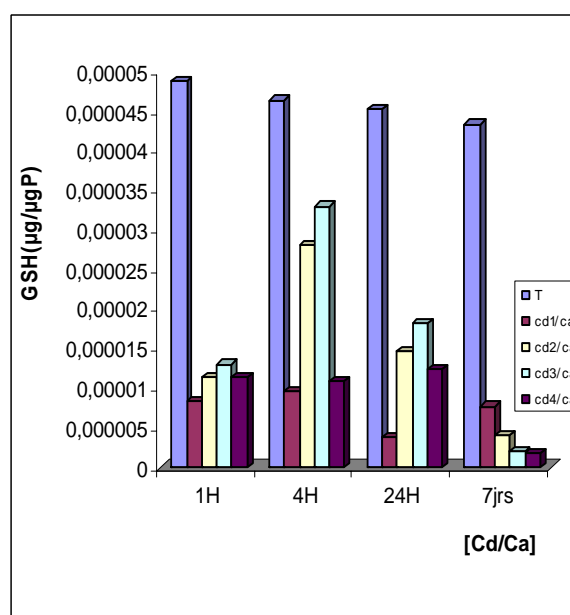
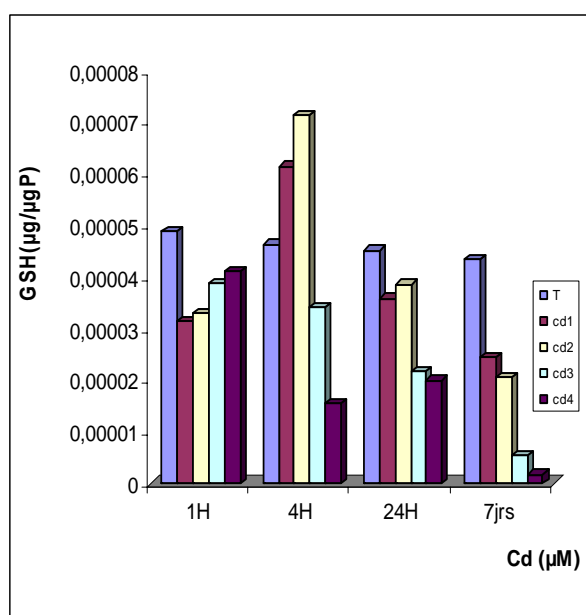


Fig n°41: L'activité GSH dans les racines de Tomate traités par différentes concentrations de cadmium. Fig n°42 : L'activité GSH dans les racines de Tomate traités par différentes concentrations de Cd/Ca.

Après 1h d'exposition seulement, on observe une légère évolution de la GSH en fonction des différentes concentrations de Cd, mais ces valeurs restent toujours inférieures au témoin (figure 41).

A partir de 24h de traitement, l'induction de la GSH est plus apparente pour les deux doses (50,100 $\mu$ M) par rapport au témoin alors que pour des doses supérieures (250, 500 $\mu$ M) la GSH diminue progressivement. Ces observations sont similaires à ceux obtenues après 24h et 7jours où la GSH atteint son minimum pour la plus forte concentration de Cd (500 $\mu$ M).

On peut conclure que la quantité de GSH subit une croissance régressive en fonction des différentes concentrations de cadmium par rapport au témoin à 7 jours du traitement.

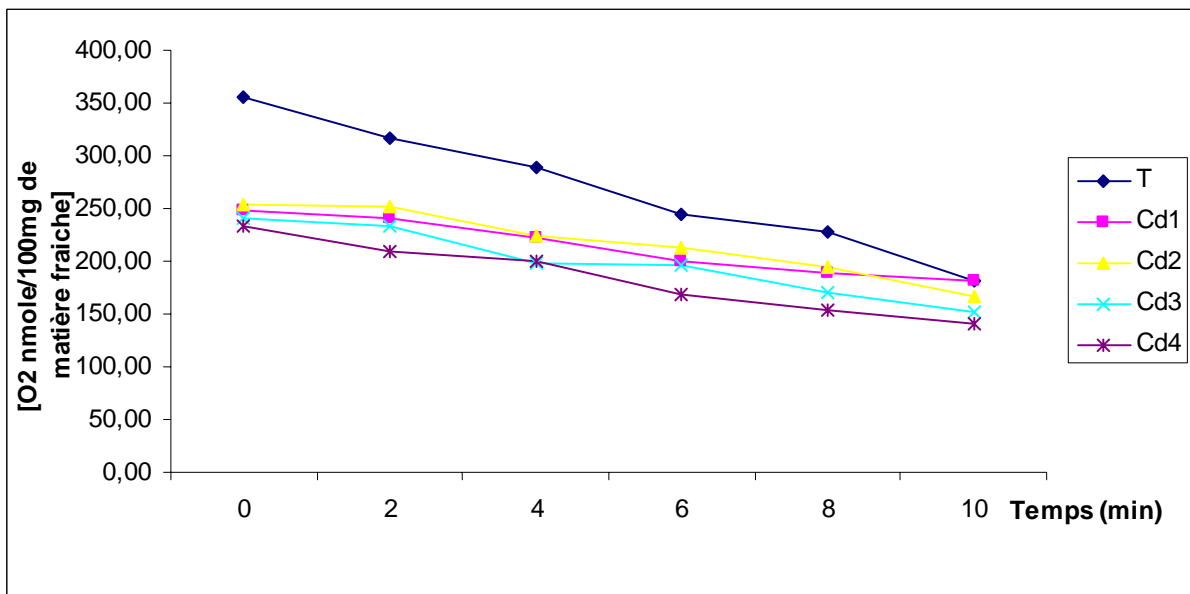
**Rq :** La quantité de glutathion synthétisé suit toujours une logique de croissance au cours des deux premiers temps (c-a-d 1<sup>ère</sup> et 4<sup>ème</sup> heures) et une chute après 24h.

En présence de l'interaction Cd/Ca<sup>+</sup>, l'induction de la GSH est similaire à celle induite uniquement par le Cd sauf que ces valeurs sont nettement inférieures. Ceci dit, qu'en présence de calcium le cadmium semble sans aucun effet sur l'activité GSH.

L'analyse de variance à deux facteurs contrôlés a révélé une différence hautement significative (\*\*\*) pour la variation de la GSH en fonction du temps et des différentes concentrations de Cd. Alors qu'elle est très hautement significative (\*\*\*) pour l'interaction Cd/Ca toujours en fonction du temps.

## 2.4. Effet du Cd et Cd/Ca sur le métabolisme Respiratoire

La figure 43 illustre l'effet du cadmium sur le métabolisme respiratoire après sept jours de traitement où on remarque une faible consommation d'O<sub>2</sub> pour les racines traitées à différentes concentrations de cadmium.



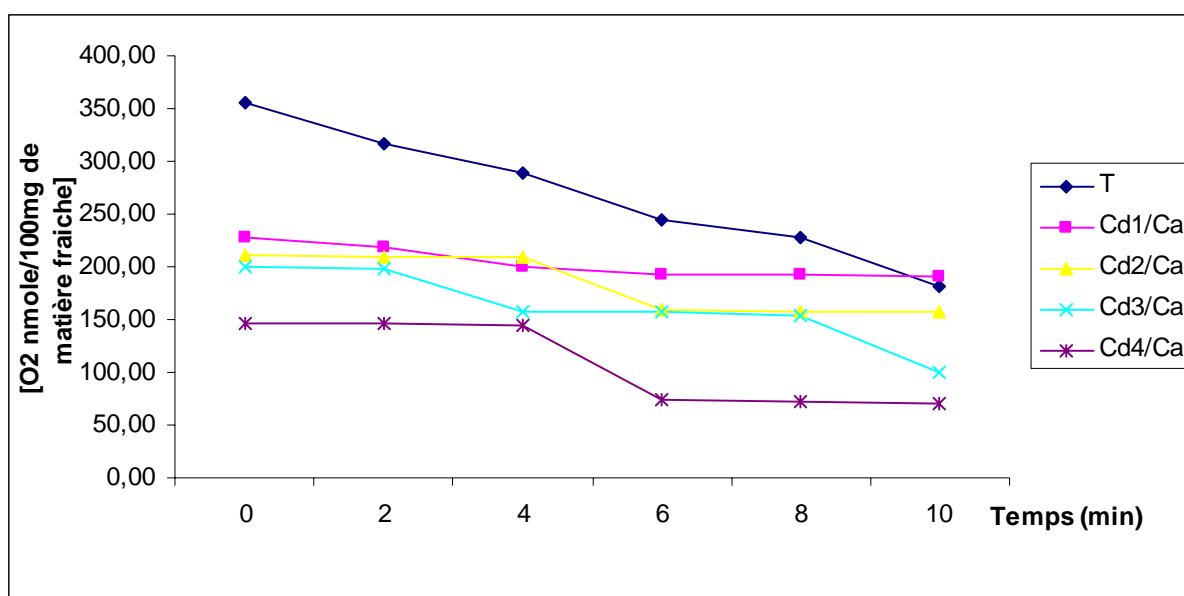
**Figure 43: Effet du Cadmium sur le métabolisme respiratoire après 7 jours de traitement**

On constate que les racines témoins présentent une respiration tout à fait normale avec une consommation d'O<sub>2</sub> proportionnelle au temps de mesure. Le traitement par les différentes concentrations de cadmium montre que le métabolisme respiratoire est fortement inhibé par rapport au témoin.

L'analyse de variance à deux critères contrôlés a révélé des différences très hautement significatives entre la consommation d'oxygène et la concentration croissante du cadmium par rapport au contrôle et en fonction du temps.

Parallèlement la présence de calcium (figure 44) montre que la respiration des racines est inhibée par la présence de cadmium et ce quelque soit la concentration de ce composé.

Il ressort de ces résultats que le cadmium même à très faible concentration et en présence de calcium perturbe sensiblement et de façon importante la respiration des racines isolées des plants de tomate.

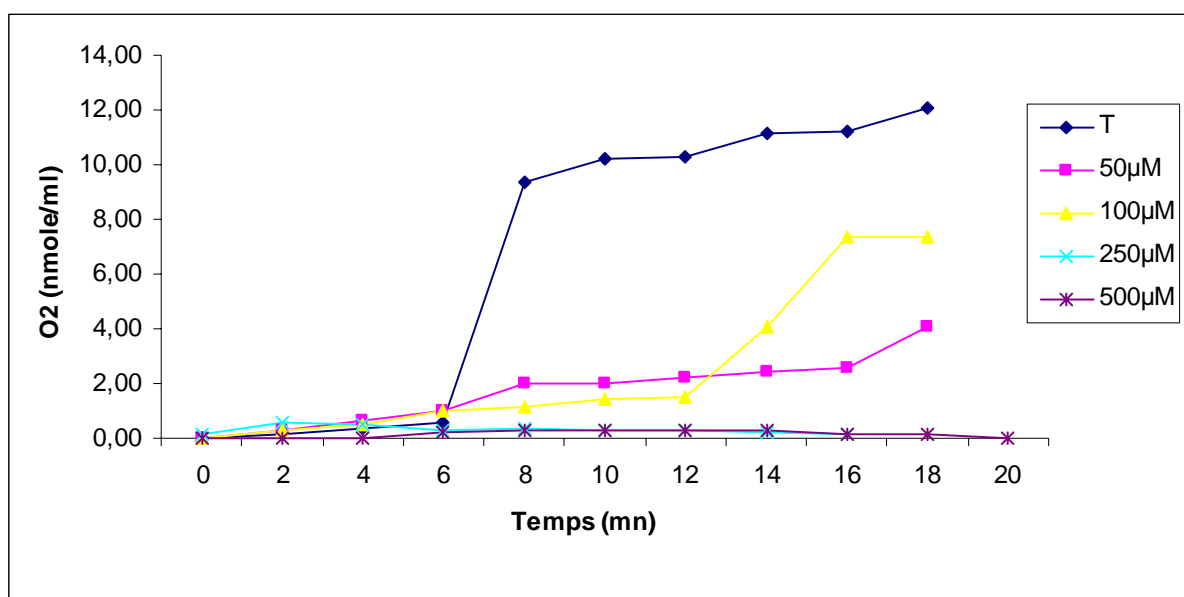


**Figure 44 : Effet du Cd/Ca sur le métabolisme respiratoire après 7 jours de traitement**

L'analyse de variance à deux critères contrôlée a révélé des différences très hautement significative entre la consommation d'oxygène et la concentration croissante du Cd/Ca par rapport au contrôle et en fonction du temps et le taux d'oxygène consommé entre les deux traitements en fonction du temps et la dose du métal.

## 2.5. Effet du Cd et Cd/Ca sur le métabolisme photosynthétique

La figure n°45 illustre l'effet du cadmium sur le métabolisme photosynthétique après sept jours de traitement où on remarque une libération d'O<sub>2</sub> dans le milieu pour les plants traités à différentes concentrations de cadmium.



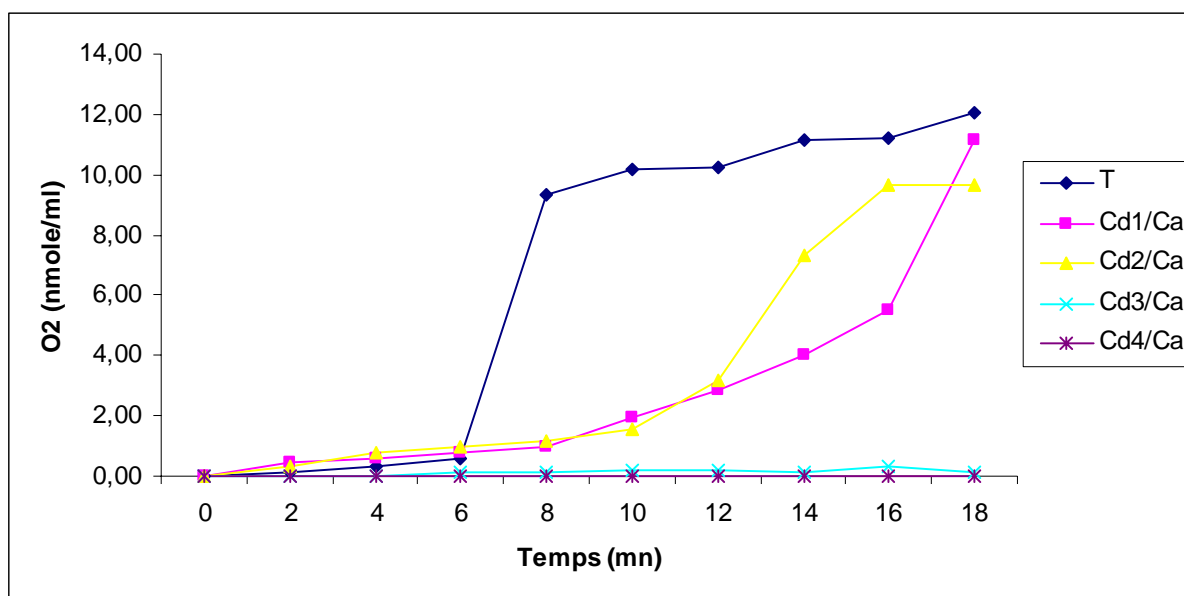
**Figure 45 : Effet du Cadmium sur le métabolisme photosynthétique après 7 jours de traitement**

On observe une faible augmentation de la quantité d'O<sub>2</sub> dans le milieu dès la 6<sup>ème</sup> minute d'enregistrement pour les faibles concentrations de cadmium mais reste largement inférieure à celle du contrôle. Alors que la photosynthèse est inhibée pour les deux autres concentrations (250 et 500µM).

L'analyse de variance à deux facteurs contrôlés a révélé des différences très hautement significatives entre la photosynthèse et les concentrations croissantes du cadmium en fonction du temps.

Dans le cas du traitement combiné Cd/Ca, on constate que les niveaux enregistrés chez les témoins et ceux traités par 50 et 100 $\mu$ M finissent par se rejoindre après 18 minutes d'enregistrement. Ceci n'est pas le cas des fortes concentrations de cadmium.

Il faut noter que l'effet observé pour le traitement combiné apparaît tardivement à partir de la 10<sup>ème</sup> minute d'enregistrement.



**Figure 46 : Effet du Cd/Ca sur le métabolisme photosynthétique après 7 jours de traitement**

L'analyse de variance à deux critères contrôlés a révélé des différences très hautement significatives entre la consommation d'oxygène et la concentration croissante du Cd/Ca par rapport au contrôle et en fonction du temps.

Dans ce dernier chapitre nous nous proposons de procéder à une discussion générale des principaux résultats obtenus dans notre travail. Cette discussion sera composée de deux parties, une première partie qui concerne les effets du cadmium et de la combinaison Cd/Ca *in vivo* (en plein champ) et une deuxième partie concerne les effets du cadmium et de la combinaison Cd/Ca *in vitro* (en laboratoire).

#### **A/ Effets du cadmium et du traitement combiné Cd/Ca *in vivo***

Concernant les traitements en plein champ, les résultats semblent répondre parfaitement à la curiosité qui nous a poussés à dégager une plate forme de renseignement agronomique pouvant amplifier les résultats de notre expérience.

Les résultats obtenus montrent que le traitement par le cadmium n'affecte pas sensiblement la croissance des plants de la tomate, il est important de noter dans ce cas de traitement par les différentes concentrations de cadmium utilisées ne reflètent pas celles au contact des racines des plants en raison de leur dissipation dans le sol. Des études similaires ont été réalisées *in vitro*, qui vont dans le sens contraire de nos résultats, montrent que le cadmium a tendance à affecter sensiblement les paramètres de croissance (Chugh et Sawhney, 1995 ; Herrieche, 2004). Lors de leur croissance les plants de tomate utilisent les composés disponibles au niveau de leurs racines, la dissipation de concentration de cadmium dans le sol fait qu'une quantité infime amené au contact de racines des plants. Cette faible quantité va légèrement influencer la croissance des plants. L'ajout de calcium lors du traitement combiné augmente la concentration disponible aux cellules des racines. Il faut noter que le  $\text{Ca}^+$  est un élément majeur pour la croissance des cellules (Farago, 1994). Il joue un rôle dans l'activation et la régulation de plusieurs processus cellulaires (Coverso et Ferrandez 1996 ; Slorzynskva-Polit et *al.*, 1998).

Ainsi nos résultats montrent que l'ion Ca ajouté au Cd reste sans effet significatifs sur la croissance des plants de tomate. Ce constat est confirmé par les résultats obtenus par Slorzynskva-Polit et *al.*, (1998).

Le nombre de bouquet de fleur et le nombre de fleur est nettement supérieur au contrôle pour des faibles concentrations de cadmium car celles-ci ne perturbent pas l'absorption minérale responsable de la croissance des plants ; alors que ces deux paramètres diminuent à des doses supérieures à 100µM. Le résultat du traitement combiné Cd/Ca montre une nette amélioration pour les doses inférieures à 100µM. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Oncel et *al.*, 2000 ; Chen et *al.*, 2003 et Sbartai et *al.*, 2007.

Le taux de nouaison est la capacité de la fleur à se transformer en fruit. Ce phénomène est considéré comme trop faible pour les différentes concentrations de cadmium et cadmium/calcium par rapport au contrôle. Sachant que ce paramètre est lié directement à la nature de nutrition. Nos résultats confirment cette hypothèse et vont avec ceux obtenus par Zoghلامي et *al.*, (2006) chez *Lycopersicon esculentum* où l'accumulation et la distribution de certains oligo-éléments dans les tissus de la plante dépendent de l'intensité de stress et la nature de l'organe cible. Dans ce cas de figure, le Cd induit la réduction de la teneur en Fer et Mn et contribue ainsi à la restriction de certains macroéléments.

Le nombre moyen des fruits des plants traités au cadmium, à faibles concentrations, est légèrement supérieur au contrôle, au-delà de ces doses ce même paramètre régresse. La même chose est observée en cas d'addition de calcium. Ceci est lié au taux d'avortement des fleurs qui est à son tour lié à plusieurs facteurs d'origine intravariétale et extravariétale. Dans notre expérimentation ce paramètre est jugé très élevé provoquant ainsi de fortes pertes en terme de rendement. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que l'accumulation de ce xénobiotique dans la plante serait à l'origine de l'inhibition du développement des fleurs et ceux en stimulant de façon importante la synthèse de



certaines hormones (Ethylène) utilisé dans le phénomène de détoxification (Heller *et al.*, 2000)

Le poids moyen de fruit demeure en général une valeur propre à chaque variété sauf en cas d'une mauvaise conduite de culture. Nos résultats montrent que le traitement par le cadmium réduit sensiblement ce paramètre. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que le cadmium induit une forte réduction de l'extensibilité des parois membranaires, de la conductibilité de l'eau et du potentiel osmotique (Oncel *et al.*, 2000). Ainsi tout le métabolisme correspondant au développement du fruit est aussi fortement réduit se traduisant alors par une perte du poids moyen des fruits (Prasad, 1995). Ce résultat est en accord avec ceux obtenus par Leita *et al.*, (1991). Le calcium ajouté au cadmium interfère ainsi avec ce dernier pour les mêmes sites d'absorption membranaire (Zoghlami *et al.*, 2006).

D'après nos résultats nous pouvons dire en générale que la production moyenne par plants et par conséquent le rendement restent faible pour les deux traitements par rapport au contrôle. Ceci est expliqué par un faible taux de nouaison associé à un pourcentage élevé du taux d'avortement du a une mauvaise nutrition minérale induite par l'addition de cadmium.

Pour les paramètres de qualité nos résultats semblent être très intéressants. Les valeurs obtenues de l'indice de réfraction (IR) montrent une légère augmentation en fonction des concentrations croissante du cadmium mais reste toujours inférieur au contrôle. Alors que l'IR des fruits traités par Cd/Ca présente des valeurs supérieures au témoin avec un maximum de 7,5 chez Cd3Ca, ce qui se traduirait par un meilleur maintien et une prédisposition des fruits traités à la conserverie.

Selon Montigaud et *al* (1983), le pH est un paramètre qui a son importance car il permet la sécurité de la maintenance de la conserve. La tomate doit toujours avoir un pH inférieur à 4,5 ceci est conforme à nos résultats ( $4,26 < \text{pH} < 4,49$ ). Donc le stress oxydatif n'affecte pas l'acidité des fruits. L'ajout du calcium aux différentes concentrations de cadmium montre ainsi peu d'effet.

Concernant la teneur en acidité totale le cadmium semble plutôt influencer sensiblement ce paramètre puisque une augmentation de celui-ci est observée aux faibles concentrations cependant l'accumulation du cadmium semble traduire une chute de ce paramètre sans pour autant atteindre des valeurs à 35% (Miladi, 1970).

En conclusion, le traitement par le cadmium aux faibles concentrations *in vivo* semble affecter positivement tout les paramètres morphologiques des plants de tomate. Le cadmium à faible concentration semble plutôt activer certains processus métabolique intervenant dans la croissance et le développement des plants de tomate.

Inversement, le traitement par les fortes concentrations de cadmium semble perturber voir inhiber ces processus et ce suite d'abord à sa pénétration massive à l'intérieur des plants (tissus) puis l'activation de tous les processus intervenant dans sa bioaccumulation et donc se traduisant par conséquent par sa toxicité.

L'ion calcium ajouté aux différentes concentrations de cadmium semble interférer à ce dernier. On effet les deux composés sont très proche sur le plan de leur structure spatiale et présente des groupements très semblables ce qui les rend très compétitifs au niveau des sites d'activation.

Dans notre travail le calcium joue pratiquement le même rôle que le cadmium se traduisant ainsi tantôt par les mêmes effets tantôt par des effets contraires. Cependant, il semble claire que la compétition cadmium/ calcium in vivo reste en faveur du cadmium.

### **B/ Effets du cadmium et du traitement combiné Cd/Ca in vitro**

Cette présente étude montre le rôle important que joue le système de défense dans l'accumulation et la tolérance au cadmium chez la racine de *Lycopersicon esculentum*. L'ensemble de ces résultats nous ont amené logiquement à formuler certaines hypothèses sur le comportement de cette dernière face à un stress oxydatif généré par l'addition du CdCl<sub>2</sub> et la combinaison CdCl<sub>2</sub> / CaCl<sub>2</sub>.

Nos résultats montrent une augmentation de la quantité de protéine dans les racines de tomate en présence des différentes concentrations de CdCl<sub>2</sub> mais également de CaCl<sub>2</sub> ceci s'expliquerait par le fait que la présence de xénobiotique à l'intérieur des tissus stimule la synthèse protéiques de nombreuses enzymes entre autres celles intervenant dans la détoxification ceci est en parfaite accord avec les résultats de Shradha Singh *et al*, (2004) qui montre que l'accumulation des protéines dans les racines et les feuilles de tomate est proportionnelle à celle du métal. Plus loin Chaoui, (1997) montre que la quantité de protéine est non affectée, dans les parties stimulées, par le Cd et le Zn chez *Phaseolus vulgaris*. D'autres travaux (Wollgieh et Newmann, 1995) reportent l'induction des protéines spécifique au choc thermique sous l'effet d'un stress métallique qui montre leur rôle dans la réponse adaptative.

Stalt *et al.*, (2003) indiquent que l'exposition des plants à différentes concentrations de cadmium a tendance à provoqué une augmentation de la synthèse des protéines particulièrement des phytochélatines dont le rôle est la détoxification. Ces mêmes auteurs rapportent que près de 80% du xénobiotique est détoxifié par ce type de protéines.

Le Dosage de la chlorophylle dans les feuilles de tomate exposées au Cadmium montre une forte diminution de sa quantité en fonction des différentes concentrations du métal ce qui confirme les résultats de Gallego et *al.*, (1996), Moustakas et *al.*, (1997) et Singh et *al.*, (2004) qui rapportent une dégénération fréquente de la quantité de chlorophylle et caroténoïdes chez les plantes exposés a différentes concentrations du métaux lourds. Clijsters et *al.*,(1999) et Sanita di Toppi et *al.*,(1998) expliquent cette régression par l'existence d'un dommage oxydatif et les perturbations des potentiels électrochimiques ( $\Delta_{\mu}H^+$  et  $\Delta\Psi$ ) induit par l'accumulation des métaux lourds.

D'autres auteurs (Van Assche et Clisters, 1990 ; Farago, 1994 ; Oncel et *al.*, 2000) rapportent que le cadmium pourrait empêcher la formation du complexe photoactif **photochlorophyllide- NADPH- Enzyme** en inhibant l'enzyme protochlorophyllide réductase ou encore la  $\gamma$ -aminolévalinique déshydrogénase et ce suite à l'interaction du Cadmium aux groupements thiols (SH) des enzymes.

#### **L'effet du cd et Cd/Ca sur les Bio marqueurs (Enzymatiques et non enzymatiques)**

L'accumulation de Cd dans les racines contaminée de tomate est accompagnée par l'induction du niveau des biomarqueurs tel que le Glutathion, GPX, APX, CAT et GST.

Les peroxydases sont des hémoprotéines avec un groupement prosthétique héminique : la Ferro proto porphyrine IX, 3 (Bergneyer, 1974 ; Farago, 1994 ). Ce sont des oxydo réductases glycoprotéiques qui catalysent l'oxydation de nombreux composés organiques et inorganiques par le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ).

Dans notre étude l'activité GPX enregistrée est légèrement élevée aux faibles doses, ces résultats corroborent avec ceux de (Hegedàs et *al.*, 2001 ; Milane et *al.*, 2003) qui montre que l'induction de la GPX constitue une réponse de la plante au stress oxydant induit par le xénobiotique (F. Van Assche et *al.*, 1984 et 1988 ; F. Van Assche et *al.*, 1986 ; J. Weckx et *al.*, 1993 ; J. Vangronsveld et *al.*, 1993 ; Naffaa et *al.*, 1999).

L'activité APX, enzyme très important dans le système de défense, induit une réponse aux différents traitements de Cd chez les racines de Tomate. L'APX protège la cellule contre les dommages oxydatives par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> toxique.

L'augmentation de l'activité APX sous stress oxydative engendrée par le Cd montre bien son rôle dans l'élimination de l'eau oxygénée (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) formée suite à l'accumulation du Cd dans les racines de la tomate. L'APX réduit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en eau en utilisant l'ascorbate comme donneur d'électron qui résulte de la dehydroascorbate. Il est recyclé en ascorbate qui utilise la GSH comme donneur d'électron et le Glutathion oxydé (GSSG) est converti en GSH par NADPH qui dépend de l'enzyme glutathion réductase (Asada et Takahashi, 1987). Nos résultats sont comparables à ceux obtenus par (Kampfenkel et *al.*, 1995 ; Weckx et Clijsters, 1996 ; Patra et Panda, 1998 ; Prasad et *al.*, 1999 ; Rucinska et *al.*, 1999 et Gallego et *al.*, 2002) sur l'activité APX. La stimulation de cette enzyme traduit bien la mise en place chez les cellules des plants traités un état de tolérance.

Au cours de notre étude, nous avons remarqué que lorsque les plants sont soumis à un stress chimique, la GSH et l'activité GST semblent être sensibles et répondent rapidement à la présence du polluant.

Le dosage des taux de GSH dans les plants traités par le Cd suggère la participation active de cet élément dans la détoxification des espèces réactive à oxygène générés par le Cd. Ce résultat est confirmé aux observations rapportées par Asada et Takahashi, 1987.

Nos résultats sont aussi en accord avec ceux de Zhu et *al.*, 1999 ; Cao et *al.*, 2004 et Freeman et *al.*, 2004 chez lesquelles le niveau de GSH est rehaussé avec l'augmentation de la tolérance à l'accumulation du Cd pour des faibles concentrations, et aussi avec celles observées par Gallego et *al.*, 1996 ; Nagalakshmi et Prasad, 2001 ; Ducruix et *al.*, 2006, où le niveau de GSH diminue en réponse au stress induit par les fortes concentrations de Cd.

Concernant les taux de GST (glutathion S-transférase), nos résultats traduisent un phénomène de résistance aux métaux lourds, ce qui suggère que cette variabilité devrait être due en partie au degré selon lequel les organismes peuvent détoxifier ces métaux aux différents stades de leur cycle vital.

Toutefois les valeurs obtenues chez les plants traités par la combinaison Cd/Ca a différentes concentration, sont inférieurs a celles observées sous l'effet du Cd. Cependant la combinaison Cd/Ca nous a permis de mettre en évidence le rôle protecteur que jouent cet ion et son action dans la défense des cellules vis-à-vis du cadmium. Ces résultats appuient ceux de Bernal et Ruvalcaba (1996) et Fellenberg (2000) qui stipulent que le  $Ca^{++}$  bloque l'absorption des métaux toxiques en entrant en compétition avec ces derniers au niveau des différents récepteurs cellulaires.

La catalase qui est localisé essentiellement dans le peroxyosome, participe dans dégradation de  $H_2O_2$  généré par le cadmium (Foyer et *al.*, 1994).

Dans notre travail on constate que l'activité de cette enzyme augmente aux faibles concentrations de cadmium pour chuter ensuite aux fortes concentrations. Ceci pourrait s'expliquer par le fait qu'aux faibles concentrations de cadmium, il y a déclenchement des systèmes de détoxification qui pour la plus part sont formés d'enzymes dont principalement la catalase. Ceci permet ainsi à la plante de tolérer puis de s'adapter au xénobiotique se traduisant ainsi par une augmentation de ces enzymes (CAT). Aux fortes concentrations de cadmium, les systèmes en question sont dépassés et les enzymes sont complètement inhibées ceci est en parfait accord avec les travaux de Chaoui et *al.*, (1997) et Cho et Park, (2000).

#### **Effet du Cd et Cd/Ca sur les métabolismes respiratoires et photosynthétiques**

Concernant la Respiration, nous avons remarqué que le traitement des racines isolées de tomate réduit fortement l'activité respiratoire. Cette inhibition serait d'une part due à la présence des ROS qui sont connus comme éléments perturbateurs aussi bien du métabolisme respiratoire que de la photosynthèse (Kiss et *al.*, 2003 ; Kuciel et Mazurkiewicz, 2004 ) et d'autre part elle pourrait être expliquée par le passage rapide du cadmium à l'intérieur des racines. On effet, il a été montré qu'au niveau des racines de blé dur certains canaux calciques voltage dépendant de la membrane plasmique connus sous l'appellation (RCA) et qui contrôlent  $\Delta\Psi$  membranaire, sont perméable au cadmium et ceux en absence de  $Ca^{++}$  (Whit, 2000). Cette pénétration rapide du cadmium entraîne une forte perturbation de la chaîne respiration plus précisément au niveau du site responsable de l'oxydation des substrats provenant du cycle de Krebs. Le cadmium peut ainsi inhiber certains enzymes déshydrogénase et les NADPH-dépendants.

Cependant, pour le traitement combiné, nous pensons que les ions  $Cd^{2+}$ , se substituerait aux ions  $Ca^{2+}$  (compétition pour les sites de fixation) se traduisant par l'inhibition du métabolisme respiratoire aux fortes concentrations.

Le métabolisme photosynthétique suit des fluctuations en fonction des différentes concentrations du métal. A de faibles concentrations de Cadmium et Cd/Ca, la photosynthèse reste active mais toujours inférieure à celle du contrôle contrairement aux fortes concentrations où elle est inhibée. Nos résultats corroborent avec ceux obtenus par Israr *et al.*, (2006).

Il est connu que les photosynthétats frais ont une influence bien plus nette sur le métabolisme énergétique que les photosynthétats de réserve (Leclerc, 1999). Ainsi les fluctuations observées dans notre travail pourraient s'expliquer par deux hypothèses : Soit le cadmium affecte un composé lumière-dépendant relié à la photosynthèse, soit l'un des photosynthétats frais jouerait un rôle dans la tolérance des plants au cadmium et confère ainsi à la lumière une protection relative (Israr *et al.*, 2006).

En conclusion, l'ensemble des résultats obtenus dans notre travail comparé à ceux rapportés dans la littérature nous permettent de suggérer l'hypothèse suivante :

En présence de cadmium deux situations peuvent se présenter :

- Les faibles concentrations de Cd induiraient chez les racines traitées une situation de stress oxydatif à laquelle ces dernières répondraient par une stratégie de tolérance se traduisant par un emprisonnement du Cadmium par vacuolisation suivie par une dilution du xénobiotique. Cet état se traduirait sur le plan physiologique par un ralentissement et une réduction de tous les paramètres morpho physiologiques. Après dilution du cadmium, une reprise des paramètres serait possible. Dans ce cas de figure aucune activité enzymatique ne serait perturbée.

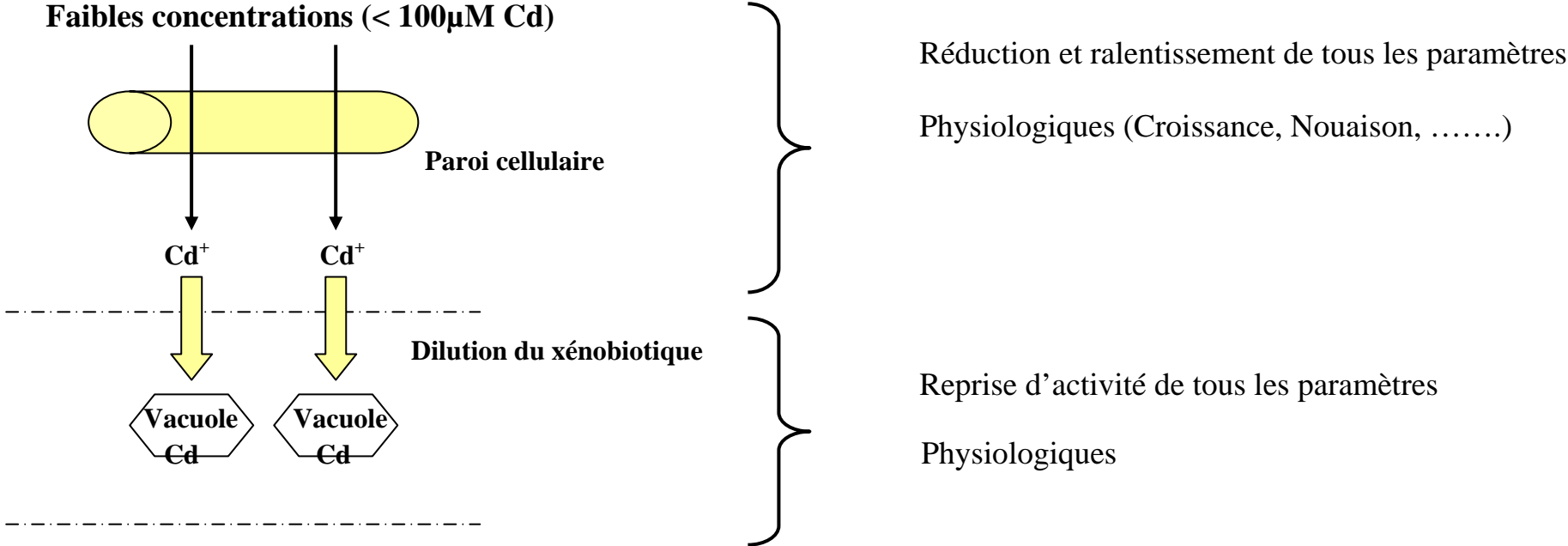


- Les fortes concentrations de cadmium déclencheraient en plus du système de défense classique (vacuolisation), une forte synthèse de protéines suite à l'attaque des lipides membranaires par le cadmium (peroxydation des lipides) générant des ROS ( $H_2O_2$ ). La stimulation de la synthèse des protéines est traduite par l'induction de plusieurs systèmes de détoxifications : (APX, GPX, CAT, GST et GSH) ; ces derniers se chargeraient du captage des ROS et leurs inactivation.

Ajouté à cela et toujours dans cette optique, les ROS générés pourraient agir sur les organites subcellulaires tels que les mitochondries et chloroplastes en inhibant la respiration et la photosynthèse de ces mêmes systèmes. Cette inhibition serait la conséquence d'un découplage de la phosphorylation oxydative chez les mitochondries et photo peroxydation des lipides membranaires chez les chloroplastes.

*Etude in vitro*

*Etude in vivo*

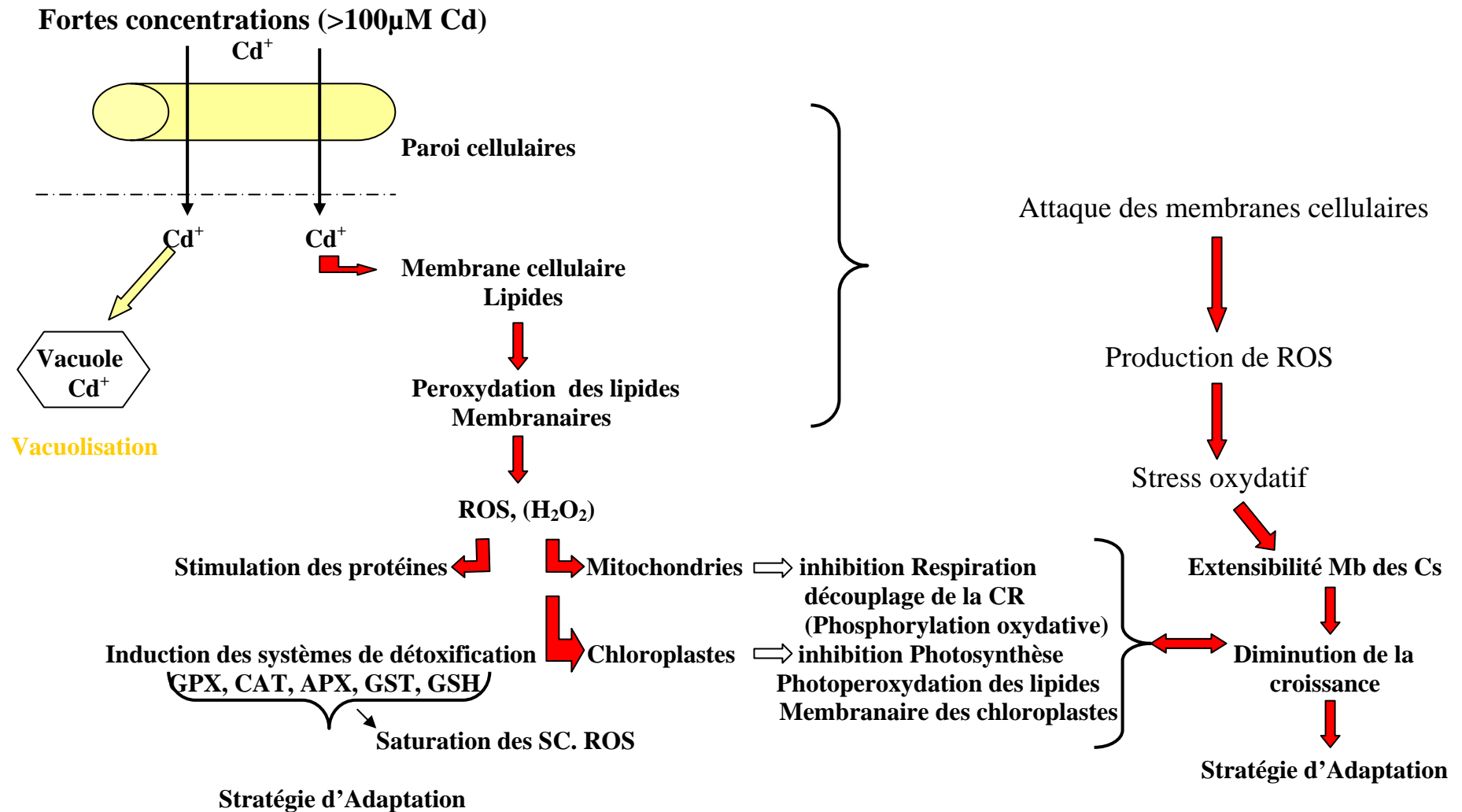


Dans ce cas là ➡ Effet réversible du Cd<sup>+</sup>

➡ Faible de perturbation du système enzymatique

Tolérance des Cellules (Plants)

**Fig n°47 : Hypothèse représentant la stratégie adoptée par les cellules racinaires de plants de tomate Traitées par de faibles concentrations de Cd (<100µM).  
Stratégie de tolérance (Sbartai et Djebar, 2008)**



**Fig n°48 : Hypothèse représentant la stratégie adoptée par les cellules racinaires de plants de tomate Traitées par de fortes concentrations de Cd (>100µM).  
Stratégie d'Adaptation (Sbartai et Djebar, 2008)**

### ANOVA à un facteur contrôlé : NBF en fonction de TRAIT

| Analyse de variance pour NBF |    |       |      |      |       |
|------------------------------|----|-------|------|------|-------|
| Source                       | DL | SC    | CM   | F    | P     |
| TRAIT                        | 1  | 78,4  | 78,4 | 1,62 | 0,238 |
| Erreur                       | 8  | 386,0 | 48,3 |      |       |
| Total                        | 9  | 464,4 |      |      |       |

IC individuel à 95% pour la moyenne  
Basé sur Ecart-type groupé

Ecart-type groupé = 6,946

### ANOVA à deux facteurs contrôlés : NBF en fonction de TRAIT; DOSE

| Analyse de variance pour NBF |    |        |       |       |       |
|------------------------------|----|--------|-------|-------|-------|
| Source                       | DL | SC     | CM    | F     | P     |
| TRAIT                        | 1  | 78,40  | 78,40 | 9,92  | 0,035 |
| DOSE                         | 4  | 354,40 | 88,60 | 11,22 | 0,019 |
| Erreur                       | 4  | 31,60  | 7,90  |       |       |
| Total                        | 9  | 464,40 |       |       |       |

### ANOVA à deux facteurs contrôlés : NF en fonction de TRAIT; DOSE

| Analyse de variance pour NF |    |      |     |      |       |
|-----------------------------|----|------|-----|------|-------|
| Source                      | DL | SC   | CM  | F    | P     |
| TRAIT                       | 1  | 449  | 449 | 0,87 | 0,403 |
| DOSE                        | 4  | 2894 | 724 | 1,41 | 0,375 |
| Erreur                      | 4  | 2060 | 515 |      |       |
| Total                       | 9  | 5403 |     |      |       |

### ANOVA à un facteur contrôlé : NF en fonction de TRAIT

| Analyse de variance pour NF |    |      |     |      |       |
|-----------------------------|----|------|-----|------|-------|
| Source                      | DL | SC   | CM  | F    | P     |
| TRAIT                       | 1  | 449  | 449 | 0,72 | 0,419 |
| Erreur                      | 8  | 4954 | 619 |      |       |
| Total                       | 9  | 5403 |     |      |       |

IC individuel à 95% pour la moyenne  
Basé sur Ecart-type groupé

Ecart-type groupé = 24,88

### ANOVA à un facteur contrôlé : NF en fonction de DOSE

| Analyse de variance pour NF |    |      |     |      |       |
|-----------------------------|----|------|-----|------|-------|
| Source                      | DL | SC   | CM  | F    | P     |
| DOSE                        | 4  | 2894 | 724 | 1,44 | 0,344 |
| Erreur                      | 5  | 2509 | 502 |      |       |
| Total                       | 9  | 5403 |     |      |       |

IC individuel à 95% pour la moyenne  
Basé sur Ecart-type groupé

Ecart-type groupé = 22,40

### ANOVA à un facteur contrôlé : NFR en fonction de TRAIT

Analyse de variance pour NFR

| Source | DL | SC    | CM   | F    | P     |
|--------|----|-------|------|------|-------|
| TRAIT  | 1  | 11,1  | 11,1 | 0,69 | 0,431 |
| Erreur | 8  | 129,5 | 16,2 |      |       |
| Total  | 9  | 140,6 |      |      |       |

IC individuel à 95% pour la moyenne  
Basé sur Ecart-type groupé

Ecart-type groupé = 4,023

### ANOVA à un facteur contrôlé : NFR en fonction de DOSE

Analyse de variance pour NFR

| Source | DL | SC     | CM    | F    | P     |
|--------|----|--------|-------|------|-------|
| DOSE   | 4  | 120,79 | 30,20 | 7,63 | 0,023 |
| Erreur | 5  | 19,80  | 3,96  |      |       |
| Total  | 9  | 140,59 |       |      |       |

IC individuel à 95% pour la moyenne  
Basé sur Ecart-type groupé

Ecart-type groupé = 1,990

### ANOVA à deux facteurs contrôlés : NFR en fonction de TRAIT; DOSE

Analyse de variance pour NFR

| Source | DL | SC     | CM    | F     | P     |
|--------|----|--------|-------|-------|-------|
| TRAIT  | 1  | 11,13  | 11,13 | 5,13  | 0,086 |
| DOSE   | 4  | 120,79 | 30,20 | 13,93 | 0,013 |
| Erreur | 4  | 8,67   | 2,17  |       |       |
| Total  | 9  | 140,59 |       |       |       |

IC individuel à 95% pour la moyenne  
Basé sur Ecart-type groupé

### ANOVA à un facteur contrôlé : PDSMOY en fonction de TRAIT

Analyse de variance pour PDSMOY

| Source | DL | SC   | CM   | F     | P     |
|--------|----|------|------|-------|-------|
| TRAIT  | 1  | 3271 | 3271 | 27,65 | 0,001 |
| Erreur | 8  | 946  | 118  |       |       |
| Total  | 9  | 4217 |      |       |       |

IC individuel à 95% pour la moyenne  
Basé sur Ecart-type groupé

Ecart-type groupé = 10,88

### ANOVA à un facteur contrôlé : PDSMOY en fonction de DOSE

Analyse de variance pour PDSMOY

| Source | DL | SC   | CM  | F    | P     |
|--------|----|------|-----|------|-------|
| DOSE   | 4  | 485  | 121 | 0,16 | 0,949 |
| Erreur | 5  | 3731 | 746 |      |       |
| Total  | 9  | 4217 |     |      |       |

IC individuel à 95% pour la moyenne  
Basé sur Ecart-type groupé

Ecart-type groupé = 27,32

### ANOVA à deux facteurs contrôlés : PDSMOY en fonction de TRAIT; DOSE

Analyse de variance pour PDSMOY

| Source | DL | SC   | CM   | F     | P     |
|--------|----|------|------|-------|-------|
| TRAIT  | 1  | 3271 | 3271 | 28,39 | 0,006 |
| DOSE   | 4  | 485  | 121  | 1,05  | 0,481 |
| Erreur | 4  | 461  | 115  |       |       |
| Total  | 9  | 4217 |      |       |       |

### ANOVA à un facteur contrôlé : AVORT en fonction de TRAIT

Analyse de variance pour AVORT

| Source | DL | SC   | CM  | F    | P     |
|--------|----|------|-----|------|-------|
| TRAIT  | 1  | 26   | 26  | 0,05 | 0,836 |
| Erreur | 8  | 4472 | 559 |      |       |
| Total  | 9  | 4498 |     |      |       |

IC individuel à 95% pour la moyenne  
Basé sur Ecart-type groupé

Ecart-type groupé = 23,64

### ANOVA à un facteur contrôlé : AVORT en fonction de DOSE

Analyse de variance pour AVORT

| Source | DL | SC   | CM  | F    | P     |
|--------|----|------|-----|------|-------|
| DOSE   | 4  | 3941 | 985 | 8,84 | 0,017 |
| Erreur | 5  | 557  | 111 |      |       |
| Total  | 9  | 4498 |     |      |       |

IC individuel à 95% pour la moyenne  
Basé sur Ecart-type groupé

Ecart-type groupé = 10,55

### ANOVA à deux facteurs contrôlés : AVORT en fonction de TRAIT; DOSE

Analyse de variance pour AVORT

| Source | DL | SC   | CM  | F    | P     |
|--------|----|------|-----|------|-------|
| TRAIT  | 1  | 26   | 26  | 0,19 | 0,683 |
| DOSE   | 4  | 3941 | 985 | 7,42 | 0,039 |
| Erreur | 4  | 531  | 133 |      |       |
| Total  | 9  | 4498 |     |      |       |

IC individuel à 95% pour la moyenne  
Basé sur Ecart-type groupé

Ecart-type groupé = 7,036

### ANOVA à un facteur contrôlé : NFR en fonction de TRAIT

Analyse de variance pour NFR

| Source | DL | SC    | CM   | F    | P     |
|--------|----|-------|------|------|-------|
| TRAIT  | 1  | 10,0  | 10,0 | 0,20 | 0,665 |
| Erreur | 8  | 396,0 | 49,5 |      |       |
| Total  | 9  | 406,0 |      |      |       |

IC individuel à 95% pour la moyenne  
Basé sur Ecart-type groupé

Ecart-type groupé = 7,036

### ANOVA à un facteur contrôlé : NFR en fonction de DOSE

Analyse de variance pour NFR

| Source | DL | SC    | CM   | F    | P     |
|--------|----|-------|------|------|-------|
| DOSE   | 4  | 329,0 | 82,3 | 5,34 | 0,047 |
| Erreur | 5  | 77,0  | 15,4 |      |       |
| Total  | 9  | 406,0 |      |      |       |

IC individuel à 95% pour la moyenne  
Basé sur Ecart-type groupé

Ecart-type groupé = 3,924

### ANOVA à deux facteurs contrôlés : NFR en fonction de TRAIT; DOSE

Analyse de variance pour NFR

| Source | DL | SC    | CM   | F    | P     |
|--------|----|-------|------|------|-------|
| TRAIT  | 1  | 10,0  | 10,0 | 0,60 | 0,483 |
| DOSE   | 4  | 329,0 | 82,3 | 4,91 | 0,076 |
| Erreur | 4  | 67,0  | 16,8 |      |       |
| Total  | 9  | 406,0 |      |      |       |

### ANOVA à un facteur contrôlé : Ac en fonction de TRAIT

Analyse de variance pour Ac

| Source | DL | SC   | CM  | F    | P     |
|--------|----|------|-----|------|-------|
| TRAIT  | 1  | 31   | 31  | 0,11 | 0,750 |
| Erreur | 8  | 2259 | 282 |      |       |
| Total  | 9  | 2290 |     |      |       |

IC individuel à 95% pour la moyenne  
Basé sur Ecart-type groupé

Ecart-type groupé = 16,81

### ANOVA à un facteur contrôlé : Ac en fonction de DOSE

Analyse de variance pour Ac

| Source | DL | SC     | CM    | F     | P     |
|--------|----|--------|-------|-------|-------|
| DOSE   | 4  | 2118,4 | 529,6 | 15,42 | 0,005 |
| Erreur | 5  | 171,8  | 34,4  |       |       |
| Total  | 9  | 2290,1 |       |       |       |

IC individuel à 95% pour la moyenne  
Basé sur Ecart-type groupé

Ecart-type groupé = 5,86

### ANOVA à deux facteurs contrôlés : Ac en fonction de TRAIT; DOSE

Analyse de variance pour Ac

| Source | DL | SC     | CM    | F     | P     |
|--------|----|--------|-------|-------|-------|
| TRAIT  | 1  | 30,7   | 30,7  | 0,87  | 0,404 |
| DOSE   | 4  | 2118,4 | 529,6 | 15,02 | 0,011 |
| Erreur | 4  | 141,1  | 35,3  |       |       |
| Total  | 9  | 2290,1 |       |       |       |

### ANOVA à un facteur contrôlé : PROD en fonction de TRAIT

| Analyse de variance pour Ac |    |       |      |      |       |
|-----------------------------|----|-------|------|------|-------|
| Source                      | DL | SC    | CM   | F    | P     |
| TRAIT                       | 1  | 1,23  | 1,23 | 0,68 | 0,433 |
| Erreur                      | 8  | 14,36 | 1,80 |      |       |
| Total                       | 9  | 15,59 |      |      |       |

IC individuel à 95% pour la moyenne  
Basé sur Ecart-type groupé

Ecart-type groupé = 1,340

### ANOVA à un facteur contrôlé : PROD en fonction de DOSE

| Analyse de variance pour Ac |    |        |       |      |       |
|-----------------------------|----|--------|-------|------|-------|
| Source                      | DL | SC     | CM    | F    | P     |
| DOSE                        | 4  | 13,404 | 3,351 | 7,67 | 0,023 |
| Erreur                      | 5  | 2,185  | 0,437 |      |       |
| Total                       | 9  | 15,589 |       |      |       |

IC individuel à 95% pour la moyenne  
Basé sur Ecart-type groupé

Ecart-type groupé = 0,6611

### ANOVA à deux facteurs contrôlés : PROD en fonction de TRAIT/ DOSE

| Analyse de variance pour Ac |    |        |       |       |       |
|-----------------------------|----|--------|-------|-------|-------|
| Source                      | DL | SC     | CM    | F     | P     |
| TRAIT                       | 1  | 1,225  | 1,225 | 5,10  | 0,087 |
| DOSE                        | 4  | 13,404 | 3,351 | 13,96 | 0,013 |
| Erreur                      | 4  | 0,960  | 0,240 |       |       |
| Total                       | 9  | 15,589 |       |       |       |

### ANOVA à un facteur contrôlé : PH en fonction de TRAIT

| Analyse de variance pour PH |    |         |         |      |       |
|-----------------------------|----|---------|---------|------|-------|
| Source                      | DL | SC      | CM      | F    | P     |
| TRAIT                       | 1  | 0,00484 | 0,00484 | 1,00 | 0,347 |
| Erreur                      | 8  | 0,03880 | 0,00485 |      |       |
| Total                       | 9  | 0,04364 |         |      |       |

IC individuel à 95% pour la moyenne  
Basé sur Ecart-type groupé

Ecart-type groupé = 0,0696

### ANOVA à un facteur contrôlé : PH en fonction de DOSE

| Analyse de variance pour PH |    |         |         |      |       |
|-----------------------------|----|---------|---------|------|-------|
| Source                      | DL | SC      | CM      | F    | P     |
| DOSE                        | 4  | 0,03104 | 0,00776 | 3,08 | 0,124 |
| Erreur                      | 5  | 0,01260 | 0,00252 |      |       |
| Total                       | 9  | 0,04364 |         |      |       |

IC individuel à 95% pour la moyenne  
Basé sur Ecart-type groupé

Ecart-type groupé = 0,0502



### ANOVA à deux facteurs contrôlés : PH en fonction de TRAIT; DOSE

Analyse de variance pour PH

| Source | DL | SC      | CM      | F    | P     |
|--------|----|---------|---------|------|-------|
| TRAIT  | 1  | 0,00484 | 0,00484 | 2,49 | 0,189 |
| DOSE   | 4  | 0,03104 | 0,00776 | 4,00 | 0,104 |
| Erreur | 4  | 0,00776 | 0,00194 |      |       |
| Total  | 9  | 0,04364 |         |      |       |

### ANOVA à un facteur contrôlé : IR en fonction de TRAIT

Analyse de variance pour IR

| Source | DL | SC    | CM    | F    | P     |
|--------|----|-------|-------|------|-------|
| TRAIT  | 1  | 0,936 | 0,936 | 1,36 | 0,278 |
| Erreur | 8  | 5,522 | 0,690 |      |       |
| Total  | 9  | 6,458 |       |      |       |

IC individuel à 95% pour la moyenne  
Basé sur Ecart-type groupé

Ecart-type groupé = 0,8308

### ANOVA à un facteur contrôlé : IR en fonction de DOSE

Analyse de variance pour IR

| Source | DL | SC    | CM    | F    | P     |
|--------|----|-------|-------|------|-------|
| DOSE   | 4  | 4,099 | 1,025 | 2,17 | 0,209 |
| Erreur | 5  | 2,360 | 0,472 |      |       |
| Total  | 9  | 6,458 |       |      |       |

IC individuel à 95% pour la moyenne  
Basé sur Ecart-type groupé

Ecart-type groupé = 0,6870

### ANOVA à deux facteurs contrôlés : IR en fonction de TRAIT; DOSE

Analyse de variance pour IR

| Source | DL | SC    | CM    | F    | P     |
|--------|----|-------|-------|------|-------|
| TRAIT  | 1  | 0,936 | 0,936 | 2,63 | 0,180 |
| DOSE   | 4  | 4,099 | 1,025 | 2,88 | 0,165 |
| Erreur | 4  | 1,423 | 0,356 |      |       |
| Total  | 9  | 6,458 |       |      |       |

### ANOVA à un facteur contrôlé : RDTS en fonction de TRAIT

Analyse de variance pour RDTS

| Source | DL | SC    | CM   | F    | P     |
|--------|----|-------|------|------|-------|
| TRAIT  | 1  | 953   | 953  | 0,69 | 0,431 |
| Erreur | 8  | 11093 | 1387 |      |       |
| Total  | 9  | 12047 |      |      |       |

IC individuel à 95% pour la moyenne  
Basé sur Ecart-type groupé

Ecart-type groupé = 37,24

### ANOVA à un facteur contrôlé : RDTS en fonction de DOSE

Analyse de variance pour RDTS

| Source | DL | SC    | CM   | F    | P     |
|--------|----|-------|------|------|-------|
| DOSE   | 4  | 10350 | 2588 | 7,63 | 0,023 |
| Erreur | 5  | 1696  | 339  |      |       |
| Total  | 9  | 12047 |      |      |       |

IC individuel à 95% pour la moyenne  
Basé sur Ecart-type groupé

Ecart-type groupé = 18,42

### ANOVA à deux facteurs contrôlés : RDTS en fonction de TRAIT; DOSE

Analyse de variance pour RDTS

| Source | DL | SC    | CM   | F     | P     |
|--------|----|-------|------|-------|-------|
| TRAIT  | 1  | 953   | 953  | 5,13  | 0,086 |
| DOSE   | 4  | 10350 | 2588 | 13,93 | 0,013 |
| Erreur | 4  | 743   | 186  |       |       |
| Total  | 9  | 12047 |      |       |       |

### ANOVA à un facteur contrôlé : NOUAIS en fonction de TRAIT

Analyse de variance pour NOUAIS

| Source | DL | SC    | CM   | F    | P     |
|--------|----|-------|------|------|-------|
| TRAIT  | 1  | 19,7  | 19,7 | 0,27 | 0,614 |
| Erreur | 8  | 573,5 | 71,7 |      |       |
| Total  | 9  | 593,2 |      |      |       |

IC individuel à 95% pour la moyenne  
Basé sur Ecart-type groupé

Ecart-type groupé = 8,467

### ANOVA à un facteur contrôlé : NOUAIS en fonction de DOSE

Analyse de variance pour NOUAIS

| Source | DL | SC    | CM    | F    | P     |
|--------|----|-------|-------|------|-------|
| DOSE   | 4  | 485,1 | 121,3 | 5,61 | 0,043 |
| Erreur | 5  | 108,1 | 21,6  |      |       |
| Total  | 9  | 593,2 |       |      |       |

IC individuel à 95% pour la moyenne  
Basé sur Ecart-type groupé

Ecart-type groupé = 4,649

### ANOVA à deux facteurs contrôlés : NOUAIS en fonction de TRAIT; DOSE

Analyse de variance pour NOUAIS

| Source | DL | SC    | CM    | F    | P     |
|--------|----|-------|-------|------|-------|
| TRAIT  | 1  | 19,7  | 19,7  | 0,89 | 0,399 |
| DOSE   | 4  | 485,1 | 121,3 | 5,49 | 0,064 |
| Erreur | 4  | 88,4  | 22,1  |      |       |
| Total  | 9  | 593,2 |       |      |       |

### ANOVA à un facteur contrôlé : Photosynthèse en fonction de DOSE/Cd

Analyse de variance pour PHOTO

| Source  | DL | SC     | CM    | F    | P     |
|---------|----|--------|-------|------|-------|
| DOSE/CD | 4  | 268,49 | 67,12 | 8,62 | 0,000 |
| Erreur  | 45 | 350,35 | 7,79  |      |       |
| Total   | 49 | 618,84 |       |      |       |

IC individuel à 95% pour la moyenne  
Basé sur Ecart-type groupé

Ecart-type groupé = 2,790

### ANOVA à un facteur contrôlé : Photosynthèse en fonction de TEMPS

Analyse de variance pour PHOTO

| Source | DL | SC    | CM   | F    | P     |
|--------|----|-------|------|------|-------|
| TRAIT  | 9  | 140,4 | 15,6 | 1,30 | 0,265 |
| Erreur | 40 | 478,4 | 12,0 |      |       |
| Total  | 49 | 618,8 |      |      |       |

IC individuel à 95% pour la moyenne  
Basé sur Ecart-type groupé

Ecart-type groupé = 3,458

### ANOVA à deux facteurs contrôlés : Photosynthèse en fonction de DOSE/Cd; TEMPS

Analyse de variance pour PHOTO

| Source  | DL | SC     | CM    | F     | P     |
|---------|----|--------|-------|-------|-------|
| DOSE/CD | 4  | 268,49 | 67,12 | 11,51 | 0,000 |
| TEMPS   | 9  | 140,39 | 15,60 | 2,67  | 0,017 |
| Erreur  | 36 | 209,96 | 5,83  |       |       |
| Total   | 49 | 618,84 |       |       |       |

IC individuel à 95% pour la moyenne  
Basé sur Ecart-type groupé

### ANOVA à un facteur contrôlé : Photosynthèse en fonction de Cd/Ca

Analyse de variance pour PHOT

| Source | DL | SC    | CM   | F    | P     |
|--------|----|-------|------|------|-------|
| CD/CA  | 4  | 291,0 | 72,7 | 6,46 | 0,000 |
| Erreur | 45 | 506,8 | 11,3 |      |       |
| Total  | 49 | 797,8 |      |      |       |

IC individuel à 95% pour la moyenne  
Basé sur Ecart-type groupé

Ecart-type groupé = 3,356

### ANOVA à deux facteurs contrôlés : Photosynthèse en fonction de Cd/Ca; T

Analyse de variance pour PHOT

| Source | DL | SC     | CM    | F     | P     |
|--------|----|--------|-------|-------|-------|
| CD/CA  | 4  | 290,99 | 72,75 | 10,18 | 0,000 |
| T      | 9  | 249,42 | 27,71 | 3,88  | 0,002 |
| Erreur | 36 | 257,36 | 7,15  |       |       |
| Total  | 49 | 797,78 |       |       |       |

### ANOVA à deux facteurs contrôlés : Photosynthèse en fonction de DOSE/Cd; T

Analyse de variance pour PHOTO

| Source  | DL | SC      | CM    | F     | P     |
|---------|----|---------|-------|-------|-------|
| DOSE/CD | 9  | 562,76  | 62,53 | 10,58 | 0,000 |
| TEMPS   | 9  | 378,59  | 42,07 | 7,12  | 0,000 |
| Erreur  | 81 | 478,54  | 5,91  |       |       |
| Total   | 99 | 1419,90 |       |       |       |

### ANOVA à un facteur contrôlé : Photosynthèse en fonction de Cd/Ca

Analyse de variance pour PHOTO

| Source  | DL | SC      | CM    | F    | P     |
|---------|----|---------|-------|------|-------|
| DOSE/CD | 9  | 562,76  | 62,53 | 6,57 | 0,000 |
| Erreur  | 90 | 857,13  | 9,52  |      |       |
| Total   | 99 | 1419,90 |       |      |       |

IC individuel à 95% pour la moyenne  
Basé sur Ecart-type groupé

Ecart-type groupé = 3,086

### ANOVA à un facteur contrôlé : Photosynthèse en fonction de Cd/Ca

Analyse de variance pour PHOTO

| Source | DL | SC      | CM    | F    | P     |
|--------|----|---------|-------|------|-------|
| CD/CA  | 9  | 562,76  | 62,53 | 6,57 | 0,000 |
| Erreur | 90 | 857,13  | 9,52  |      |       |
| Total  | 99 | 1419,90 |       |      |       |

IC individuel à 95% pour la moyenne  
Basé sur Ecart-type groupé

Ecart-type groupé = 3,086

### ANOVA à un facteur contrôlé : PROT en fonction de TRAIT

Analyse de variance pour PROT

| Source | DL | SC    | CM    | F    | P     |
|--------|----|-------|-------|------|-------|
| TRAIT  | 1  | 0,412 | 0,412 | 1,61 | 0,241 |
| Erreur | 8  | 2,052 | 0,257 |      |       |
| Total  | 9  | 2,464 |       |      |       |

IC individuel à 95% pour la moyenne  
Basé sur Ecart-type groupé

Ecart-type groupé = 0,5065

### ANOVA à un facteur contrôlé : PROT en fonction de DOSE

Analyse de variance pour PROT

| Source | DL | SC    | CM    | F    | P     |
|--------|----|-------|-------|------|-------|
| DOSE   | 4  | 1,504 | 0,376 | 1,96 | 0,239 |
| Erreur | 5  | 0,959 | 0,192 |      |       |
| Total  | 9  | 2,464 |       |      |       |

IC individuel à 95% pour la moyenne  
Basé sur Ecart-type groupé

Ecart-type groupé = 0,4381

### ANOVA à deux facteurs contrôlés : PROT en fonction de TRAIT; DOSE

Analyse de variance pour PROT

| Source | DL | SC    | CM    | F    | P     |
|--------|----|-------|-------|------|-------|
| TRAIT  | 1  | 0,412 | 0,412 | 3,01 | 0,158 |
| DOSE   | 4  | 1,504 | 0,376 | 2,75 | 0,176 |
| Erreur | 4  | 0,548 | 0,137 |      |       |
| Total  | 9  | 2,464 |       |      |       |

### ANOVA à un facteur contrôlé : a en fonction de TRAIT

Analyse de variance pour a

| Source | DL | SC    | CM   | F    | P     |
|--------|----|-------|------|------|-------|
| TRAIT  | 1  | 80,3  | 80,3 | 4,62 | 0,064 |
| Erreur | 8  | 139,0 | 17,4 |      |       |
| Total  | 9  | 219,3 |      |      |       |

IC individuel à 95% pour la moyenne  
Basé sur Ecart-type groupé

Ecart-type groupé = 4,169

### ANOVA à un facteur contrôlé : Chlo "a" en fonction de DOSE

Analyse de variance pour a

| Source | DL | SC    | CM   | F    | P     |
|--------|----|-------|------|------|-------|
| DOSE   | 4  | 72,8  | 18,2 | 0,62 | 0,667 |
| Erreur | 5  | 146,5 | 29,3 |      |       |
| Total  | 9  | 219,3 |      |      |       |

IC individuel à 95% pour la moyenne  
Basé sur Ecart-type groupé

Ecart-type groupé = 5,413

### ANOVA à deux facteurs contrôlés : Chlo "a" en fonction de TRAIT; DOSE

Analyse de variance pour a

| Source | DL | SC    | CM   | F    | P     |
|--------|----|-------|------|------|-------|
| TRAIT  | 1  | 80,3  | 80,3 | 4,85 | 0,093 |
| DOSE   | 4  | 72,8  | 18,2 | 1,10 | 0,465 |
| Erreur | 4  | 66,2  | 16,6 |      |       |
| Total  | 9  | 219,3 |      |      |       |

### ANOVA à un facteur contrôlé : Chlo "a" en fonction de TRAIT

Analyse de variance pour a

| Source | DL | SC    | CM    | F    | P     |
|--------|----|-------|-------|------|-------|
| TRAIT  | 1  | 32,65 | 32,65 | 9,49 | 0,015 |
| Erreur | 8  | 27,53 | 3,44  |      |       |
| Total  | 9  | 60,18 |       |      |       |

IC individuel à 95% pour la moyenne  
Basé sur Ecart-type groupé

Ecart-type groupé = 1,855

### ANOVA à un facteur contrôlé : Chlo "a" en fonction de DOSE

Analyse de variance pour a

| Source | DL | SC   | CM   | F    | P     |
|--------|----|------|------|------|-------|
| DOSE   | 4  | 9,2  | 2,3  | 0,23 | 0,913 |
| Erreur | 5  | 51,0 | 10,2 |      |       |
| Total  | 9  | 60,2 |      |      |       |

IC individuel à 95% pour la moyenne  
Basé sur Ecart-type groupé

Ecart-type groupé = 3,193

### ANOVA à deux facteurs contrôlés : Chlo "a" en fonction de TRAIT; DOSE

Analyse de variance pour a

| Source | DL | SC    | CM    | F    | P     |
|--------|----|-------|-------|------|-------|
| TRAIT  | 1  | 32,65 | 32,65 | 7,13 | 0,056 |
| DOSE   | 4  | 9,22  | 2,30  | 0,50 | 0,739 |
| Erreur | 4  | 18,31 | 4,58  |      |       |
| Total  | 9  | 60,18 |       |      |       |

### ANOVA à deux facteurs contrôlés : Resp Cd en fonction de Temps; DOSE

Analyse de variance pour RESP

| Source | DL | SC    | CM   | F     | P     |
|--------|----|-------|------|-------|-------|
| Temps  | 5  | 36979 | 7396 | 31,56 | 0,000 |
| DOSE   | 4  | 25096 | 6274 | 26,77 | 0,000 |
| Erreur | 20 | 4687  | 234  |       |       |
| Total  | 29 | 66762 |      |       |       |

### ANOVA à deux facteurs contrôlés : Resp Ca/Cd en fonction de T; D

Analyse de variance pour R Ca/Cd

| Source | DL | SC     | CM    | F     | P     |
|--------|----|--------|-------|-------|-------|
| T      | 5  | 30813  | 6163  | 13,17 | 0,000 |
| D      | 4  | 82851  | 20713 | 44,27 | 0,000 |
| Erreur | 20 | 9357   | 468   |       |       |
| Total  | 29 | 123021 |       |       |       |

### ANOVA à deux facteurs contrôlés : Resp Cd/Ca en fonction de Temps; DOSE

Analyse de variance pour RESP

| Source      | DL | SC     | CM    | F     | P     |
|-------------|----|--------|-------|-------|-------|
| Temps       | 5  | 67298  | 13460 | 15,06 | 0,000 |
| DOSE        | 4  | 97804  | 24451 | 27,36 | 0,000 |
| Interaction | 20 | 12448  | 622   | 0,70  | 0,799 |
| Erreur      | 30 | 26809  | 894   |       |       |
| Total       | 59 | 204359 |       |       |       |

### ANOVA à un facteur contrôlé : APX en fonction de c

Analyse de variance pour apx

| Source | DL | SC     | CM    | F    | P     |
|--------|----|--------|-------|------|-------|
| c      | 1  | 81000  | 81000 | 3,98 | 0,081 |
| Erreur | 8  | 163000 | 20375 |      |       |
| Total  | 9  | 244000 |       |      |       |

IC individuel à 95% pour la moyenne  
Basé sur Ecart-type groupé

Ecart-type groupé = 142,7

### ANOVA à un facteur contrôlé : GPX C10 en fonction de C115

Analyse de variance pour C10

| Source | DL | SC        | CM        | F    | P     |
|--------|----|-----------|-----------|------|-------|
| C11    | 4  | 0,0000000 | 0,0000000 | 3,76 | 0,090 |
| Erreur | 5  | 0,0000000 | 0,0000000 |      |       |
| Total  | 9  | 0,0000000 |           |      |       |

IC individuel à 95% pour la moyenne  
Basé sur Ecart-type groupé

Ecart-type groupé = 3,74E-06

### ANOVA à un facteur contrôlé : GPX C10 en fonction de C11

Analyse de variance pour C10

| Source | DL | SC     | CM    | F    | P     |
|--------|----|--------|-------|------|-------|
| C11    | 1  | 81000  | 81000 | 3,98 | 0,081 |
| Erreur | 8  | 163000 | 20375 |      |       |
| Total  | 9  | 244000 |       |      |       |

IC individuel à 95% pour la moyenne  
Basé sur Ecart-type groupé

Ecart-type groupé = 142,7

### ANOVA à un facteur contrôlé : GPX C10 en fonction de C11

Analyse de variance pour C10

| Source | DL | SC     | CM    | F    | P     |
|--------|----|--------|-------|------|-------|
| C11    | 1  | 81000  | 81000 | 3,98 | 0,081 |
| Erreur | 8  | 163000 | 20375 |      |       |
| Total  | 9  | 244000 |       |      |       |

IC individuel à 95% pour la moyenne  
Basé sur Ecart-type groupé

Ecart-type groupé = 142,7

### ANOVA à deux facteurs contrôlés : C1 en fonction de C2; C3GSH

Analyse de variance pour C1

| Source | DL | SC        | CM        | F    | P     |
|--------|----|-----------|-----------|------|-------|
| C2     | 3  | 0,0000000 | 0,0000000 | 4,38 | 0,027 |
| C3     | 4  | 0,0000000 | 0,0000000 | 3,39 | 0,045 |
| Erreur | 12 | 0,0000000 | 0,0000000 |      |       |
| Total  | 19 | 0,0000000 |           |      |       |

### ANOVA à deux facteurs contrôlés : GSH : Cd/Ca

Analyse de variance pour C10

| Source | DL | SC        | CM        | F     | P     |
|--------|----|-----------|-----------|-------|-------|
| C11    | 3  | 0,0000000 | 0,0000000 | 2,20  | 0,141 |
| C12    | 4  | 0,0000000 | 0,0000000 | 15,16 | 0,000 |
| Erreur | 12 | 0,0000000 | 0,0000000 |       |       |
| Total  | 19 | 0,0000000 |           |       |       |

### ANOVA à deux facteurs contrôlés : GSH Cd ET Cd/Ca

Analyse de variance pour C1

| Source      | DL | SC        | CM        | F    | P     |
|-------------|----|-----------|-----------|------|-------|
| C2          | 3  | 0,0000000 | 0,0000000 | 2,41 | 0,097 |
| C3          | 4  | 0,0000000 | 0,0000000 | 6,68 | 0,001 |
| Interaction | 12 | 0,0000000 | 0,0000000 | 0,36 | 0,962 |
| Erreur      | 20 | 0,0000000 | 0,0000000 |      |       |
| Total       | 39 | 0,0000000 |           |      |       |

### ANOVA à deux facteurs contrôlés : GST en fonction de Cd/D

Analyse de variance pour GST

| Source | DL | SC    | CM   | F    | P     |
|--------|----|-------|------|------|-------|
| CD     | 3  | 8912  | 2971 | 5,38 | 0,014 |
| C3     | 4  | 21335 | 5334 | 9,67 | 0,001 |
| Erreur | 12 | 6620  | 552  |      |       |
| Total  | 19 | 36866 |      |      |       |

### ANOVA à un facteur contrôlé : GST en fonction de l'interaction Cd/ Ca

Analyse de variance

| Source  | DL  | SC      | CM     | F     | P     |
|---------|-----|---------|--------|-------|-------|
| Facteur | 2   | 636855  | 318428 | 25,79 | 0,000 |
| Erreur  | 117 | 1444471 | 12346  |       |       |
| Total   | 119 | 2081327 |        |       |       |

IC individuel à 95% pour la moyenne  
Basé sur Ecart-type groupé

Ecart-type groupé = 111,1



La prise de conscience du mauvais état sanitaire des sols conduit évidemment à la question de savoir quels sont les risques, pour la santé publique et pour les écosystèmes, dans chaque situation de pollution. D'une façon générale, la notion de risque inhérent à un polluant quelconque est intimement liée à sa possibilité de transfert vers l'organisme cible.

Concernant les métaux lourds, leurs effets sur les écosystèmes locaux et les mécanismes de leur transfert, du sol aux organismes vivants (notamment les plantes), sont encore mal compris. Il est donc très difficile de prévoir leurs effets à long terme, de modéliser le devenir des polluants d'un site contaminé, d'en évaluer les risques et donc de choisir une stratégie de remédiation.

Depuis quelques années, les biotechnologies ont montré que l'utilisation de plantes supérieures peut constituer une solution supplémentaire par rapport aux techniques classiques, offrant deux directions de recherches : le confinement de la pollution, en évitant son transfert par un couvert végétal approprié (phytostabilisation) ; la dépollution des sols, en favorisant le développement d'une population végétale accumulant les métaux lourds (phytoextraction).

Les résultats obtenus tout au long de notre étude quant aux effets du Cd et du traitement combinés Cd/Ca sur la Tomate permettent de noter un certains nombre de points :

Notre travail vient confirmer les observations des travaux réalisés préalablement sur d'autres espèces végétales. Ainsi le Cadmium aux faibles concentrations affecte tous les paramètres physiologiques de la tomate *in vitro* et Il perturbe fortement le métabolisme des racines isolées particulièrement la respiration et la photosynthèse. Ce Cadmium est à l'origine d'un déséquilibre homéostatique dû principalement à un stress oxydant se traduisant par l'induction d'une multitude d'enzymes intervenant pour la plupart dans la détoxification.

L'addition de l'ion calcium semble réduire plus au moins l'activité induite par le cadmium. Ceci s'explique par la compétition importante existante entre les deux ions. L'ensemble des résultats obtenus nous a permis de suggérer une hypothèse relative au comportement des plants traités in vivo et in vitro d'une part et par rapport aux concentrations utilisées d'autre part.

Dans cette hypothèse (figure 47), une dilution du cadmium in vivo dans le sol et son interaction avec d'autres éléments présents dans le sol serait pour beaucoup responsables des effets du Cadmium observés. Le traitement in vitro, aux faibles concentrations et les traitements discontinus permettent aux racines isolées de développer une stratégie d'adaptation vis-à-vis du cadmium, stratégie qui permet au bout d'un certain temps aux racines de reprendre vie et ce à travers une réactivation de tous les mécanismes perturbés par cet élément.

Cependant les fortes concentrations de cadmium ont tendance à développer chez les racines traitées une stratégie de tolérance (figure 48), temporaire devant laquelle les racines isolées mettent en place tous les systèmes (vacuolisation, Enz, etc..) pouvant les protéger contre le cadmium. Cependant cette stratégie serait temporaire si les traitements par le cadmium durent dans le temps, car un stress oxydatif très important (ROS très élevé) serait total pour les racines traitées (Peroxydation lipidique).

Il faut noter que les effets du cadmium observés sur les racines isolées in vitro nous laissent supposer que les deux premiers phénomènes touchés par le cadmium sont la respiration et la photosynthèse, pour cela le rôle que pourrait jouer la mitochondrie et le chloroplaste reste à élucider.





### **En perspective :**

Au terme de cette étude, plusieurs points importants notent à préciser. Il serait en effet intéressant d'analyser l'évolution de l'activité respiratoire des mitochondries isolées à partir de racines de tomate en fonction des différentes concentrations de cadmium, une telle étude devrait ainsi être réalisée sur d'autres végétaux. Enfin, il reste aussi à élucider la nature de la compétition qui existe entre l'ion  $\text{Ca}^+$  et le  $\text{Cd}^+$ .

Toutefois, l'hypothèse formulée dans ce travail sur les effets du cadmium sur les racines isolées de tomate et des systèmes intervenants dans la détoxification ne semble pas incompatible à l'existence d'activités enzymatiques de détoxification localisées sur d'autres organites subcellulaires.

**Abrahams, P.W., 2002.** Soils: their implications to human health. *The Science of the Total Environment* 291: 1-32

**Adriano, D.C., 2001.** Trace elements in terrestrial environments: biogeochemistry, bioavailability and risks of metals. 2nd Springer-Verlag, New York, Berlin, Heidelberg.

**Agricola, G., 1556.** De Re Metallica. Traduction d'Albert France-Lanord, Gérard Klopp (Ed.), Thionville, 1987.

**Alloway, B.J., 1995.** Soil processes and the behaviour of heavy metals. In: Alloway, B.J. (Ed.). *Heavy metals in soils*. Chapman & Hall, London, pp. 11-35.

**Amiard-Triquet, C., Amiard-Triquet, C., Metayer, C., 1982.** "Distribution de quelques métaux (Cd, Pb, Cu, Zn) chez les organismes vivants de l'estuaire de la Loire et des zones côtières adjacentes." *Bull. Soc. Sc. Nat. Ouest de la France* 4: 153-168.

**Amiard-Triquet, C., Jeantet, A. Y., Berthet, B., 1993.** "Metal transfer in marine food chains: bioaccumulation and toxicity." *Acta. Biologica Hungarica* 44(4): 387-409.

**Amiard-Triquet, C., Caurant, F., 1994.** "Les formes physicochimiques de stockage des métaux chez les organismes marins." *Analisis Magazine* 22 (1): 24-26.

**Andreyev, A.Y., Kushnareva, Y.E., Starkov, A.A., 2005.** Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochemistry*, 70 (2): 200-214.

**Anonyme, 1995.** La culture de la tomate industrielle. Guide pratique. ITCMI Annaba 12P.

**Antonovics, J., Bradshaw, A.D., Turner, R.G., 1971.** Heavy metal tolerance in plants. *Advances in Ecological Research* 7: 1-85.

**Arnon, D.I., 1949.** Cooper enzymes in isolated chloroplasts polyphenoloxydase in *Betavulgaris*. *Plnt physical*, 24: 1-25.

**Asada, K., Takahashi, M., 1987.** Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis. In: Kyle, D.J., Osmond, C.J., Arntzen, C.J(Eds), *Photo inhibition: topics in Photosynthesis*. Elsevier, Amsterdam, p.227.

**Aurousseau, B., 2002.** Les radicaux libres dans l'organisme des animaux d'élevage: conséquences sur la reproduction, la physiologie et la qualité de leurs produits. *INRA Prod*, 15: 67-82.

**Baker, A.J.M., 1981.** Accumulators and excluders – Strategies in the response of plants to heavy metals. *Journal of Plant Nutrition* 3: 643-654.

**Baker, A.J.M., 1987.** Metal tolerance. *New Phytologist* 106: 93-111.

**Banzet, N., Richaud, C., Deveaux, Y., Kazmaier, M., Gagnon, J., Triantaphylides, C., 1998.** Accumulation of small heat shock proteins, including mitochondrial HSP22, induced by oxidative stress and adaptative response in tomato cells. *Plant Journal* 13: 519-527.

**Bergmeyer, U., 1974.** Methods of enzymatic analysis Ed. Verlag. Chemie GmbH Weinheim. Vol 1, 494 – 495 et 684 – 690.

**Bernal, J. , Ruvalacaba, S., 1995 :** Pharmacological prevention of acute lead poisoning in *Paramecium*. *Toxicology* 108: 165-173.

**Bert, V., 2000.** Tolérance aux métaux lourds et accumulation chez *Arabidopsis halleri* (*Brassicaceae*). Thèse : Université des Sciences et Technologies de Lille, UFR de Biologie.

**Bizily, S.P., Rugh, C.L., Summers, A.O., Meagher, R.B., 1999.** Phytoremediation of methylmercury pollution: *merB* expression in *Arabidopsis thaliana* confers resistance to organomercurials. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96: 6808-6813.

**Borchardt, T. 1983.** "Influence of food quantity on the kinetics of cadmium uptake and loss via food and seawater in *Mytilus edulis*." *Mar. Biol* 76: 67-76.

**Borchardt, T., 1985.** "Relationship between carbon and cadmium uptake in *Mytilus edulis*." *Mar. Biol* 85: 233-244.

**Borel, J.P., Randou A., Gillery P., Bellon G., Maquart F.X., Le Peuch C. and Monbaisse J.C., 1997.** *Biochimie dynamique*. Ed. De baeck Université : 197-236 et 643-691.

**Boudou, A., J. P. Desmazes et D. Georgescauld 1982.** "Fluorescence quenching study of mercury compounds and liposome interactions: effect of charged lipid and pH." *Ecotox. Environment. Safety* 6: 379-387.

**Boudou, A., D. Georgescauld et J. P. Desmazes 1983.** Ecotoxicological role of the membrane barriers in transport and bioaccumulation of mercury compounds. *Aquatic Toxicology*. J. O. Nriagu. New York, J. Wileyland Sons.: 118-136.

**Bourgeois, C.N., 1999.** *Technologie des legumes*. Ed. Tecet doc. Paris. 213 p.

**Bourrelier, P.H., Berthelin, J., 1998.** Contamination des sols par les éléments en trace : les risques et leur gestion. Tec & Doc Lavoisier (Ed.). Paris.

**Boussama, N., Ouariti O., Ghorbal M.H. , 1999a :** Changes in Growth and Nitrogen Assimilation in Barley Seedlings under Cadmium Stress. *J. Plant Nutr.* 22: 731-752.

**Boussama, N., Ouariti O., Suziki A., Ghorbal M.H., 1999b :** Cd-Stress on Nitrogen Assimilation. *J. Plant Physiol.* 155: 310-317.

**Boyd, R.S., 1998.** Hyperaccumulation as a plant defensive strategy. In: Brooks, R.R. (Ed.). *Plants that hyperaccumulate heavy metals*. CABI Publishing, Wallingford, pp. 181-200

**Bradford, M, 1976.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.

**Briat, J.F., Lebrun M., 1999.** Plant responses to metal toxicity. *Plant Biology and Pathology* 322: 43-54.

**Brooks, R.R., 1998.** Geobotany and hyperaccumulators. In: Brooks, R.R. (Ed.). *Plants that hyperaccumulate heavy metals*. CABI Publishing, Wallingford, pp. 55-94.

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

**Campbell, P.G.C., 1995.** Interactions between trace metals and organisms: critique of the free-ion activity model. *Metal speciation and bioavailability in aquatic systems*. A. Tessier et D. R. Turner, J. Wiley & Sons, Chichester, UK: 45-97.

**Campbell, P.G.C., Twiss, M.R., Wilkinson, K.J., 1997.** "Accumulation of natural organic matter on the surfaces of living cells-implications for the interaction of toxic solutes with aquatic biota." *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 54: 2543-2554

**Cao, X., Ma, L.Q., Tu, C., 2004.** Antioxydative reponses to arsenic in the arsenic hyperaccumulator Chinese brake fern *enviro.Pollut.* 128: 317-325.

**Carpene, E., George, S.G. 1981.** "Absorption of cadmium by gills of *Mytilus edulis*." *Molecular Physiology* 1: 23-34

**Castronovo, V., 2003.** Alimentation et cancer. *Rev Med Leig*, 58: 231-239.

**Chaignon, V., 2001.** Biodisponibilité du cuivre dans la rhizosphère de différentes plantes cultivées. Cas de sols viticoles contaminés par des fongicides. Thèse : Ecole doctorale, Sciences de l'Environnement : Système Terre, Université d'Aix-Marseille.

**Chaney, R.L., Angle, R.S., Baker, A.J.M., Li, Y.M., 1998.** United States Patent 5711784.

**Chaoui, A., Mazhoudi, S., Ghorbal, M.H., El Ferjani, E., 1997.** Cadmium and Zinc induction of lipid peroxidation and effects on antioxidant enzyme activities in bean, *Plant Science* 127: 139-147.

**Chardonens, A.N., Koevoets, P.L.M., Van Zanten, A., Schat, H., Verkleij, J.A.C., 1999.** Properties of enhanced tonoplast zinc transport in naturally selected zinc-tolerant *Silene vulgaris*. *Plant Physiology* 120, 779-785.

**Chen, Y.X., He, Y.F., Luo, Y.M., Yu, Y.L., Lin, Q., Wrong, M.H., 2003.** Physiological mechanism of plant roots exposed to cadmium. *Chemosphere*, 50: 789-793.

**Cheng, S., 2003 .** Effects of heavy metals on plants and resistance mechanisms. *Environmental Science and Pollution Research* 10 (4) : 256-264.



**Chiffolleau, J. F., Auger, D., Chartier, E., Michel, P., Truquet, L., Ficht, A., Gonzalez J.L., Romana, L. A., 2001.** "Spatiotemporal changes in Cadmium contamination in the Seine estuary (France)." *Estuaries* 24(6B): 1029-1040.

**Cho, U.H., Park, J.O., 2000.** Mercury-induced oxidative stress in tomato seedlings. *Plant Science* 156: 1-9.

**Chong, K., Wang, W.X., 2001.** "Comparative studies on the biokinetics of Cd, Cr and Zn in the green mussel *Perna viridis* and the Manila clam *Ruditapes philippinarum*." *Environ. Pollut* 115(1): 107-121

**Chugh, L.K., Sawhney, S.K., 1995.** Effect of Cadmium on germination, amylases and rate of respiration of germinating Pea seeds. *Environmental Pollution*, 92. (1): 1-5.

**Chugh, L.K., Sawhney S.K., 1999.** Effect of Cadmium on Activities of Some Enzymes of Glycolysis and Pentose Phosphate Pathway in Pea. *Biol. Plant* . 42: 401-407.

**Clijsters, H., Cuypers, A., Vangronsveld, J., 1999.** Physiological responses to heavy metals in higher plants; defence against oxidative stress, *Z. Naturforsch.* 54 c: 730-734.

**Converso, D.A., Fernandez, M.E., 1996.** Ca<sup>+2</sup> activation of wheat Peroxidase: A possible physiological mechanism of control. *Archives of biochemistry and Biophysics*, 33 (1): 59-65.

**Cossu, C., Doyotte, A., Jacquin, H.C., Vasseur, P., 1997b.** Mécanismes de formation des espèces réactives de l'oxygène. Biomarqueurs du stress oxydant chez les animaux. In biomarqueurs en ecotoxicologie. Aspects fondamentaux. L.

**Dahmani-muller, H., Van Oort, F., Gelie, B., Balabane, M., 1999.** Strategies of heavy metal uptake by three plant species growing near a metal smelter. *Environmental Pollution* 109: 1-8.

**De Knecht, J.A., Koevoets, P.L.M., Verkleij, J.A.C., Ernst, W.H.O., 1992.** Evidence against a role for phytochelatins in naturally selected increased cadmium tolerance in *Silene Vulgaris* (Moench) Garcke. *New Phytologist* 122 : 681-688.

**Delaigue, J., 1989.** Un îlot floristique : le Suc de Clava, dôme de serpentine de l'Ardèche. *Bulletin mensuel Société Linnéenne de Lyon* 58 (8) : 257-280.

**Devi, S.R., Prasad, M.N.V., 1999.** Membrane lipid alterations in heavy metal exposed plants. In: Prasad, M.N.V. & Hagemayer, J. (Eds.). *Heavy metal stress in plants: From molecules to ecosystems*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 99-116.

**Dietz, K.J., Baier, M., Kramer, U., 1999.** Free radicals and reactive oxygen species as mediators of heavy metal toxicity in plants. In: Prasad, M.N.V. & Hagemayer, J. (Eds.). *Heavy metal stress in plants: From molecules to ecosystems*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 73-97.

**Di Toppi, L.S., Lambardi, M., Pecchioni N., Pazzagli, L., Durante, M., Gabbrielli, R., 1999:** Effects of Cadmium stress on hairy roots of *Daucus carota*. *J.Plant Physiol.* 154: 385-391.

**Djebar, M.R., Djebar, H., 2000:** Bioénergétique ,les mitochondries végétales. Revue des sciences et technologies. Synthèse: publication de l'université de Annaba. Edition Végator: p103.

**Durcuix, C., Junot, C., Fiévert, J.B., Villiers, F., Ezan, E., Bourguignon, J., 2006.** New insights into the regulation of phytochelation biosynthesis in *A. thaliana* cells from metabolite profiling analyses. *Biochimie* 88: 1733-1742

**Eide, D., Broderius, M., Fett, J., Guerinot, M.L., 1996.** A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 93: 5624-5628.

**Errecalde, O., Seidl, M., Campbell, P.G.C., 1998.** "Influence of low molecular weight metabolite (citrate) on the toxicity of cadmium and zinc to the unicellular green alga *Selenastrum capricornutum*: an exception to the Free-Ion Model." *Wat. Res.*32: 419-429.

**Farago, E.M., 1994.** Plant and Chemical Elements : Biochemistry, Uptake, Tolerance and Toxicity Ed. VCH. 32-231.

**Favier, A., 2003.** **Le stress oxydant** : Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. Review. *L'actualité chimique* , novembre, pp 108-115

**Fellenberg, Gunter., 2000** : The chemistry of pollution.3<sup>rd</sup> Edition John Wiley and Sons Ltd : 14-83-88.

**Ferreira, R.R. , Fornazier, R.F., Vitoria, A.P., Lea P.J., Azevedo, R.A., (2002).** Changes In Antioxidant Enzyme Activities In Soybean Under Cadmium Stress. *Journal of Plant Nutrition*, 25 (2): 327-342.

**Fielding, J.L., Hall, J.L., 1978.** A biochemical and cytochemical study of peroxidase activity in roots of *Pisum sativum*, *J. Exp. Bot.* 29: 969-981.

**Fowler, S. W. 1982.** Biological transfer and transport processes. Pollutant transfer and transport in the sea. G. Kullenberg, CRC press. Boca Raton: 2-65.

**Foy, C.D., Chaney, R.L., White, M.C., 1978.** The Physiology of metal toxicity in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 29: 511-566.

**Foyer, C.H., Lelandais, M.L., Kunert, K.J., 1994.** Photooxidative stress in plants, *Physiol. Plant* 92: 696-717.

**Foyer, C.H., Noctor, G., 2000.** Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signaling. *New Phytologist* 146: 359-388.

**Freeman, J.L., Persans, M.W., Nieman, K., Albrecht, C., Peer, W., Pickering, I., Salt, D.E., 2004.** Increased glutathione biosynthesis plays a role in nickel tolerance in *Thlaspi* nickel hyperaccumulators. *Plant Cell* 16: 2176-2191.

**Friederich, M., Kneer, R., Zenk, M.H., 1998:** Enzymic synthesis of phytochelatins in gram quantities. *Phytochemistry*, 49: 2323-2329.

**Gallais, A., Bannerot, H., (1992).** Amélioration des espèces végétales cultivées objectifs et critères de sélection. INRA. PP : 379-391.

**Gallego, S.M., Benavides, M.P., Tomaro, M.L., 1996.** Effect of heavy Metal ion excess on sunflower leaves: evidence for involvement of an oxidative stress. *Plant Sci* 121: 151- 159.

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

**George, S.G., Carpena, E., Coombs, T.L., 1978.** The effect of salinity on the uptake of cadmium by the common mussel, *Mytilus edulis* (L.). *Physiology and behaviour of marine organisms*. D. S. McLusky et A. J. Bary. Oxford, Pergamon Press: 189-193.

**George, S. G., 1980.** "Correlation of metal accumulation in mussels with the mechanisms of uptake, metabolism and detoxification: a review." *Thalassia Jugoslavica* 16 (2-4): 347-365.

**Gibson, D.J., Risser, P.G., 1982.** Evidence for the absence of ecotypic development in *Andropogon virginicus* (L.) on metalliferous mine wastes. *New Phytologist* 92: 589-599.

**Gonzalez, J.L., Chiffolleau, J.F., Miramand, P., Thouvenin, B., (1999).** Le cadmium: comportement d'un contaminant métallique en estuaire, Programme scientifique Seine Aval, Editions Ifremer, Plouzané, France: 31.

**Greger, M., 1999.** Metal availability and bioconcentration in plants. In: Prasad, M.N.V. & Hagemayer, J. (Eds.). *Heavy metal stress in plants: From molecules to ecosystems*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 1-27.

**Grill, E., Winnacker, E.L., Zenk, M.H., 1987:** Phytochelatins, a class of heavy metal binding proteins from plants are functionally analogous to metallothioneins. *Proc. Natl. Acad. Sci*, 84: 439-443.

**Habig, W.H., Pabst, M.J, Jakoby, W.B., 1974.** Glutathion S-Transferases. The First enzymatic step in mercapturic acid formation. *The journal of Biological Chemistry* 249: 7130-7139.

**Harrington, C.F., Roberts, D.J., Nickless, G., 1996.** The effect of cadmium, zinc and copper on growth, tolerance index, metal uptake, and production of malic acid, in two strains of the grass *Festuca rubra*. *Canadian Journal of Botany*, 74: 1742-1752

**Hayes, J.D., McLellan, L.I., 1999.** Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress. *Free Radic Res.* Oct; 31(4):273–300

**Hegedüs, A., Erdei, S., Horvath, G., 2001.** Comparative studies of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detoxifying enzymes in green and greening barley seedling under cadmium stress. *Plant Science* 160: 1085-1093.

**Heller, R., Esmarlt, R., Cauce C., 2000.** Physiologie végétale Tome 2. Développement. Ed. 6. Dunod. 366 pages.

**Herrieche, O., 2004.** Impact du cadmium et l'interaction cadmium-calcium sur la germination et la croissance du blé dur (*Triticum durum* Dsf., Var. Vitron). Effet sur la respiration des racines. Mémoire de Magister en toxicologie. Département de Biologie. Université Annaba : 120 pages.

**Holden, M., 1975.** Chlorophylls in chemistry and biochemistry. 2<sup>nd</sup> Ed. Ed Académie press, New york. pp. 133.

**Huggett, R.J., Kimerie, P.M., Mehrle, J.R., Bergman, H.L., EDS., 1992:** Biomaekers. Biochemical, physiological, and histological markers of anthropogenic stress. Boca Raton, Fla., Lewis Publishers, pp: 347.

**Israr, M., Shivendra, S., Rupli D. Dibyendu, S., 2006.** Bioaccumulation and physiological effects of mercury in *Sesbania drummondii*. *Chemosphere* 65: 591-598.

**Israr, M. et Sahi, S.V., 2006.** Cadmium accumulation and antioxidative reponses in the *Sesbania drummondii* callus. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 50: 121-127.

**Jing, D., Feibo, W., Guoping, Z., 2006.** Influence of cadmium on antioxydant capacity and four microelement concentrations in tomato seedlings (*Lycopersicon esculentum*). *Chemosphere* 64: 1659-1666

**Kabata-Pendias, A., Pendias, H., 2001.** Trace elements in soils and plants. 3rd CRC Press, Boca Raton, London, New-York, Washington D.C.

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

**Kiss, S.A., Varga, I.S., Galbacs, Z., Maria, T.H., Csikkel-Szolnoki, A., 2003 :** Effect of age an magnesium supply on the free radical and antioxydant content of plants. *Acta Biologica Szegediensis*, Vol.47 (1-4), pp, 127-130.

**Klein, J.A., Ackerman, S.L., 2003.** Oxidative stress, cell cycle, and neurodegeneration. *J Clin Invest*, 111 : 785- 793.

**Kohen, R., Nyska, A., 2002.** Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reaction, and methods for their quantification. *Toxicol pthol*, 30: 620-650.

**Kohler, K., Riisgard, H.U., 1982.** "Formation of metallothioneins in relation to accumulation of cadmium in the common mussel *Mytilus edulis*." *Mar. Biol* 66: 53-58.

**Kovacevic, G., Kastori, R., Merkulov, L.J., 1999.** Dry Matter and Leaf Structure in Young Wheat Plants as affected by Cadmium, Lead, and Nickel. *Biol. Plant.* 42 , 119-123.

**Kramer, U., Cotter-Howells, J.D., Charnock, J.M., Baker, A.J.M., Smith, J.A.C., 1996.** Free histidine as a metal chelator in plants that accumulate nickel. *Nature* 373: 635-638.

**Kuciel, R., Mazurkiewicz, A., 2004:** Formation and Detoxification of reactive oxygen species. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, Vol.323, pp, 183-186.

**Kuleff, I., Djingova, R., 1984.** The dandelion (*Taraxacum officinale*) - A monitor for environmental pollution ? *Water, Air, and Soil Pollution* 21: 77-85.

**Kumar, R.G., Dubey, R.S., 1999.** Glutamine Synthetase Isoforms from Rice Seedlings : Effects of stress on Enzyme Activity and the Protective Roles of Osmolytes. *J.Plant Physiol.* 155 : 118-121.

**Lane, T.W., Morel, F.M.M., (2000).** "A biological function for cadmium in marine diatoms." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97(9): 4627-4631.

**Lasat, M.M., 2002.** Phytoextraction of toxic metals: A Review of Biological Mechanisms. *Journal of Environmental Quality* 31, 109-120  
**Lecomte, P., 1998.** Les sites pollués : Traitement des sols et des eaux souterraines. TEC & DOC, Lavoisier, Paris.

**Leclerc, J.C., 1999.** Ecophysiologie végétale. Publications de l'université Saint-Etienne. pp.103.

**Lecomte, P., 1998.** Les sites pollués : Traitement des sols et des eaux souterraines. TEC & DOC, Lavoisier, Paris

**Lecoq, 1965 :** In Prospectus du laboratoire de contrôle des fraudes de la wilaya de Annaba

**Lee, S.M., Leustek, T., 1999:** The Effect of Cadmium on Sulphate Assimilation Enzymes in *Brassica juncea*. *Plant Sci.* 141: 201-207.

**Lehmann, C., Rebele, F., 2004.** Evaluation of heavy metal tolerance in *Calamagrostis epigejos* and *Elymus repens* revealed copper tolerance in a copper smelter population of *C. epigejos*. *Environmental and Experimental Botany* 51: 199-213.

**Leita, L., Contin, M., Maggioni, A., 1991 :** Distribution of Cadmium and induced Cd-binding proteins in roots, stems and leaves of *Phaseolus vulgaris*, *Plant Science*, 77: 139-147.

**Leopold, I., Gunther, D., Schmidt, J., Neumann, D., 1999:** Phytochelatins and heavy metal tolerance. *Phytochemistry*, 57 : 701-710.

**Levitt, J., 1980.** Responses of plants to environmental stresses. Volume II: Water, radiation, salt, and other stresses. Academic Press, New York.

**Loggini, et al., 1999 in Youbi, M., 2005 :** Effets de deux fongicides Artea et Punch nouvellement introduits en Algérie sur la physiologie et le métabolisme respiratoire du blé dur (*Triticum durum Desf*). Thèse de Magister de l'Université Badji Mokhtar de Annaba.

**Laumonier, 1979 :** cultures légumiers et maraichères, Baillière tome III.

- Luoma, S. N., (1983).** "Bioavailability of trace metals to aquatic organisms - a review." *Sci. Total. Environ.* 28: 1-22.
- Ma, J.F., Zheng, S.J., Hiradate, S., Matsumoto, H., 1997.** Detoxifying aluminium with buckwheat. *Nature* 390, 569-570.
- Macnair, M.R., 1990.** The genetics of metal tolerance in natural populations. In: Shaw, J. (Ed.). *Heavy metal tolerance in plants: Evolutionary aspects*. CRC Press, Boca Raton, USA.
- Macnair, M. R., 1993.** The genetics of metal tolerance in vascular plants. *New Phytologist* 124: 541-559.
- Marrs K.A., 1996.** The function and regulation of glutathione *S*-transferases in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47: 127-158.
- Martin, H.W., Young, T.R., Kaplan, D.I., Simon, L., Adriano, D.C., 1996.** Evaluation of three herbaceous index plant species for bioavailability of soil cadmium, chromium, nickel and vanadium. *Plant and Soil* 182 : 199-207.
- Martoja, R. et Martoja, M., 1978.** "L'antagonisme sélénium-mercure." *Actual. Biochim.* Mar 1: 149-184.
- Martoja, M. et Martoja, R., 1982.** "La bioaccumulation des métaux, processus physiologique normal et conséquences de la pollution." *Le courrier du CNRS* 54: 32-37.
- Matthews, D.J., Moran, B.M., McCabe, P.F., Otte, M.L., 2004.** Zinc tolerance, uptake, accumulation and distribution in plants and protoplasts of five European populations of the wetland grass *Glyceria fluitans*. *Aquatic Botany* 80: 39-52.
- Matthews, D.J., Moran, B.M., Otte, M.L., 2005.** Screening the wetland plant species *Alisma plantago-aquatica*, *Carex rostrata* and *Phalaris arundinacea* for innate tolerance to zinc and comparison with *Eriophorum angustifolium* and *Festuca rubra* Merlin. *Environmental Pollution* 134: 343-351.
- McGrath, S.P., 1998.** Phytoextraction for Soil Remediation. In: Brooks, R.R. (Ed.). *Plants that hyperaccumulate heavy metals*. CABI Publishing, Wallingford, pp. 261-287.
- McNaughton, S.J., Folsom, T.C., Lee, T., Park, F., Price, C., Roeder, D., Schmitz, J., Stockwell, C., 1974.** Heavy metal tolerance in *Typha latifolia* without the evolution of tolerant races. *Ecology* 55: 1163-1165.
- Meharg, A.A., 1993.** The role of the plasmalemma in metal tolerance in angiosperms. *Physiologia Plantarum* 88 : 191-198.
- Meister, A., 1988.** Glutathione metabolism and its selective modification. *J Biol Chem* **263**: 17205–17208
- Meister, A., 1989.** Metabolism and function of glutathione. *In* D. Dolphin, R. Poulson, O. Avramovic, eds, *Glutathione: Chemical Biochemical, and Medical Aspects*. Wiley, New York, pp 367–474

- Miladi , 1970.** In Leaflet of the laboratory of control of the frauds of the wilaya of Annaba
- Milane, M.T., Sgherri, C., Clijsters, H., Narari-Izzo, F., 2003.** Antioxidative reponses of wheat treated with realistic concentration of cadmium. *Environnemental and experimental Botany.*, 50 (3) : 265-276.
- Miquel, Gérard., 2001 :** Rapport sur les effets des métaux lourds sur l'environnement et la santé.
- Misra, S., Gedamu, L., 1989.** Heavy metal tolerant transgenic *Brassica napus* and *Nicotiana tabacum* plants. *Theoretical and Applied Genetics* 78: 161-168.
- Monni, S., Salemaa, M., White, C., Tuittila, E., Huopainen, M., 2000.** Copper resistance of *Calluna vulgaris* originating from the pollution gradient of a Cu-Ni smelter, in southwest Finland. *Environmental Pollution* 109 : 211-219.
- Montigaud et al, 1983 In Boubakeur.N, 1998:** influence de la date de plantation sur le comportement de quelques variétés de tomates industrielle cultivées en sec dans la région de Annaba. Thèse d'ingénieur d'état INA d'Alger. p72.
- Morin, D., Zini, R., Tillement, S.P., Burdeau, A., 2004.** Prevention of cell damage in ischemic-reperfusion: mitochondrial respiratory chain as a pharmacological target. *Letters in drugs & Discovery*, 1: 279-284.
- Moustakas, M., Lanaras, T., Symeonidis, L., Karataglis, S., 1997.** Growth and some photosynthetic characteristics of field grown *Avena sativa* under copper and lead stress. *Photosynthetica* 30: 389-396.
- Murphy, A., Taiz, L., 1995.** Comparison of metallothionein gene expression and nonprotein thiols in ten *Arabidopsis* ecotypes. Correlation with copper tolerance. *Plant Physiology* 109: 945-954.
- Nagalakshmi, N., Prasad, M.N.V., 2001.** Reponses of glutathione cycle enzymes and glutathione metabolism to copper stress in *Scenedesmus bijugatus*. *Plant Sci* 160: 291-299.
- Nakano, Y. Azada, K., 1987.** Purification of ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts : its inactivation in ascorbate depleted medium and reactivation by monodehydroascorbate radical. *Plant Cell Physiol.*28: 131-140.
- Neffaa, W., Ravel, C., Boyer N., Guilanmin, J.J., 1999.** Peroxidase activity of Pereruvial ryegrass and thall fescue seedlings artificially infected with endophytes. *Agronomie*, 19: 611-619.
- Neumann, D., Lichtenberger, O., Gunther, D., Tschiersch, K., Nover, L., 1994.** Heat-shock proteins induce heavy-metal tolerance in higher plants. *Planta* 194: 360-367.
- Oncel, I., Keles, Y., Ustun, A.S., 2000.** Interactive effects of temperature and heavy métal stress on the growth and some biochemical compounds in wheat seedling. *Environnemental Pollution*, 107: 325-320.

**Noctor, G., Foyer, C.H., 1998.** Ascorbate and glutathion: keeping active oxygen under control. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molecular Biology* 49, 249-279.

**Parent, L., Twiss, M.R., Campbell, P.G.C., 1996.** "Influences of natural dissolved organic matter on the interaction of aluminium with the microalga *Chlorella*: A test of the free-ion model of trace metal toxicity." *Environ. Sci. Technol.* 30: 1713-1720.

**Pascal, S., Scalla R., 1999.** Purification and characterization of a safener-induced glutathione S-transferase from wheat (*Triticum aestivum*). *Physiol Plant* 106: 17-27

**Patra, J., Panda, B.B., 1998.** A comparison of biochemical responses to oxidative and metal stress in seedling of barley, *Hordeum vulgare* L. *Environ. Pollut.* 101: 99-105.

**Penada-Saraiva, M. C., 1975:** Utilisation d'une algue nanoplanctonique comme organisme test en molysmologie marine. Quelques réponses de *Dunaliella bioculata* Butcher, 1959, à l'irradiation gamma et à la contamination par le chrome et le cadmium., Thèse de Doctorat Université Paris VI., 145 pages.

**Phillips, D.J.H., Rainbow, P.S., 1994.** Biomonitoring of trace aquatic contaminants, Aldern Press Ltd, Oxford.

**Plaisance, K.L., Gronwald, J.W., 1999.** Enhanced catalytic constant for glutathione S-transferase (atrazine) activity in an atrazine-resistant *Abutilon theophrasti* biotype. *Pest Biochem Physiol* 63: 34-49

**Poulsen, E., Riisgard, H.U., Mohlenberg, F., 1982.** "Accumulation of cadmium and bioenergetics in the mussel *Mytilus edulis*." *Mar. Biol* 68: 25-29.

**Price, N.M., Morel, F.M.M. 1990.** "Cadmium and cobalt substitution for zinc in a marine diatom." *Nature* 344(6267): 658-660.

**Prasad, M.N.V., 1995.** Cadmium toxicity and tolerance in vascular plants. *Environmental and Experimental Botany*, 35 (4): 525-545.

**Prasad, K.V.S.K., Saradhi, P.P, Sharmila, P., 1999.** Concerted action of antioxidant enzymes and curtailed growth under zinc toxicity in *Brassica juncea*. *Environ. Exp. Bot.* 42 :1-10.

**Ramade, F., 1979.** *Ecotoxicologie*. 2<sup>nd</sup> ed Masson, Paris.

**Ramade, F., 1992.** *Précis d'écotoxicologie*. Paris.

**Ranieri, A., Lencioni, L., Schenone, G., Soldatini, G.F., 1993.** Glutathion-ascorbic acid cycle in pumpkin plants grown under polluted air in open top chambers. *J. Plant Physiol.* 142: 286-290.

**Raskin, I., Kumar, P.B., Dushenkov, V., 1994.** United States Patent 5364451



**Reade, J.P.H., Belfield J. L., Cobb A.H. 1999.** Rapid tests for herbicide resistance in black-grass based on elevated glutathione S-transferase activity and abundance. *Brighton crop protection conference: weeds. Proceedings of an international conference, Brighton, UK, 15-18 November 1999.* 1: 185-190

**Reilley, K.A., Banks, M.K., Schwab, A.P., 1996.** Organic chemicals in the environment: dissipation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the rhizosphere. *Journal of Environmental Quality*, 25: 212-219.

**Rengel, Z., 1999.** Heavy Metals as Essential Nutrients. In: Prasad, M.N.V. & Hagemayer, J. (Eds.). *Heavy metal stress in plants: From molecules to ecosystems.* Springer-Verlag, Berlin, pp. 231- 251.

**Riisgard, H.U., Bjornestad, E., Mohlenberg F., 1987.** "Accumulation of cadmium in the mussel *Mytilus edulis*: kinetics and importance of uptake via food and seawater." *Mar. Biol* 96: 349-353.

**Rijstenbil, J.W., Sandee, A., Vandrie, J., Wijnholds, J.A., 1994.** Interaction of toxic trace metals and mechanisms of detoxification in Planktonic diatoms *Ditylum brightwellii* and *Thalassiosirapseudonana*. *FEMS Microbial. Rev.*14: 387-396.

**Ritter, D., Knebel, J.W., Anderheide, M., Mohr, U., 1999.** Development of a cell culture model system for routine testing of substances inducing oxidative stress. *Toxicol. In vitro* 13: 745-751.

**Roméo, M., Bebbani, N., Gnassia Berelli, M., Lafaurie, M., Givard, J.P., 2000.** Cadmium and cooper display different reponse towards oxidative stress in the kidney of the sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Aquat. Toxicol.* 48: 185-194.

**Romero-Puertas, M.C., Corpas, F.J., Rodriguez-Serrano M., Gomez, M., Del Rio, L.A., Sandalio, L.M., 2007.** Differential expression and regulation of antioxidative enzymes by cadmium in pea plants. *J. Plant Physiol.* 164, (10): 1346-1357.

**Roy, R., Campbell, P.G.C., 1997.** "Decreased toxicity of Al to juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*) in acidic soft water containing natural organic matter: a test of the Free-Ion Model." *Environ. Toxicol. Chem* 16: 1962-1969.

**Rucinska, R., Waplak, S., Gwozoz, E.A., 1999.** Free radical formation and activity of antioxidant enzymes in lupin roots exposed to lead. *Plant Physiol. Biochem.* 37: 187-194.

**Salt, D.E., Prince, R.C., Pickering, I.J., Raskin, I., 1995.** Mechanisms of cadmium mobility and accumulation in Indian mustard. *Plant Physiology* 109: 1427-1433.

**Sanità di Toppi, L., Lambardi M., Pazzagli L., Cappugi M., Durante M., Gabrielli R., 1998.** Reponse to cadmium in carrot in vitro plants and cell suspension cultures,. *Plant Sci.* 137: 119-129.

**Sanità di Toppi, L., Gabbrielli, R., 1999.** Response to cadmium in higher plants. *Environmental and Experimental Botany* 41: 105-130.

**Sbartai, H., Sbartai, I., Semadi, A., 2007.** Contribution of an F1 hybrid in the adaptation of industrial tomato to the hydrous stress from the qualitative and quantitative point of view. *Acta horticulture* 758: 321-326.

**Servais, S., 2004.** Altération mitochondriale et stress oxydant pulmonaire en réponse à l'ozone: Effets de l'âge et d'une supplémentation en oméga-3. Thèse doctorat, Université Claude Bernard- Lyon 1, France, pp. 19-35.

**Shah, K., Kunar, R.G., Verma, S., Dubey, R.S., 2001.** Effect of cadmium on lipid peroxidation, superoxide anion generation and activities of antioxidant enzyme in growing rice seedlings. *Plant Sci.* 161: 1135-1144.

**Shraddha, S., Sarita, S., Rohit, S., Kavita, P., Kavita, B., 2004.** Translocation of metals and its effects in the tomato plants grown on various amendments of tannery waste : evidence for involvement of antioxidants. *Chemosphere* 57: 91-99.

**Simkiss, K., Taylor M., Mason A. Z., 1982.** "Metal detoxification and bioaccumulation in molluscs." *Mar. Biol. Letters* 3: 197-201.

**Simkiss, K., Taylor, M.G., 1995.** Transport of Metals across Membranes. In "Metal speciation and bioavailability in aquatic systems". A. Tessier et D. R. Turner, Wiley. 3: 2-39.

**Singh, K.P., Mohan, D., Sinha, S., Dalwani, R., 2004.** Impact assessment of treated/untreated wastewater toxicants discharged by sewage treatment plants on health, agricultural and environmental quality in the wastewater disposal area. *Chemosphere* 55: 227-255.

**Singh, S., Eapen, S., D'Souza, S.F., 2006.** Cadmium accumulation and its influence on lipid peroxidation and antioxidative system in an aquatic plant, *Bacopa monnieri* L. *Chemosphere* 62 (2): 233-246.

**Skorzynska-Polit, E., Tukendorf, A., Selstans, E., Bynski T., 1998.** Calcium modifies cadmium effect on runner bean plants. *Environmental and experimental Botany*, 40: 275 – 286.

**Stalt, J.P., Sneller, F.E.C., Bryngelson, T., Bryngelsson, T., Lundborg, T., Schat, H., 2003.** Phytochelatin and cadmium accumulation in wheat. *Environmental and Experimental Botany*, 49: 21- 28.

**Stegeman, J.J., Brouwer, M., Diguiulio, R.T., Frin, L., Fowler, B.A., Sanders, B.M., Van Veld, P.A., 1992.** Molecular responses to environmental contamination: enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect. In *Biomarkers: Biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress*. Lewis Publishers, pp: 235-335.

**Tanislav, G., 1978.** Etude de quelques paramètres Agro-pédologiques des différentes variétés de Néflier de Japon (*Eriobotrya japonica*) cultivés à la station horticole de l'INA. Thèse d'Ingénieur INA (Alger). 56p.

**Thannickal, V. J., Fanburg, B. L., 2000.** Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol*, 279 : 1005- 1028.

**Thévenod, F., Friedmann, J.M., 1999.** Cadmium-Mediated Oxidative Stress in Kidney Proximal Tubule Cells Induces Degradation of Na<sup>+</sup> / K<sup>+</sup> - ATPase, Through Proteasomal and Endo-Lysosomal Proteolytic Pathways. FASEB J.13,1751-1761. Activity in Plants. Plant Cell Environ. 13, 195-206.

**Van Assche, F., Cardinaels, C., Put, C., Clijsters, H., 1984.** Premature leaf ageing induced by heavy Metal toxicity? Arch.Int? Physiol. Biochim.94, 27-28.

**Van Assche, F., Put, C., Clijsters, H., 1986.** Heavy metals induce specific isozyme patterns of peroxidase in *Phaseolus vulgaris* L., Arch. Int. Physiol. Biochim.94: 60.

**Van Assche, F., Cardinaels, C., Clijsters, H., 1988.** Induction of enzyme capacity in plants as a result of heavy metal toxicity: dose-response relations in *Phaseolus vulgaris* L., treated with zinc and cadmium, Environ.Pollut. 52, 103- 115.

**Van Assche, F., Clijsters, H., 1990.** Effects of metals on enzymes activity in plants, Plant cell Environ.13: 195-206.

**Vangronsveld, J., Weckx, J., Kubacka-Zebalska, M., Clijsters, H., 1993.** Heavy metal induction of ethylene production and stress enzymes: II. Is ethylene involved in the signal transduction from stress perception to stress responses? Kluwer, Dordrecht, pp.240-246.

**Vitoria, A.P., Lea, P.J., Azevedo, R.A., 2001:** Antioxydant Enzymes Responses to Cadmium in Radish Tissues. Phytochemistry ,57: 701-710.

**Weckx, J., Vangronsveld, J., Clijsters, H., 1993.** Heavy Metal induction of ethylene production and stress enzymes: I. Kinetics of the responses, in: Chaoui A., Mazhoudi S., Ghorbel M.H., El Ferjani E., (1997). Cadmium and zinc induction of lipid peroxidation and effects on antioxidant enzyme activities in bean. Plant Science 127: 139-147.

**Weckx, J., Clijsters, H., 1996.** Oxidative damage and defense mechanism in primary leaves of *Phaseolus vulgaris* as result of root assimilation of toxic amounts of copper. Physiol. Plant. 96: 506-512.

**Weckbecker, G., Cory, J.G., 1988.** Ribonucleotide reductase activity and growth of glutathione depleted mouse *leukemia* L 1210 cells in vitro. Cancer letters, 40: 257-264.

**White, P.J., 2000.** Calcium channels in higher plants Biochimica and Biophysica Acta. 1465: 172-189.

**Wilkinson, K. J., Campbell, P.G.C., Couture, P., 1990.** "Effect of fluoride complexation on aluminium toxicity towards juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar* L.)." Can. J. Fish. Aquat. Sci. 47: 1446-1452

**Wilkinson, K.J., Bertsh, P.M., Jagoe C.H., Campbell, P.G.C., 1993.** "Surface complexation of Al on isolated fish gill cells." Environ. Sci. Technol. 27: 1132-1138.

**Wollgieh, R., Newmann D., 1995.** Stress response of tomato cell cultures to toxic metals and heat shock: differences and similarities. J. Plant Physiol. 146: 736-742.

**Wu, L., Bradshaw, A.D., Thurman, D.A., 1975.** The potential for evolution of heavy metal tolerance in plants. III. The rapid evolution of copper tolerance in *Agrostis Stolonifera*. *Heredity* 34 (2): 165-187.

**Ye, Z.H., Baker, A.J.M., Wong, M.H., Willis, A.J., 1997b.** Zinc, lead and cadmium tolerance, uptake and accumulation by the common reed, *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steudel. *Annals of Botany* 80: 363-370.

**Zhu, Y.L., Pilon-Smits, EAH, Jouanin, L., Terry, N., 1999.** Overexpression of glutathione synthetase in indian mustard enhances cadmium accumulation and tolerance. *Plant Physiol.* 119: 73-80.

**Zoghalmi Boulila, L., Djebali, W., Chaib, W., Ghorbel, M.H., 2006.** Modification physiologiques et structurales induites par l'interaction cadmium-calcium chez la tomate (*Lycopersicon esculentum*). *C.R Biologies* 329 : 702-711.