



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURE ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
جامعة باجي مختار - عنابة
UNIVERSITE BADJI MOKHTAR - ANNABA

FACULTEDES SCIENCES
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

THESE EN VUE DE L'OBTENTION D'UN DIPLOME DE DOCTORAT 3^{EME} CYCLE

Spécialité: BIOLOGIE VEGETALE ET ENVIRONNEMENT

Option : Ecophysiologie Végétale

Intitulé

**Changements physiologiques chez des plantes (Blé dur
Triticum durum Desf.) exposées à une pollution par un
métal lourd (plomb)**

Presentée par : M^m NEDJAH Imene

Membre de Jury:

LADJAMA ALI	Pr. Président	Université Badji Mokhtar, Annaba
BOUDELAA Mokhtar	Pr. Dir. de thèse	Université Badji Mokhtar, Annaba
BEKHOUCHE Fatiha	Pr. Examineur	Université Badji Mokhtar, Annaba
SOLTANE Mahmoud	Pr. Examineur	Université El Tarf
SLIMANI Ali	M.C Examineur	Université El Tarf
FADEL Djamel	Pr. Examineur	Université Chérif Messadia, Souk Ahras

Année universitaire: 2014/2015

REMERCIEMENTS

Je tiens à exprimer le plus grand respect et mes vifs remerciements au Professeur Ladjama Ali, Directeur du laboratoire de Biochimie et Microbiologie Appliquée de l'université Badji Mokhtar, pour l'honneur qu'il me fait en acceptant de présider le jury.

Mes remerciements les plus profonds au Professeur Bekhouche Fatiha de la Faculté de science de l'université Badji Mokhtar Annaba, a Monsieur Soltane Mahmoud Professeur au département d'Agronomie de l'université d'El Taref, Au Maître de Conférence Monsieur Slimani Ali de l'université El Tarf à Professeur FADEL Djamel qui ont bien voulu examiner ce travail. Leur expérience professionnelle respective me sera j'en suis sûr, bénéfique lors des débats.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude au Professeur Boudelaa Mokhtar de l'université Badji Mokhtar, qui a suivi et dirigé ce travail avec un enthousiasme toujours égale. Je le remercie pour sa gentillesse, sa patience, la disponibilité constante qu'il a manifestée, le soutien qu'il m'a apporté, la confiance qu'il ma témoignée, afin de mener à terme cette thèse.

Mes sincères remerciement et reconnaissances pour mes très chers parents. Ainsi qu'à mon mari qui m'a vraiment soutenu et encouragé. Sans oublier les membres de ma famille et mes amies.

Enfin je remercie tous ceux qui ont collaborés et contribués de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Table De Matière

TABLE DE MATIERE

INTRODUCTION GENERALE.....	1
----------------------------	---

CHAPITRE I : PRESENTATION DE L'ESPECE ETUDIEE

I.1. Généralités sur le blé.....	4
I.2. Historique de blé.....	4
I. 3. Importance des céréales.....	5
I.3.1. Importance alimentaire.....	5
I.3. 2. Importance économique.....	5
I.4. Origine et diversité du blé dur en Algérie	5
I.5. Les principales caractéristiques de la culture du blé.....	6
I.5.1. Description de la plante du blé.....	6
I.5.2. Composition histologique et biochimique du grain	7
I .5.2.1.les enveloppes	7
I .5.2.2. L'endosperme (amande ou albumen)	8
I .5.2.3. Le germe (embryon).....	8
I .5.3. Classification du blé dur.....	10
I .5.4. Exigences du blé.....	10
I .5.4.1. Exigences édaphique	10
I .5.4.2. Exigences climatiques	11
I .5.4.2.1. Température	11
I .5.4.2.2. L'eau.....	11
I .5.4.2.3. La lumière.....	11
I .5.4.2.4. Fertilisation.....	12
I .5.5. Phénologie du blé.....	14
I .5.5.1. Stade de semis.....	14
I .5.5.2. Stade germination- levée.....	14
I .5.5.3. Stade levée-tallage.....	14
I .5.5.4. Stade tallage- montaison	15
I .5.5.5. Stade d'épiaison	16
I .5.5.6. Stade floraison- fécondation	16
I .5.5.7. Stade remplissage des grains.....	16

CHAPITRE II : LES METAUX LOURDS ET LEURS EFFETS

II.1. Généralités.....	18
II.2. Pollution par les métaux lourds	18
II.2.1. Pollution d'origine naturelle	18
II.2.1.1. Le sol	18
II.2.1.2. L'atmosphère.....	20
II.2.1.3. Dans l'eau	21
II.2.2. Pollution d'origine anthropique	21
II.2.2.1. Pratiques agricoles	21

II.2.2.2.Source industrielle	22
II.2. Présentation du plomb	24
II.2.2.Utilisation du plomb	25
II.3. Effets des métaux lourds sur les végétaux.....	25
II.3.1. Effets sur la germination et la croissance	25
II.3.2. Effets sur la photosynthèse	26
II.3.3. Effets sur la respiration	28
II.3.4. Effets sur le statut hydrique	29
II.3.5. Effet sur les animaux	29
II.3.6. Au niveau cellulaire	31
II.4.Modes de contamination par les métaux lourds	37
II.4.1.Contamination au niveau des racines.....	37
II.4.2.Voies de contamination des végétaux par le plomb.....	38
II.4.2.1.Voie apoplastique.....	38
II.4.2.2.Voie symplastique.....	39
II.4.3.Conditions d'absorption des métaux par la plante	40
II.4.2.Contamination aérienne (voie foliaire).....	41
II.5.La phytoremédiation.....	41
II.5.1.La Phytoextraction.....	42
I.5.2.La phytodégradation	44
II.5.3.La rhizofiltration.....	44
I.5.4.La phytostabilisation.....	44
II.5.5.La phytovolatilisation.....	44

CHAPIII: MATERIEL ET METHODES

III. 1. Matériel végétal.....	47
III. 2.1. Essai de germination.....	47
III. 2.2. Essai de la croissance.....	48
III. 3. Méthodes d'étude.....	50
III. 3.1. Phase de la germination.....	50
III. 3.1.1. Paramètres morphologiques	50
III. 3.1.1.1. La Faculté germinative	50
III. 3.1.1.2. La Cinétique de germination	50
III. 3.1.1.3. L'Allongement des coléoptiles.....	50
III. 3.1.1.4. Biomasse aérienne (PF) et racinaire (PR)	51
III. 3.1.2. Paramètres biochimiques.....	51
III. 3.1.2.1. Dosage de la chlorophylle et des pigments caroténoïdes	51
III. 3.1.2.2. Dosage des sucres solubles	51
III. 3.1.2.3. Dosage de la proline.....	52
III. 3.1.2.4. Dosage des protéines.....	53
III. 3.1.3. Paramètres enzymatiques	53
III. 3.1.3.1. Détermination de l'activité de la catalase.....	53
III. 3.1.3.2. Détermination de l'activité de la peroxydase.....	54
III. 3.1.3.3. Détermination de l'activité de gaïacol peroxydase	55

III. 3.1.4. Dosage de glutathion(GSH).....	55
III. 3.2. La phase de la croissance.....	56
III. 3.2.1. Paramètres morphologiques	56
III. 3.2.1.1. Nombre des feuilles.....	56
III. 3.2.1.2. Surface foliaire	56
III. 3.2.1.3. Poids spécifiques des feuilles (PSF).....	56
III. 3.2.2. Paramètres biochimiques.....	57
III. 3.2.3. Paramètres enzymatiques.....	57
III. 3.2.3.1. Détermination de l'activité ascorbate peroxydase (APX).....	57

CHAP IV : RESULTATS

IV.1.Résultats de la germination.....	58
IV.1.1. Paramètres morphologiques	58
IV.1.1.1. Faculté germinative.....	58
IV.1.1.2. Cinétique de la germination (Vm).....	59
IV.1.1.3. Allongement des coléoptiles.....	61
IV.1.1.4. Biomasse aérienne et souterraine.....	63
IV.1.2. Paramètres biochimiques.....	64
IV.1.2.1. Contenu des pigments photorécepteurs.....	65
IV.1.2.1.1. Contenu en chlorophylles	65
IV.1.2.1.2. Contenu en caroténoïdes.....	67
IV.1.2.1.3. Contenu en sucres solubles.....	67
IV.1.2.1.4. Contenu en protéines	68
IV.1.2.1.5. Contenu en proline.....	69
IV.1.3. Paramètres enzymatiques	70
IV.1.3.1. Effet du plomb sur l'activité de la peroxydase.....	70
IV.1.3.2. Effet du plomb sur l'activité de la catalase	71
IV.1.3.3. Effet du plomb sur l'activité du gaïacol peroxydase (GPOX).....	72
IV.1.4. Effet du plomb sur le contenu en glutathion.....	73
IV.2.Résultats de la croissance.....	74
IV.2.1. Paramètres morphologiques.....	74
IV.2.1.1. Nombre de feuilles par plante.....	74
IV.2.1.2. Surface foliaire	75
IV.2.1.3. Poids spécifique des feuilles.....	76
IV.2.2. Paramètres biochimiques.....	77
IV.2.2.1. Contenu en chlorophylles.....	77
IV.2.2.2. Contenu en caroténoïdes.....	79
IV.2.2.3. Contenu en protéines	80
IV.2.2.4. Contenu en proline.....	81
IV.2.2.5. Contenu en sucres solubles	82
IV.2.3. Paramètres enzymatiques	83
IV.2.3.1. Effet du plomb sur l'activité de la catalase	83
IV.2.3.2. Effet du plomb sur l'activité de la peroxydase.....	85
IV.2.3.3. Effet du plomb sur l'activité de l'ascorbate peroxydase	86
IV.2.3.4. Effet du plomb sur l'activité du gaïacol peroxydase.....	88

IV.2.4. Effet du plomb sur le contenu en glutathion.....	88
IV. DISCUSSION.....	90
CONCLUSION GENERALE.....	98
BIBLIOGRAPHIE	
RESUMES	
ANNEXES	

Listes

Listes Tableaux Et Figures

Liste des tableaux

Numéro	Titre	Page
1	Distribution histologique des principaux constituants du grain du blé	9
2	Classification botanique du blé	10
3	Valeurs limites des concentrations des éléments traces admissibles dans les sols	19
4	Concentration en Pb de différentes roches	20
5	Cibles des métaux au sein des chaînes de la réaction lumineuse de la Photosynthèse	28
6	Structures ou réactions mitochondriales sensibles à l'action des métaux	29
7	Seuil de toxicité des MT pour les animaux et homme	30
8	Seuils de toxicité du plomb pour les animaux	31
9	Rôles et localisations subcellulaires des principales enzymes antioxydants	36
10	Principales phytotechnologies	46
11	Caractéristiques des variétés	47
12	Conclusion sur l'influence du polluant sur les paramètres biochimiques	96
13	Conclusion sur l'influence du polluant sur les paramètres antioxydantes	97

Liste des figures

Numéro	Titre	Page
1	Coupe longitudinale d'un grain de blé	8
2	Stades phénologiques du blé	17
3	Pollution anthropiques par les métaux	23
4	Schéma simplifié de l'origine des métaux lourds dans le sol	23
5	Origines de plomb dans la nature	24

6	Les interactions possibles avec le plomb dans la photosynthèse	27
7	Espèces réactives de l'oxygène produites en cascade à partir de l'oxygène moléculaire	32
8	Sources cellulaires de radicaux libres	33
9	Représentation de la localisation des différentes voies enzymatiques de détoxification des ERO au niveau d'une cellule végétale	34
10	Schéma d'une coupe transversale de racine de blé montrant les voies possibles de mouvement des composés solubles	39
11	Dessin d'une coupe transversale de racine, avec la diffusion radiale des ions	40
12	les différentes voies d'entrée des polluants dans les feuilles	41
13	Phytoaccumulation du nickel par une plante	43
14	Quelques espèces accumulatrices	43
15	Les différents types de phytoremédiation	45
16	dispositif expérimental de l'essai de germination	48
17	dispositif expérimental de l'essai de croissance	49
18	Effet du nitrate du plomb sur la faculté germinative	58
19	Effet du nitrate du plomb sur la cinétique de germination (A) Waha, (B) Vitron, (C) GTA	60
20	Effet du nitrate du plomb sur l'allongement des coléoptiles (A) Waha, (B) Vitron, (C) GTA	63
21	Effet du nitrate du plomb sur la masse aérienne	64
22	Effet du nitrate du plomb sur la masse souterraine	64
22	Effet du $Pb(NO_3)_2$ sur le contenu en pigments: (A) chlorophylle (a), (B) chlorophylle (b), (C): chlorophylle (a+b).	65
23	Effet du $Pb(NO_3)_2$ sur le contenu en pigments caroténoïdes	67
24	Effet du $Pb(NO_3)_2$ sur le contenu en sucres solubles	68
25	Effet du $Pb(NO_3)_2$ sur le contenu en protéines totaux	69

26	Effet du Pb(NO ₃) ₂ sur le contenu en proline	70
27	Effet du Pb(NO ₃) ₂ sur l'activité de la peroxydase	71
28	Effet du Pb(NO ₃) ₂ sur l'activité de la catalase	72
29	Effet du Pb(NO ₃) ₂ sur l'activité du gaïacol peroxydase	73
30	Effet du Pb(NO ₃) ₂ sur le contenu en glutathion	74
31	Effet du Pb(NO ₃) ₂ sur le nombre des feuilles	75
32	Effet du Pb(NO ₃) ₂ sur la surface foliaire	76
33	Effet du Pb(NO ₃) ₂ sur le poids spécifique des feuilles	77
34	Effet du Pb(NO ₃) ₂ sur le contenu en pigments: (A) chlorophylle (a+b), (B) chlorophylle(a), (C) chlorophylle (a)	79
35	Effet du Pb(NO ₃) ₂ sur le contenu en pigments caroténoïdes	80
36	Effet du Pb(NO ₃) ₂ sur le contenu en protéines	81
37	Effet du Pb(NO ₃) ₂ sur le contenu en proline	82
38	Effet du Pb(NO ₃) ₂ sur le contenu en sucres solubles	83
38	Effet du Pb(NO ₃) ₂ sur l'activité de la catalase. (A) feuilles, (B) racines.	84
39	Effet du Pb(NO ₃) ₂ sur l'activité de la peroxydase. (A) feuilles, (B) racines.	85
40	Effet du Pb(NO ₃) ₂ sur l'activité de l'ascorbate peroxydase. (A) feuilles, (B) racines.	87
41	Effet du Pb(NO ₃) ₂ sur l'activité de gaïacol peroxydase	88
42	Effet du Pb(NO ₃) ₂ sur le contenu en glutathion	89

Liste d'Acronymes

CIMMYT	Centre International pour l'Amélioration du maïs et blé
ICARDA	Centre International de recherche et Développement Agricole des régions arides
ITGC	Institut Technique des grandes cultures
CIC	Centre international des céréales

Liste des Abréviations

ALAD	δ -aminolevelunata Déshydratase
APX	Ascorbate- Peroxydase
As	Acide Salicylique
Br	Bore
C	Concentration
CaCO ₃	Carbonate de calcium
CAT	Catalase
Chl	Chlorophylle
Cu	Cuivre
DHAR	Déhydroascorbate Réductase
EC	Conductivité électrique
ETM	Eléments traces métalliques
Fd	Ferredoxines
Fe	Fer
FG	Faculté germinative
GPX	Glutathion Peroxydase
GR	Glutathion Réductase
K	Potassium
KMnO ₄	Permanganate de Potassium
MF	Matière Fraiche
Mn	Manganèse
MO	Matière Organique
Mo	Molybdène
MT	Métaux lourd
N	Azote
NAD(P)	Nicotinamide Adénine Dinicléotide Phosphate
NADH(P)	Nicotinamide Adénine Dinicléotide Réduite Phosphate
Ni	Nickel
O ₂	Oxygène
O ₂ ⁻	Anion radical superoxyde
P	Phosphore
Pb	Plomb

Pb(NO ₃) ₂	Nitrate de Plomb
Pc	Plastocyanines
PF	Masse aérienne
POX	Peroxydases
PPm	Partie par million
PQ	Plastoquinones
PR	Masse racinaire
Ps	Poids sec
PS.I	photosystème I
PS.II	photosystème II
Pv	Poids vif
R	Répétition
ROS	Espèces Réactives de l'oxygène
S/Emb	Sous Embranchement
S/O	Sous ordre
SAU	Surface Agricole Utile
SOD	Superoxydes Dismutases
Zn	Zinc

Introduction Générale

INTRODUCTION GENERALE

Les céréales cultivées depuis des milliers d'années, constituent la base de notre alimentation et jouent la carte de la diversité. De l'Europe à l'Asie, en passant par l'Afrique et l'Amérique, les hommes du monde entier en ont développé de nombreuses variétés. Elles seront sans doute amenées à jouer un rôle fondamental face aux défis démographiques et environnementaux du siècle. Les céréales constituent environ 30% des sources énergétiques alimentaires dans les pays développés, contre plus de 50% dans les pays en voie de développement, atteignant parfois 90 % dans certains pays d'Afrique.

Les céréales sont des espèces généralement cultivées pour leur grain, dont l'albumen amylicé, réduit en farine, est consommable par l'homme ou par les animaux domestiques.

La filière céréalière constitue une des principales filières de la production agricole en Algérie. Les produits céréaliers occupent une place stratégique dans le système alimentaire et dans l'économie nationale. Cette caractéristique est perçue d'une manière claire à travers toutes les phases de la filière.

Le blé est l'une des principales céréales. Cette plante herbacée annuelle qui produit le grain dont on tire la farine pour faire notamment le pain et les pâtes alimentaires constitue la base de la ressources alimentaires de l'humanité. En effet, La production mondiale de blé en 2008 a été de 686.8 millions de tonnes (CIC, 2008), de 700 millions de tonnes en 2011 (FAO, 2012), La production mondiale de blé en 2012, est de 690 millions de tonnes.

En Algérie, la superficie réservée à la céréaliculture est, aujourd'hui, de 3,3 millions d'hectares qui représentent 90% des terres cultivées. Si on se réfère aux chiffres de 1929, on constate que cette superficie n'a pas évolué. 40% de cette surface sont destinés à la production du blé dur. Ces rendements, restent très bas puisqu'ils ne tournent qu'autour de 10 à 15Qx/ha, malgré les efforts fournis pour répondre aux besoins alimentaires de la population qui est toujours croissante. Cette faible production est souvent expliquée par l'influence des mauvaises conditions pédoclimatiques associées, notamment à : la désertification, l'érosion, la pollution, les mauvaises pratiques agricoles et la salinisation des sols (Selmi, 2000).

Parmi les polluants les plus dangereux dans la nature, le plomb, est l'un des contaminants les plus répandus dans l'environnement, toxique même à faible concentration (Jarup, 2003; Dazy, 2008). De plus, il n'est pas biodégradable, il est persistant et s'accumule dans les sols. Une fois le sol contaminé, il pénètre dans la plante et perturbe les mécanismes de celle-ci, tel que les structures membranaires et pariétales, la perturbation du statut hydrique, l'absorption et la

translocation des éléments minéraux essentiels (calcium (Ca^{2+}), manganèse (Mg), fer (Fe)) et interfère avec l'activité enzymatique, notamment les enzymes impliquées dans la biosynthèse de la chlorophylle (Seregin et Ivanov, 2001; Patra *et al*, 2004) induisant par conséquent un arrêt de la photosynthèse (Kupper *et al*, 1996). Sans oublier son effet néfaste sur les enzymes anti oxydantes, en effet, au niveau cellulaire le plomb favorise la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) et perturbe le statut redox des cellules, ce qui occasionne un stress oxydatif (Serrejin et Ivanov, 2001; Pourrut 2008).

Le plomb peut contaminer tous les écosystèmes terrestres et arriver jusqu'à l'homme par le biais de la chaîne alimentaire et représenter un danger pour la santé humaine. La contamination de l'homme par le plomb s'appelle le saturnisme qui se traduit sur le plan symptomatologique par des coliques, des cancers du rein, hypertension. Tandis que chez l'enfant le risque d'intoxication saturnique est plus élevé, à une exposition égale, l'organisme d'enfant absorbe 50% du plomb ingéré, tandis que la proportion chez l'adulte est seulement 5 à 7% (Gérard, 2001). Les organes cibles sont: le système nerveux, la moelle osseuse et le sang.

Le travail de cette thèse, consiste à étudier les effets d'une pollution métallique par le plomb sur une céréale le blé dur (*Triticum durum Desf*).

Cette étude a pour but d'évaluer le comportement de trois variétés de blé dur (Vitron, Waha et Gta), vis-à-vis du nitrate de plomb $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$. Ceci dans le but de connaître ses effets sur la germination et la croissance, phases très importante dans la production végétale. Par ailleurs, nous avons également étudié des paramètres physiologiques, biochimiques et enzymatiques pour déterminer la sensibilité et/ ou les stratégies adaptatives des variétés par rapport à ce polluant.

Cinq chapitres composent ce document :

- le chapitre premier présente une synthèse bibliographique sur la biologie du modèle biologique utilisé dans notre travail (le blé).

-le deuxième chapitre traite de la pollution par les métaux lourds notamment le plomb et ses effets sur les végétaux.

-le troisième chapitre est réservé au matériel et méthodes utilisées dans cette investigation, le déroulement des expériences, les doses de plomb préconisées et les techniques et protocoles de dosages des variables.

-le quatrième chapitre est consacré aux résultats et discussion obtenus lors de cette thèse et enfin on termine avec une conclusion générale.

Chapitre I

Présentation De L'espèce Etudiée

CHAPITRE I: PRÉSENTATION DE L'ESPECE ETUDIÉE

I.1. Généralités sur le blé

Le blé fait partie des trois grandes céréales avec le maïs et le riz. C'est la troisième espèce par importance de la récolte mondiale, et la plus consommée par l'homme. En Algérie, le blé est cultivé pour son grain, c'est une culture qui occupe grandes surfaces. On distingue deux espèces de blé: le blé tendre et le blé dur. Ces deux espèces, se différencient par la friabilité de l'amande. L'amande du blé tendre est blanche et friable, tandis que celle du blé dur est jaune et plus dure. Au moulin, les graines de blé tendre sont broyées en farine, celles-ci servent à la fabrication de pains, de biscuits, de pâtisseries, de pizzas, de viennoiseries. A la semoulerie, les grains de blé dur sont broyés en semoules, ceux-ci servent à la fabrication de pâtes et de couscous.

I.2. Historique de blé

La culture des céréales a permis l'essor des grandes civilisations, car elle a constitué l'une des premières activités agricoles. En effet, Il ya plus de trois millions d'années, l'homme préhistorique était nomade, pratiquait la chasse et la cueillette des fruits pour assurer sa nourriture. Le nomadisme a progressivement laissé la place à la sédentarité qui permit la culture des céréales. Le blé est l'une de ces céréales connue depuis l'antiquité (Ruel, 2006). Sa culture remontée au mésolithique vers 7000 avant Jésus-Christ (anonyme1, 1981; Ruel, 2006). Le blé dur provient des territoires de la Turquie, de la Syrie, de l'Iraq et de l'Iran (Feldman 2001).

Le terme blé vient probablement du gaulois blato (à l'origine du vieux français *blaie*, *blee*, *blaier*, *blaver*, d'où le verbe emblaver, qui signifie ensemer en blé) et désigne les grains qui broyés, fournissant de la farine, pour des bouillies (*polenta*), des crêpes ou du pain. On trouve sous le nom de blé des espèces variées: le genre *Triticum* (du latin *Tritus*, *us*= broiement, frottement): le blé moderne (*froment*), l'orge (*Hordeum*) et le seigle (*Secale cereale*), le blé noir (*sarrasin*).

C'est en l'an 300 ans avant JC, que les premiers procédés de panification ont été élaborés par les Egyptiens qui préparaient déjà les premières galettes à base de blé. L'homme sait alors produire sa propre nourriture, en même temps celui-ci acquiert son autosuffisance alimentaire et en ces temps là, apparaissent les premiers échanges commerciaux. Par la suite, les techniques de panifications se sont améliorées grâce au Hébreux, Grecs et enfin Romains qui en répandent l'usage à travers l'Europe et devenue, un des constituant essentiel de l'alimentation humaine (Yves et de Buyer., 2000).

I. 3. Importance des céréales

I.3.1. Importance alimentaire

Les blés constituent la première ressource alimentaire de l'humanité, et la principale source de protéines. Ils fournissent également une ressource privilégiée pour l'alimentation animale et de multiples applications industrielles. La presque totalité de la nutrition de la population mondiale est fournie par les aliments en grains dont 95% sont produits par les principales cultures céréalières (Bonjean et Picard, 1991).

I.3. 2. Importance économique

Le blé dur représente environ 8% des superficies cultivées en blés dans le monde dont 70% sont localisées dans les pays du bassin méditerranéen. La Turquie, la Syrie, la Grèce, l'Italie, l'Espagne, et les pays d'Afrique nord, sont en effet, parmi les principaux producteurs (Monneveux, 2002). Par ailleurs, le blé dur occupe une place centrale dans l'économie Algérienne. En 2012, a atteint une production de blé de 51,2 MQ contre une production mondiale de 690 MT. Sur une superficie de 3 Mha réservée à la céréaliculture, 1 785 000 ha sont destinés à la culture du blé (CIC, 2008).

I.4. Origine et diversité du blé dur en Algérie

Les blés constituent le genre *Triticum*, qui comporte un certain nombre d'espèces cultivées. Du point de vue génétique on peut les classer en diploïdes (*Triticum monococcum*:14 chromosomes), tétraploïdes (*Triticum turgidum*:28 chromosomes), et hexaploïdes (*Triticum aestivum*:42 chromosomes). Ainsi l'origine du blé dur est un hybride, résultant du croisement aléatoire et naturel de l'espèce *Triticum monococcum* (sauvage) et une herbe spontanée apparentée au blé nommée *Aegilops speltoides*, toutes deux vraisemblables, puisqu'on les rencontre dans la même aire géographique (Belaid, 1996).

Les blés cultivés en Algérie appartiennent pour la presque totalité aux espèces *T. aestivum* L. (*blé tendre*) et *T. durum* Desf. (blé dur) A l'intérieur de chaque espèce on trouve de nombreuses variétés botaniques. En effet, la diversité des blés Algériens a été à l'origine, étudiée à partir des caractères morphologiques. D'autres paramètres tels que la taille, la forme de l'épi, la position des barbes ont été pris en considération afin de distinguer ainsi un grand nombre de populations (Erroux, 1949).

Ducellier en (1930), a décrit l'ensemble des espèces de blé cultivées en Algérie: les blés durs (avec et sans barbes). Avant l'indépendance, il en comptait vingt-neuf variétés d'origine arabes (Hedba, Mohamed ben Bachir, Bidi). Plus de 30 années après les travaux de Ducellier (1930);

Laumont et Erroux (1961) ont mentionné les mêmes variétés cultivées de blé dur à une ou deux exceptions.

I.5. Les principales caractéristiques de la culture du blé

I.5.1. Description de la plante du blé

La plante du blé est une graminée de hauteur moyenne pouvant atteindre jusqu'à 1.5 m selon les variétés et dont le limbe des feuilles est aplati. L'inflorescence d'un épi terminal se compose de fleurs parfaites (Bozzini, 1988). Il existe des variétés de blé dur semi-naines. Le système racinaire comprend des racines séminales produites par la plantule durant la levée, ainsi que des racines adventives (latérales) qui se forment plus tard à partir des nœuds à la base de la plante et constituent le système racinaire permanent. Le blé dur possède une tige cylindrique, dressé habituellement creuse et subdivisée en entrenœuds. Certaines variétés possèdent toutefois des tiges pleines (Clarke, 2002). Le chaume (talle) se forme à partir de bourgeons axillaires aux nœuds à la base de la tige principale. Le nombre de brin dépend de la variété, des conditions de croissance et de la densité de plantation. Dans des conditions normales une plante peut produire trois brins en plus de la tige principale (Bozzini, 1988). Comme pour d'autres graminées, les feuilles de blé dur se composent d'une base (gaine) entourant la tige, d'une partie terminale qui s'aligne avec les nervures parallèles et d'une extrémité pointue. Au point d'attache de la gaine de la feuille se trouve une membrane mince et transparente la ligule, comportant deux petits appendices latéraux, les oreillettes. La tige principale et chaque brin portent une inflorescence en épi terminal.

L'inflorescence du blé dur est un épi muni d'un rachis portant des épillets séparés par de courts entrenœuds (Bozzini, 1988). Chaque épillet compte deux glumes (bractées) renfermant de deux à cinq fleurs distiques sur une rachéole. Chaque fleur parfaite est enfermée dans des structures semblables à des bractées, soit la glumelle inférieure (lemme) et la glumelle supérieure (paléa). Chacune compte trois étamines à anthère biloculaires, ainsi qu'un pistil à deux styles à stigmates plumeux. A maturité, le grain de pollen fusiforme contient habituellement trois noyaux. Chaque fleur peut produire un fruit à une seule graine, soit le caryopse. Chaque graine contient un large endosperme et un embryon aplati situé à l'apex de la graine et à proximité de la base de la fleur.

I.5.2. Composition histologique et biochimique du grain

Les graines de blé sont des fruits appelées caryopses. Elles ont une forme ovoïde, possèdent sur l'une de leur faces une cavité longitudinale (le sillon) et à l'extrémité opposée de l'embryon des touffes de poils (la brosse). Le grain de blé se compose de trois parties principales:

I .5.2.1.les enveloppes

Les enveloppes sont de nature cellulosique qui protège le grain et représentent 14-16% de la masse du grain. Elles renferment une teneur importante en protéines, en matières minérales et en vitamine du complexe B; elles contiennent en outre les pigments qui donnent la couleur des grains (figure 1). Les enveloppes ont une épaisseur variable et sont formées de trois groupes de téguments soudés:

- le péricarpe ou tégument du fruit constitué de trois assises cellulaires :
 - épicarpe, protégé par la cuticule et les poils.
 - mésocarpe, formé de cellules transversales
 - endocarpe, constitué par des cellules tubulaires.

Il est riche en celluloses, hémicelluloses et pentosanes ainsi qu'en éléments minéraux (Godon et William, 1991).

I .5.2.2. L'endosperme (amande ou albumen)

Constitue presque tout l'intérieur du grain et se compose principalement de minuscules grains d'amidon. On y trouve l'essentiel des réserves énergétiques qui nourrissent la plantule au moment de la germination. Il forme environ 80% du poids d'un grain et est constitué de granules d'amidon enchâssés dans le réseau protéique (gluten).

I .5.2.3. Le germe (embryon)

Il constitue un organe de réserve, riche en protéines et en lipides pour la jeune plantule et forme environ 2,5% à 3% du grain de blé. Le germe comprend deux parties: la plantule (future plante) et le cotylédon (réserve de nourriture très facilement assimilable, destinée à la plantule) qui contient l'essentiel des matières grasses du grain. Enfin, le germe est riche en vitamine B1, B6 (Surget et Barron, 2005).

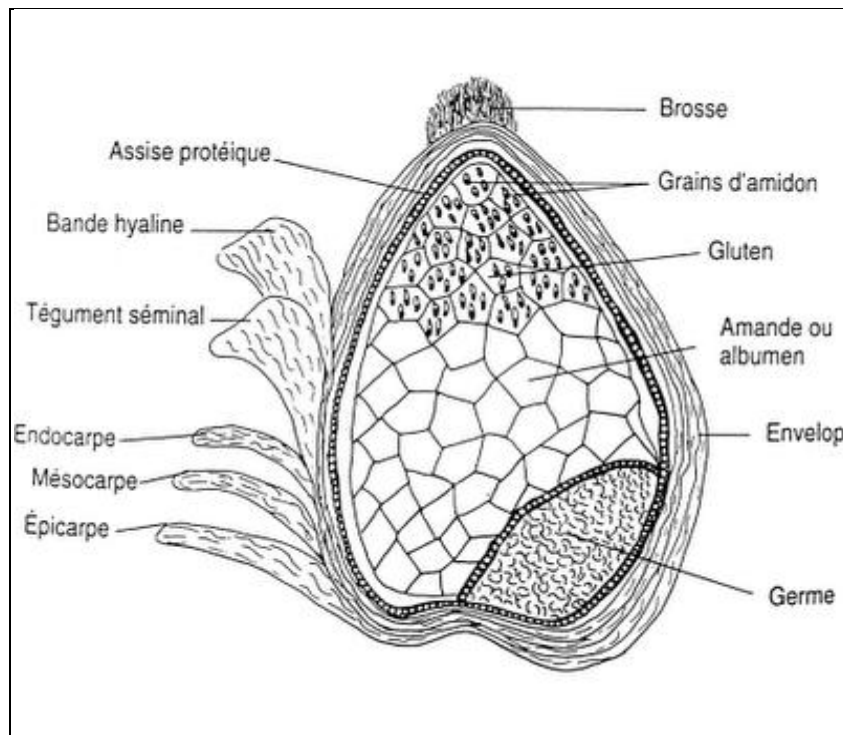


Figure.1: Coupe longitudinale d'un grain de blé

Le grain de blé est principalement constitué d'amidon (environ 70%), de protéines (10 à 15% selon les variétés et les conditions de culture) et de pentosanes (8 à 10%). Les autres constituants, pondéralement sont mineurs (quelques % seulement), sont les lipides, la cellulose, les sucres libres, les minéraux et les vitamines (Tableau. 1) (Feillet., 2000).

Ces constituants se répartissent de manière inégale au sein des différentes fractions histologiques du grain. L'amidon se retrouve en totalité dans l'albumen amylicé, les teneurs en protéines du germe et de la couche à aleurone sont particulièrement élevées; les matières minérales abondent dans la couche à aleurone. Les pentosanes sont les constituants dominants de cette dernière et du péricarpe. La cellulose représente près de la moitié de celui-ci, les lipides voisinent ou dépassent les 10% dans le germe et dans la couche à aleurone.

Tableau. 1: Distribution histologique des principaux constituants du grain du blé d'après Feillet (2000).

Constituants (% de la masse du grain)	Protéines (%)	Matières Minérales (%)	Lipides (%)	Matières Cellulosiques (%)	Pentosanes (%)	Amidon (%)
--	--------------------------	---------------------------------------	------------------------	---	---------------------------	-----------------------

Péricarpe (4%)	7- 8	3- 5	1	25- 30	35- 43	0
Téguments (1%)	15- 20	10- 15	3- 5	30- 35	25- 30	0
Reste du nucelle	30- 35	6- 15	7- 8	6	30- 35	10
Assise protéique	30- 35	6- 15	7- 8	6	30- 35	10
Germe	35- 40	5- 6	15	1	20	20
Albumen (82- 85%)		8- 13	0.35- 060	1	0.5- 3	70- 85

I .5.3. Classification du blé dur

La plupart des céréales, herbacée, annuelle, monocotylédone, appartiennent à la famille des Graminées et/ou Poacées. Ce sont: le blé, l'orge, l'avoine, le seigle, le maïs, le riz, le millet, le sorgho. Les unes appartiennent à la sous-famille des Festucoïdées: blé, orge, avoine, seigle; les autres à la sous-famille des Panicoïdées: maïs, riz, sorgho, millet.

Le blé dur est une céréale autogame appartenant à l'ordre des Graminales et/ou Poales, famille des Graminae et/ou Poaceae (Rudolphe, 2001). Une classification détaillée est donnée par le tableau ci-dessous (tableau 2).

Tableau. 2: Classification botanique du blé

Embranchement	Spermaphytes
Sous embranchement	Angiospermes
Classe	Monocotylédones
Ordre	Commélimiflorales
Sous ordre	Poales
Famille	Graminae ou Poaceae;
Genre et espèce	<i>Triticum durum</i>

I .5.4. Exigences du blé

I .5.4.1. Exigences édaphique

Le blé exige un sol bien préparé, meulé et stable, résistant à la dégradation par les pluies d'hiver pour éviter l'asphyxie de la culture et permettre une bonne nitrification au printemps. Sur une profondeur de 12 à 15cm pour les terres battantes (limoneuses en générale) ou 20 à 25 cm pour les autres terres et une richesse suffisante en colloïdes, afin d'assurer la bonne nutrition nécessaire aux bons rendements (Soltner, 1990). Particulièrement un sol de texture argilo-calcaire, argilo-limoneux, argilo-sableux ne présentant pas de risques d'excès d'eau pendant l'hiver.

Les séquences de travail du sol à adopter doivent être fonction du précédent cultural, de la texture du sol, et de la pente.

Le pH optimal se situe dans une gamme comprise entre 6 à 8. La culture de blé est modérément tolérante à l'alcalinité du sol dont la C.E.

I .5.4.2. Exigences climatiques

I. 5.4.2.1. Température

La majorité des variétés peuvent supporter un gel modéré pendant l'hiver si la plante est suffisamment développée. Par contre le blé ne supporte pas les fortes températures et les déficits hydriques en fin de cycle pendant le remplissage du grain. En effet, la température conditionne à tout moment la physiologie du blé. Une température supérieure à 0⁰C (le zéro de végétation) est exigée pour la germination, cependant l'optimum de croissance se situe entre 20 et 26⁰C. Un abaissement de la température pendant l'hiver est nécessaire à certaines variétés dite d'hiver, cette exigence conditionne la montaison et la mise à fleur (Clement et Prats, 1970).

I. 5.4.2.2. L'eau

L'eau joue un rôle important dans la croissance de la plante (Soltner, 1990), la germination ne se réalise qu'à partir d'un degré d'imbibition d'eau de 30%. En effet, c'est durant la phase épi 1Cm à la floraison que les besoins en eau sont les plus importants. La période critique en eau se situe entre 20 jours avant l'épiaison jusqu'à 30 à 35 jours après la floraison (**Loue, 1982**). C'est pour ça que le semis est toujours recommandé en culture pluviale.

I. 5.4.2.3. La lumière

La lumière est le facteur qui agit directement sur le bon fonctionnement de la photosynthèse et le comportement du blé. En effet, un bon tallage est garanti, si le blé est placé dans les conditions

optimales d'éclairement (Soltner, 1990). Une certaine durée du jour (photopériodisme) est nécessaire pour la floraison et le développement des plantes.

I. 5.4.2.4. Fertilisation

Les cultures annuelles telles que les blés craignent la carence en phosphore (P) et en Potassium (K) quand elles sont jeunes car leurs racines n'exploitent qu'une faible partie du sol. L'engrais doit donc être apporté en début de cycle et au plus près des jeunes racines.

Rôle des éléments fertilisants

L'azote

L'azote est un élément indispensable à la culture et la croissance du blé. En effet, c'est le pivot de la production de biomasse, du rendement et de la qualité des produits récoltés. C'est l'élément essentiel de la synthèse protéique par la formation du radical amine (NH₂) indispensable aux liaisons peptidiques (Mazliak, 1998).

Les besoins de la culture sont essentiellement azotés. Ainsi pour les satisfaire au mieux, il est conseillé de semer une culture de blé après un précédent cultural du type légumineux. Car la légumineuse laisse au sol une grande quantité d'azote sous forme organique. Dans le cas d'un apport unique, s'il est trop précoce, il entraîne la formation des talles, mais peut provoquer un risque de carences à la montaison. L'apport est dans ce cas mal valorisé. Situé en fin de tallage, il est beaucoup mieux utilisé. En effet après minéralisation, l'azote disponible à la montaison favorise la montaison et la formation des épis et se termine par un bon remplissage du grain et un taux protéique satisfaisant (Grignac, 1965). La meilleure façon d'apporter une fertilisation azotée est la technique fractionnée, c'est-à-dire diviser les besoins globaux de la culture en phases critiques de croissance telles que: la levée, le tallage et le début floraison.

Le phosphore

Le phosphore est un élément fondamental parmi les trois éléments majeurs (N, P, K) apportés par les engrais et le plus anciennement connu. Le phosphore se trouve dans la plante sous forme minérale (Duthil, 1973). Mais il est beaucoup plus fréquemment présent combiné sous forme organique. Sa répartition dans les tissus est très inégale et augmente généralement avec la teneur en azote (Gervy, 1970). D'après ce dernier auteur, la teneur des végétaux en phosphore est soumise à

des variations très importantes ; elle dépend principalement de la nature de l'espèce, de l'âge de la plante et de l'organe analysé ; elle dépend également, dans une moindre mesure, de la richesse du sol en P_2O_5 ; elle dépend enfin très faiblement de la présence d'autres éléments minéraux donnant lieu à des antagonismes avec l'acide phosphorique. Le phosphore joue également plusieurs rôles dans la vie des plantes. Il est considéré comme un constituant essentiel des chromosomes, il intervient partout où il y a multiplication cellulaire d'où l'importance du phosphore dans les phénomènes de croissance et de reproduction. Il joue aussi, un rôle déterminant dans le transfert d'énergie, il est indispensable à la photosynthèse et aux processus chimio-physiologiques de la plante (Lambert, 1979). Selon Moughli (2000), le phosphore participe dans :

- maturation des grains : des teneurs élevées en phosphore réduisent le temps de maturité et donne une paille plus solide.
- formation des graines nécessite du phosphore: des quantités importantes de phosphore sont stockées dans les semences.
- stimulation de la croissance des racines: un apport localisé de phosphore (et nitrate) entraîne une prolifération des racines dans cette zone. Par contre, on a constaté moins de réponse de la racine à des apports localisés de potassium ou d'ammonium.

Le potassium

Pour certains minéraux, la quantité présente dans le sol doit être supérieure à la quantité nécessaire; en effet ils peuvent être présents dans le sol, mais non disponibles pour autant pour la plante. Le potassium est essentiellement retenu par l'humus ou l'argile (dans certains sols, il pourra donc être perdu en grande quantité par lessivage). Le potassium n'est pas très mobile dans la plante. Il joue un rôle primordial dans l'absorption des cations, dans l'accumulation des hydrates des protéines, le maintien de la turgescence des cellules et la régulation de l'économie d'eau de la plante. C'est aussi un élément de résistance des plantes au gel, à la sécheresse et aux maladies. Il est essentiel pour le transfert des assimilats vers les organes de réserves (grains, bulbes et tubercules)

Les besoins en potassium des céréales peuvent être supérieurs aux quantités exportées par les récoltes à savoir 30 à 50 Kg de K_2O de plus par hectare, (**Belaid, 1987**). Dans un travail antérieur, Aissa et Mhiri (2000), ont montré que le blé dur a pu répondre à un apport potassique dans des sols titrant 364mg/ Kg de sol. Ces travaux ont montré que plus la conduite de la culture du blé est intensive, plus ce seuil est élevé.

I. 5.5. Phénologie du blé

I .5.5.1.Stade de semis

L'installation d'une culture de blé est très importante puisqu'elle conditionne le développement et la croissance des plantes. Le succès de cette installation dépend: du choix de la variété, adaptée au climat et au sol de la zone, de la date du semis, de la densité de semis et de la profondeur de semis.

Les systèmes de cultures ont favorisé divers types de blé:

- le blé d'hiver est semé à l'automne. Il caractérise les régions méditerranéennes et tempérées;
- le blé de printemps est semé au printemps dans les pays à hiver plus rude. La différence principale avec le blé d'hiver et le blé de printemps, est que ce dernier supporte assez difficilement les températures basses. C'est grâce à lui que la Sibérie occidentale et le Canada sont devenus de gros producteurs.

I .5.5.2. Stade germination- levée

La germination, la levée de dormance ou l'embryogénèse tardive, est la première phase du développement d'une plante (Figure. 2) (Tourte *et al.*, 2005), dans laquelle la graine retourne à la vie active après une période de dormance (Théron, 1964). Lors de la germination, l'embryon augmente dans le volume par le phénomène d'hydratation et l'utilisation des réserves qui dégagent progressivement les enveloppes qui l'entourent (Binet et Brunel, 1999). Selon Al-Ani *et al.*, (1982), La germination est régulée par des caractéristiques génotypiques mais aussi par les conditions liées au milieu (Ndour, et Danthru, 1982).

I .5.5.3. Stade levée-tallage

Selon **Soltner (1988)**, Cette phase est un mode de développement propre aux graminées, caractérisée par la formation du plateau de tallage, l'émission de talles et la sortie de nouvelles racines. Cette phase besoin des températures moyennes de 09 à 22°C respectivement (**Mekliche, 1983**). Le tallage est marqué par l'apparition d'une tige secondaire, une talle, à la base de la première feuille. Les autres feuilles poussent elles aussi leurs talles vertes. À l'intérieur de la tige, on peut trouver ce qu'on appelle la pointe de croissance. Elle commence à ressembler à un épi de blé. Initialement, la pointe est sous terre, protégée contre le gel. Au fur et à mesure de la reprise de la végétation, la pointe de croissance va s'élever dans la tige.

I .5.5.4. Stade tallage- montaison

Elle est caractérisée par la formation de talles et l'initiation florale qui se traduit par l'apparition de la future ébauche de l'épi; tout déficit hydrique durant cette période se traduit par une diminution du nombre de grains par épi (Martin, 1984). Dans cette phase, les entrenœuds de la tige principale se détachent du plateau du tallage, ce qui correspond à la formation du jeune épi à l'intérieur de la tige (Belaid, 1987). Couvreur en (1981), considère que ce stade est atteint quand la durée du jour est au moins de 11 heures et lorsque la culture a reçu au moins 600° C. (indice somme des températures depuis le semis). Parallèlement, on assiste à l'allongement des entrenœuds. Le stade (épi à 1cm) du plateau de tallage est caractérisé par une croissance active des talles. Le plant de blé a besoin, durant cette phase, d'un important apport d'azote.

À la fin de la montaison apparaît la dernière feuille sortie. En semis dense, cette feuille est essentielle car elle va à elle seule contribuer à 75% du rendement en grains. Juste avant la maturité, les plants issus d'un semis dense se concurrencent mutuellement entre eux, c'est même généralement la seule feuille encore vivante. Lorsque cette feuille est touchée, le poids de la récolte en grain devient compromis (Belaid, 1986). En effet, avec des plants serrés le poids unitaire des grains est déjà faible. De surcroît, cette faible distance entre chaque plant facilite la propagation des maladies. Au moindre stress, la céréale risque alors de donner des grains de très faible poids. On prévient dans l'immédiat cette baisse du rendement avec l'épandage préalable d'engrais et de pesticides, s'installe ensuite un phénomène de dépendance croissante à ces produits.

I .5.5.5. Stade d'épiaison

Cette période commence dès que l'épi apparaît hors de sa gaine foliaire et se termine quand l'épi est complètement libéré (Bahlouli et al.,2005). La durée de cette phase est de 7 à 10 jours, elle dépend des variétés et des conditions du milieu, (Martin, 1984).C'est la phase où la culture atteint son maximum de croissance. Chez le blé dur, c'est le moment où apparaissent les extrémités des barbes à la base de la ligule de la dernière feuille. Avant l'apparition de l'épi, on peut voir un gonflement de la graine. À ce stade, le nombre total d'épis est défini, de même que le nombre total de fleurs par épi. Chaque fleur peut potentiellement donner un grain, mais il est possible que certaines fleurs ne donnent pas de grains, en raison de déficit de fécondation par exemple.

I .5.5.6. Stade floraison- fécondation

La floraison s'observe à partir du moment où quelques étamines sont visibles dans le tiers moyen de l'épi, en dehors des glumelles. Quand les anthères apparaissent, elles sont jaunes; après

exposition au soleil, elles deviennent blanches à ce moment là, la fécondation est accomplie. Le grain de pollen des blés est monoporé et sa dispersion est relativement faible. Le nombre de fleurs fécondées dépend de la nutrition azotée et d'une évapotranspiration modérée (Soltner, 1988).

I .5.5.7. Stade remplissage des grains

Les plantes continuent leur croissance, elles stockent des réserves dans les graines. Il faut surveiller l'apparition de maladies ou de parasites pour intervenir rapidement. (Battinger, 2002). Cette phase est caractérisée par le grossissement du grain, l'accumulation de l'amidon et les pertes de l'humidité des graines par phénomène naturel de déshydratation qui marque la fin de la maturation (Soltner, 1988). Cette phase de maturation dure en moyenne 45 jours. Les graines vont progressivement se remplir et passer par différentes stades:

Phase de la maturité laiteuse

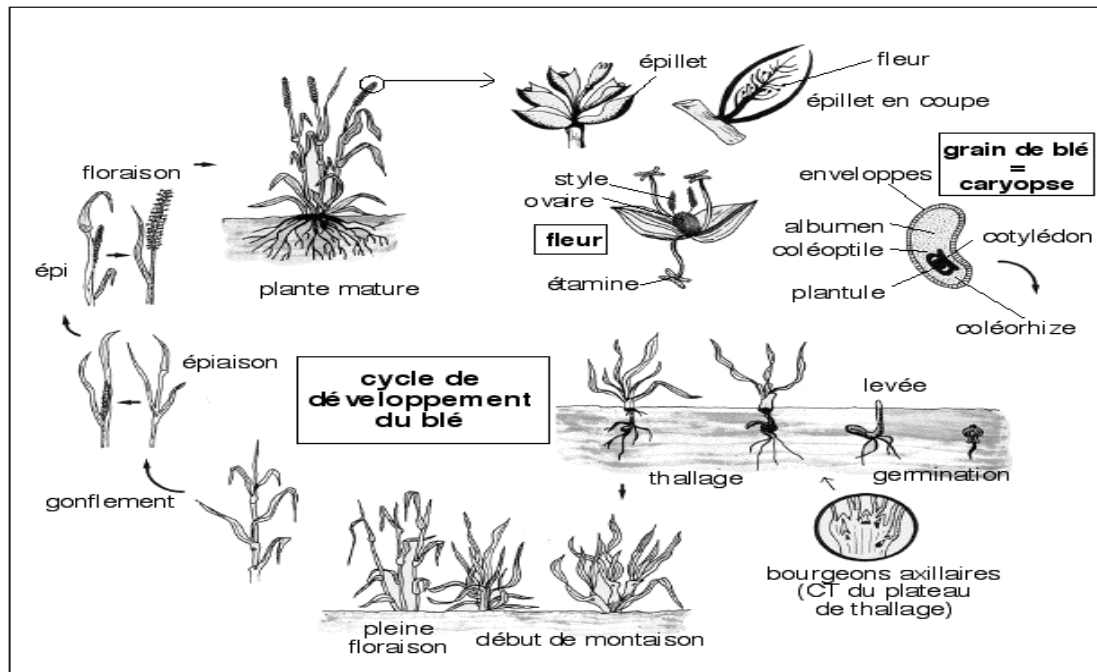
Ce stade est caractérisé par la migration des substances de réserves vers le grain et la formation des enveloppes. Le grain est de couleur vert clair, d'un contenu laiteux et atteint sa dimension définitive.

Phase maturité pâteuse

Durant cette phase, les réserves migrent depuis les parties vertes jusqu'aux grains. La teneur en amidon augmente et le taux d'humidité diminue. Quand le blé est mûr le végétal est sec et les graines des épis sont chargées de réserves (Soltner, 1988).

Phase maturité complète

Après le stade pâteux, le grain mûrit, se déshydrate. Il prend une couleur jaune, durcit et devient brillant. Ce stade est sensible aux conditions climatiques (Soltner, 1988).



Le cycle de développement du blé.

Figure. 2: Stades phénologiques du blé

Chapitre II:

Les Métaux Lourds Et Leurs Effets

CHAPITRE II: LES MÉTAUX LOURDS ET LEURS EFFETS

II.1. Généralités

Les métaux lourds, ou éléments traces métalliques (ETM), sont les éléments de la classification périodique formant des cations en solution. Ces éléments métalliques naturels, métaux ou métalloïdes (Dung Hunh, 2009) ont une densité de 5g/cm^3 , et une masse atomique d'environ 40 (Seregin and Ivanov, 2000).

Les métaux lourds (MT) sont divisés en deux catégories:

- **métaux essentiels** ou oligo-éléments, sont des éléments nécessaires à la vie des plantes et se trouvent en faible quantité tels que: le Fer (Fe), le Manganèse (Mn), le Zinc (Zn), le Cuivre (Cu) et le Molybdène (Mo).

- **métaux non nécessaires**, sont des éléments non indispensables à la vie des plantes et dans certains cas sont toxiques, même à de très basses concentrations dans la plante, de l'ordre du nanogramme ou du microgramme par kilogramme de matière sèche (MS), ils peuvent avoir un effet biologique, c'est le cas, du bore (Br), du plomb (Pb) et du nickel (Ni) et du cadmium (Cd). Bliefert et Perraud, (2009), nous informe que les métaux lourds sont sous différentes formes dans la nature:

- sous forme ionique.

- sous forme de complexes inorganiques et organiques (Plante *et al.*, 1998) ou,

- en solution ou absorbée sur des colloïdes ou des aérosols.

II.2. Pollution par les métaux lourds

II.2.1. Pollution d'origine naturelle

II.2.1.1. Le sol

Les métaux lourds trouvés naturellement dans la nature (Dung Huynh, 2009), proviennent soit de l'éruption volcanique qui est à l'origine de 80% de l'émission naturelle, soit des feux des forêts et les sources biogéniques (Abi Gahanem., 2008). Ils sont transportés par la suite, vers les sols soit par le vent, soit par les eaux de précipitation qui lessivent l'atmosphère et solubilisent les éléments traces métalliques avant de tomber sur les sols. Ou bien le lessivage des surfaces imperméabilisées par le ruissellement des eaux pluviales (Delmas et Gadras, 2000). Grâce à ses propriétés d'absorption et d'échange, pH, force ionique, présence de cation compétiteurs, le sol peut retenir jusqu'à un certain seuil de concentration en métaux. Ils sont le plus souvent stockés pendant les périodes sèches, remobilisés et entraînés pendant les périodes de pluie. (Massoud, 1992; Laperche *et al.*, 2004). La pollution des sols par les métaux lourds, peut modifier la structure du

sol. C'est pour cela, Thorez, en (1998), a établi des valeurs limites des concentrations des ETM admissibles dans les sols (Tableau.3).

Tableau. 3: Valeurs limites des concentrations des éléments traces admissibles dans les sols selon Thorez, (1998)

Eléments traces métalliques dans les sols	Valeurs limites par les sols (mg/Kg de MS)
Cadmium	2
Chrome	150
Cuivre	100
Mercure	1
Nickel	50
Plomb	100
Selenium	10
Zinc	300

A titre d'exemple, parmi ces ETM, le plomb, est par importance le 36^{ème} élément constituant l'écorce terrestre. Cette dernière en contient 14.8 mg.Kg⁻¹ de sol (Laperche, 2004), c'est-à-dire, 0.002% (Ceccechi, 2008) et la concentration de plomb dans le sol dépend la roche considérée (Tableau.4).

Tableau. 4: Concentration en Pb de différentes roches d'après Nriagu, (1978) in Laperche, (2004)

Roches	Type de roche	Teneur moyenne en Pb en mg Kg ⁻¹	Teneurs en gramme (g)
Magmatiques	Gabbro	1.9	0.4 à 6.4
	Andésite	8.3	0.6 à 36
	Syénite	13.9	4.7 à >50
	Granite	22.7	2 à > 200
	Eclogite	1.5	0.1 à 5.5
Métamorphiques	Marbre	3.9	0.9 à 7
	Gneiss et Schistes	17.6	0.4 à >100
	Granulite	18.5	0.5 à >50
Sédimentaires	Evaporite	0.2	< 0.01 à 4
	Calcaire et dolomie	6.7	<1 à >100
	Grés	9.8	<1 à >50

Dans le sol, le plomb est considéré comme un polluant primaire persistant, non biodégradable et ne perd pas sa toxicité avec le temps (Mielke et Reagan, 1998 ; Maaike *et al.*, 1997). Sa durée de vie dans le sol est d'environ 1700 ans (Jean et Laurence, 2004).

II.2.1.2.L'atmosphère

On parle de pollution atmosphérique ou de l'air ambiant, lorsque sa composition se trouve modifiée qualitativement et/ou quantitativement et les métaux lourds modifient relativement la composition de l'atmosphère lorsqu'ils se trouvent en quantités élevées (Ndoye, 2002).

Le plomb et le cadmium, à l'instar de la plus part des métaux présent dans l'atmosphère, se retrouvent principalement incorporés dans les particules atmosphériques. Et les concentrations de fond typique sont de l'ordre de 10 ng.m^{-3} pour le plomb et de 0.1 ng.m^{-3} pour le cadmium. (2006. Roustan, 2005). Sa dispersion dans l'atmosphère dépend de leurs propriétés physico-chimiques (solubilité, réactivité avec les constituants de l'air, etc.) (Richert *et al.*, 2006), et aux conditions météorologiques (vent, humidité, soleil) et la topographie locale (altitude, relief, cour d'eau) (El Yamani, 2006). Les travaux effectués par Czicz, en (2009) ont montré que le plomb change les propriétés des nuages et par conséquent, l'équilibre de l'énergie solaire qui affecte notre atmosphère.

II.2.1.3.Dans l'eau

Deux tiers (2/3) de la surface de la planète sont recouverte d'eau, mais 0.03% seulement de cette ressource est utilisable pour les activités humaine (Sébastien, 2005). Avec la pollution par les métaux lourds, le taux d'utilisation de l'eau est réduit, dans les mers, les lacs, et les eaux de ruissellements.

Les MT sont dissouts (Langlois et Shoterdijk, 1989) et changent très rapidement de structures chimiques en fonction des caractéristiques de l'eau, du pH, de la température (Boucheseiche *et al.*, 2002) et des conditions d'oxydoréduction (Laurent, 2002). Les concentrations obtenues varient respectivement de l'ordre de 0.08 à 0.4, et de 1 à $10 \mu\text{g/l}$ dans les eaux de ruissellement (Semmadi, 1989), $650 \mu\text{g/l}$ dans l'eau potable (Laurent, 2001). En présence de particules minérales et organiques, les ETM migrent vers le fond et se déposent dans les sédiments, en devenant un véritable réservoir de la pollution, source potentielle de contamination. (Afri *et al.*, 2009).

II.2.2.Pollution d'origine anthropique

Les métaux lourds d'origine anthropique sont plus important que ceux, d'origine naturelle, par exemple, le plomb rejeté dans l'environnement par les activités humaines est en quantité 300 fois supérieure que par les processus naturels (Maaike *et al.*, 1997).

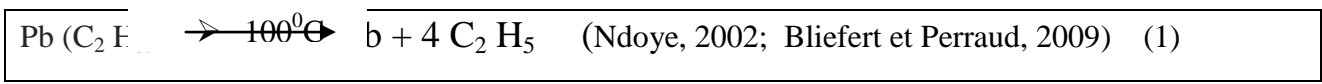
II.2.2.1.Pratiques agricoles

Les applications de la fertilisation (Jin *et al.*, 2010), notamment les engrais minéraux susceptibles de contenir de cadmium, de l'arsenic, du chrome et du vanadium (Faurie *et al.*, 1998 ; Ouanouki, 2009). Les amendements organiques sous forme de composts de déchets urbains et de boues de station d'épuration renferment fréquemment du cadmium, du cuivre, de zinc, du nickel, du mercure, du chrome, du plomb et du sélénium (Beesley et Dickinson, 2010 ; Boneau et Sohier, 1979). D'autres pratiques agricoles contribuent également à polluer le sol par les ETM, notamment:

- l'utilisation des herbicides (Jin *et al.*, 2010) comme moyen de lutte contre les mauvaises herbes,
- l'irrigation des sols par les eaux usées. Des travaux dans la ville de Settat au (Maroc) montre que cette application a engendré l'augmentation de la concentration en plomb et en zinc de 178ppm et 20.12ppm respectivement, dépassant la concentration maximale admise par un sol normal (100ppm pour le plomb) (Kao *et al.*, 2007). Pour le chrome et le cuivre d'autres travaux conduits toujours au Maroc ont montré l'élévation de l'ordre de 121.8 et 182µg/l respectivement. Ces teneurs alors serraient à l'origine d'une pollution importante dans le sol (Yatrabi et Najmeddine, 2000).

II.2.2.2.Source industrielle

Selon Michel (1992), les industries chimiques, sidérurgiques, métallurgiques rejettent de très nombreux métaux dans la nature (Figure.3 et 4). En effet, en (2006), les émissions de mercure s'élèvent à 8 tonnes, les émissions de plomb à 128 tonnes et environ 5000 tonnes par an de mercure sont à l'échelle mondiale rejetées par l'homme (Dupet, 1984). Sans oublier, la circulation automobile qui est la cause de 90% du plomb dans l'atmosphère (car il est ajouté à l'essence sous forme de tétraéthyle de plomb (Pb(C₂H₅)₄) comme produit antidétonant, dans les moteurs pour améliorer l'indice d'octane (indice de combustion). Il est décomposé en plomb et en radicaux éthyle selon la réaction suivante ci-dessous:



La figure (1) suivante ci-dessous résume les différentes voies de contamination par les métaux lourds :

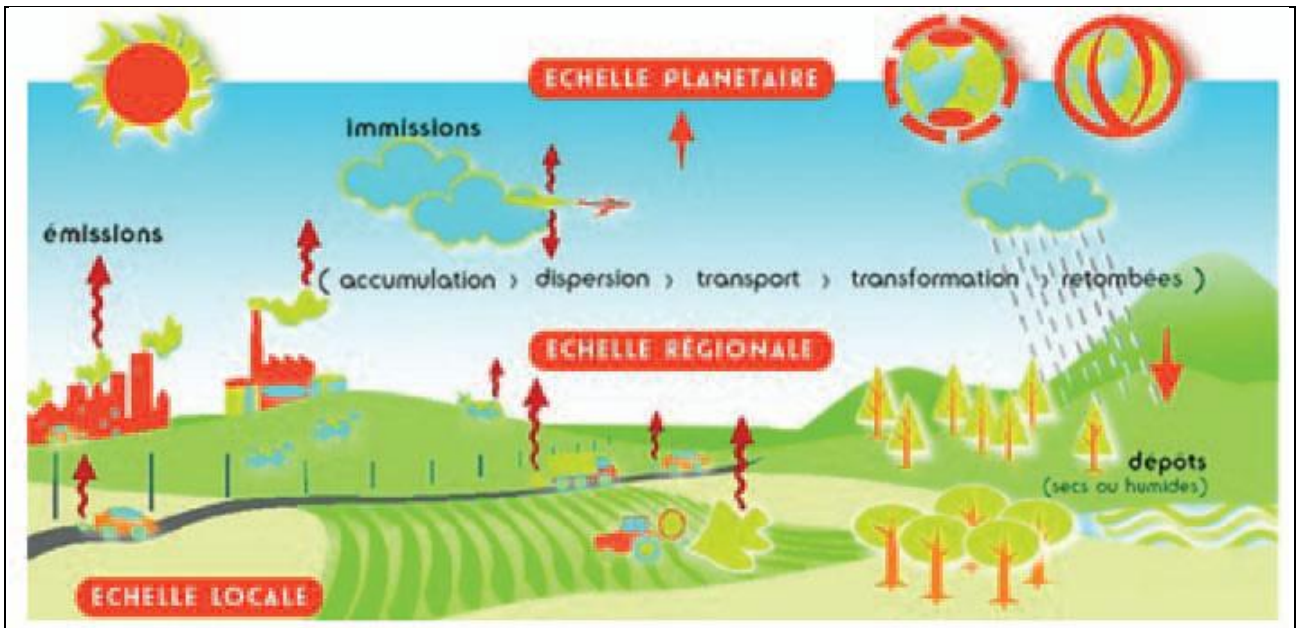


Figure.3: Pollution anthropiques par les métaux d'après Richert *et al.*, (2006)

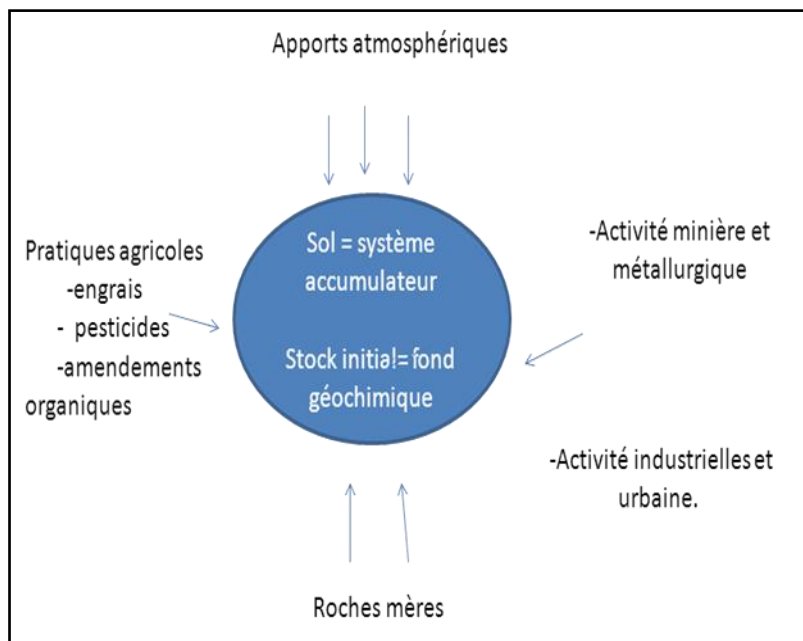


Figure.4: Schéma simplifié de l'origine des métaux lourds dans le sol, d'après Dung Hung, (2009)

II.2. Présentation du plomb

Le plomb provient du terme latin *plumbum*, de symbole (Pb), mou et déformable. Il possède une densité de 11.3 et se retrouve à l'air d'une couleur carbonaté grisâtre. Il n'a ni gout ni odeur caractéristique, de numéro atomique 82 et de poids atomique 207.2. Son point de fusion est de

327.4 °C et sa température d'ébullition est de 1500° C (Larousse 1980). Il est peu soluble dans l'eau froide, l'eau chaude et les acides dilués. Par contre, il se dissout dans l'acide nitrique, acide acétique et l'acide sulfurique concentré (Levesque, 1974). C'est le plus dense des métaux usuels, mais c'est aussi le moins dur (Jean, 2000). Le plomb natif est rare, il est extrait de minerai associé au zinc, à l'argent, et au cuivre (Parzys *et al.*, 2004). Le plomb est présent dans divers minerais mais le plus abondant est la galène (PbS), la cérusite (PbCO₃) et l'anglésite (PbSO₄). Il est un mélange de deux isotopes Pb²⁰⁶ et Pb²⁰⁸ (Levesque, 1974).

Les différentes voies de contamination de la nature par le plomb sont reportées dans la figure 5, qui résume les différentes sources de plomb de l'activité humaine et naturelle.

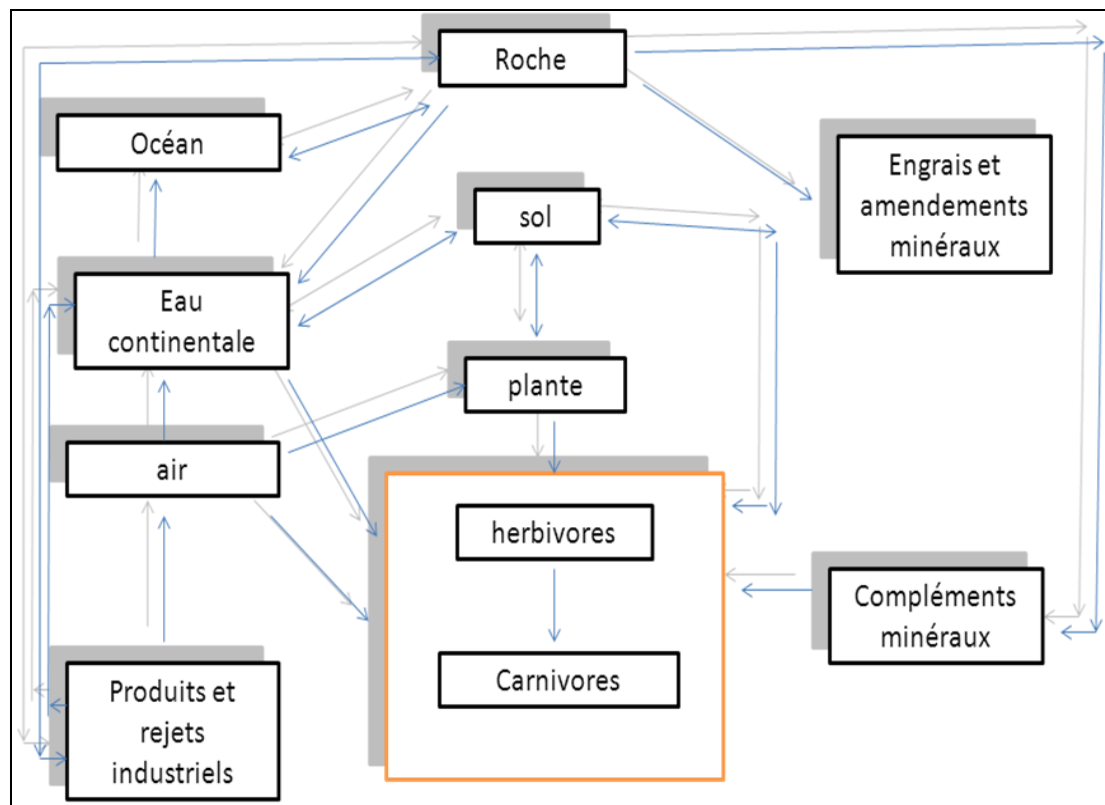


Figure.5: Origines de plomb dans la nature selon Lamand *et al.*, in Cecchi (2008)

II.2.2. Utilisation du plomb

Le plomb a été l'un des premiers métaux utilisés par l'homme, il y'a 7000 ans. Du fait de sa relative disponibilité et de ses propriétés physicochimiques (malléabilité, ductilité, bas point de fusion, propriété anticorrosive). La plus importante des utilisations de plomb environ (72%) entre dans la fabrication des batteries électriques (de démarrage pour automobile, de traction pour chariots automoteurs, batteries stationnaires) (Gérard, 2001 ; Ramade, 2007). Le reste est utilisé dans les radiateurs automobiles, munitions, alliages, enrobage de câbles, produit extrudés, feuilles de plomb, soudure, céramique, masse de lestage, réservoirs, tuyaux. Aussi, il est utilisé dans les

blindages, les projectiles, la peinture contre la corrosion, la verrerie chimique, le caoutchouc et la soudure. Patterson (1950), avait utilisé le plomb de par ses quatre espèces isotopiques de masse 204, 206, 207 et 208, pour la datation de l'âge de la terre (4.55 milliards d'années) (Allègre, 1990). Avec le développement des technologies modernes, le plomb est utilisé pour la protection contre les rayonnements dans la radioactivité médicale, et dans la fabrication d'appareils audiovisuels (Levesque, 1974).

II.3. Effets des métaux lourds sur les végétaux

II.3.1. Effets sur la germination et la croissance

L'augmentation du taux des métaux non essentiels dans les plantes exerce une toxicité (Prasad, 1999), affectant plusieurs étapes de développement, de la germination à la formation des feuilles. D'une manière générale, la plupart des métaux peuvent inhiber la germination et la croissance racinaire lors des premiers stades de développement (Dazy, 2008). Les racines sont les plus sensibles aux MT par rapport à d'autres organes végétaux, parce qu'elles sont les premières cibles de passage et d'accumulation de ces métaux (Seregin et Ivanov, 2000), particulièrement, les racines primaires qui sont plus sensibles que les racines latérales (Obrouscheva *et al.*, 1998). Les MT affectent l'élongation racinaire par l'ordre croissant suivant: $Cu > Cd > Fe = Zn > Pb$. Le mercure (Hg) est le métal le plus inhibiteur de la germination. Il provoque une inhibition complète dans les graines de blé et du concombre à des concentrations de 1.7mM et $\geq 1.5mM$ (Seregin et Kozidzinska, 1998). Même à faibles doses, le plomb inhibe la germination des grains qui ont les enveloppes perméables comme le petit pois *Pisum sativum* (Seregin et Ivanov, 2000). Par contre, les fortes doses conduisent à une inhibition totale de la germination chez le haricot. (Wixrzicka et obidzinska, 1998). Signalons par ailleurs, que certaines espèces comme le lin possèdent une forte résistance vis-à-vis de plomb. Celle-ci est sans doute due à une imperméabilité des téguments de son grain (Seregin et Kozidzinska, 1998). Par contre, les autres MT, comme (Cd) et (Se) diminuent le développement des racines de blé cultivé *Triticum aestivum* (Zembala *et al.*, 2009). Le niveau d'inhibition de la croissance de blé par le Cd est de 76.2% pour les racines, 62.7% pour les tiges et 55.6% pour les glumes (Jin, 2010).

Les symptômes remarqués pour la croissance, par un excès de cuivre (Cu) sont des chloroses et/ou nécroses des jeunes feuilles (Ouzounidou *et al.*, 1994). Une concentration trop élevée en manganèse (Mn) peut entraîner une nécrose de la coléoptile et des jeunes feuilles (Dazy, 2008). D'autres symptômes ont également été observés lors d'exposition à divers MT comme la diminution du nombre de poils absorbants, du diamètre des vaisseaux ligneux, de la taille et/ou vacuolisation du méristème, mais aussi une augmentation de la subérisation et de la lignification (Prasad, 1999). Ils résultent un désordre métabolique, provoquant une plasticité des cellules

membranaires (Seregin et Ivanov, 2000). Le Pb engendre également, des lésions nécrotiques et la sénescence des feuilles (Patra *et al.*, 2004) et diminue la croissance de blé tendre (Zembala *et al.*, 2009).

II.3.2. Effets sur la photosynthèse

Par l'exposition aux MT, les surfaces foliaires sont réduites et du coup l'accumulation des pigments photosynthétiques est faible (Patra *et al.*, 2004). En générale, la photosynthèse diminue (Seregin et Ivanov, 2000) et également le rendement photosynthétique peut chuter de plus de 50% (Bazzaz *et al.*, 1975). Cette diminution est due à l'altération de l'appareil photosynthétique comme le cas du cadmium et du cuivre, qui sont aussi capables d'altérer la structure et la composition des membranes des thylakoïdes (Lidons *et al.*, 1993).

En revanche, le plomb peut entrainer des changements de la composition lipidique membranaire et perturbe en particulier les flux de la chaîne photosynthétique de transport des électrons (Pourrut, 2008), conduisant ainsi à l'inhibition de la synthèse des pigments de la chlorophylle et des caroténoïdes (Seregin et Ivanov, 2000). La chlorophylle (b) semble plus sensible que la chlorophylle (a) (Vodnik *et al.*, 1999). Toutefois, cette sensibilité varie en fonction des espèces. Ainsi que le photosystème II (PS.II) qui est plus sensible que le photosystème I (PS.I) (Tableau.5). Il est la cible principale des MT comme le montre la figure 6 (Chugh et Sawhey, 1999).

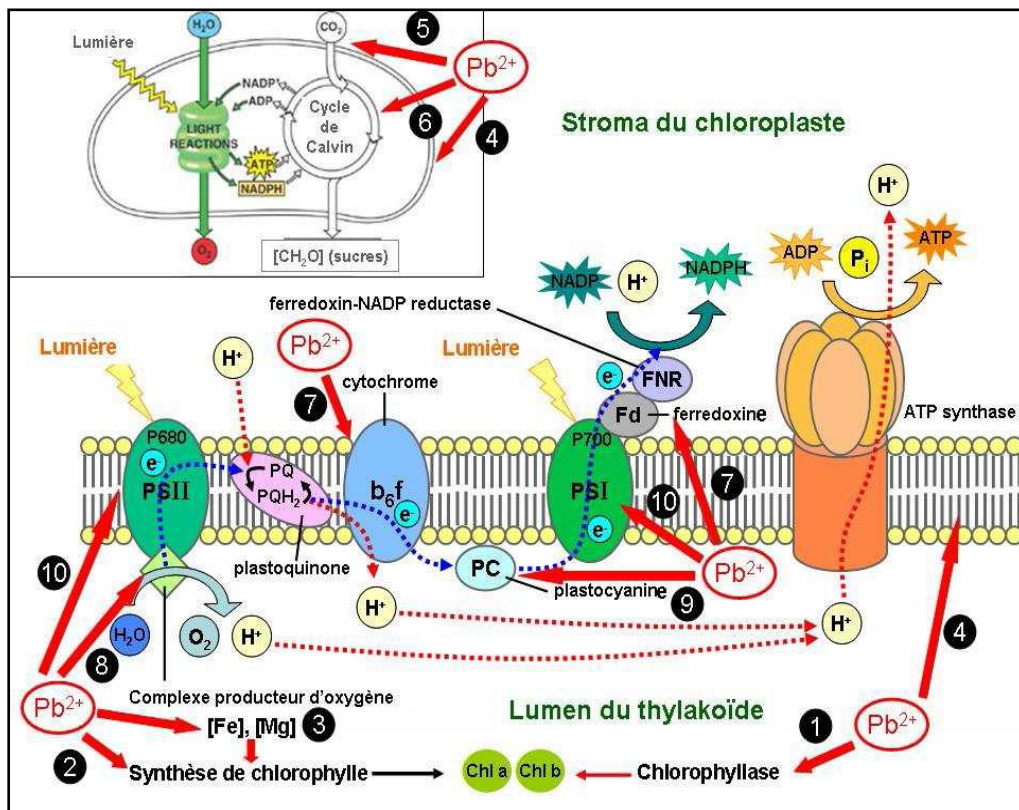


Figure .6: Les interactions possibles avec le plomb dans la photosynthèse d'après Pourrut, (2008)

Le plomb induit l'activité chlorophyllase dans les feuilles (1), l'inactivation de la synthèse des pigments par deux façons : d'une façon direct ; δ -aminolevelunate déshydratase ou ALAD qui est à la base de la synthèse de chlorophylle et dont l'ion Zn^{+2} est remplacé par Pb^{+2} (2), et d'une façon indirect : en induisant une carence en ces ions divalents (3), ces différents types d'interactions perturbent en particulier les flux d'électrons de la chaîne de transport d'électrons(4). Le plomb induisant une fermeture des stomates, limite considérablement les flux gazeux entre les feuilles et le milieu extérieur (5). Le plomb peut inhiber certains enzymes intervenants dans cycle de Calvin(6). De fait de la diminution de la concentration de certains minéraux observée dans les feuilles, le plomb perturbe fortement les photosystèmes, en effet ceux-ci contiennent des centres Fe-S, également présent dans plusieurs molécules intervenant dans la photosynthèse (cytochrome b6f, ferrédoxine) (7). De plus le complexe producteur d'oxygène contient quatre atomes de manganèse (8). La plastocyanine contient du cuivre (9). Les chlorophylles sont constituées d'un noyau tétra pyrrolique avec un atome de magnésium en son centre (10). Le plomb peut alors réagir avec ces molécules directement, en se substituant à leurs ions divalents et ainsi perturber la chaîne photosynthétique.

Tableau.5: Cibles des métaux au sein des chaînes de la réaction lumineuse de la Photosynthèse d'après Prasad, (1999)

Sites d'action	Métaux
Photosystème I (PSI)	Cu, Pb, Zn
Photosystème II (PSII)	Cd, Co, Cu, Hg, Ni, Pb, Zn
Plastoquinones (PQ)	Cd, Cr, Cu, Zn Cu, Ni
Cytochromes b6/f Plastocyanines (Pc)	Cu, Hg, Ni
Ferreodoxines (Fd)	Cd, Cu, Hg, Ni, Zn

II.3.3. Effets sur la respiration

Les MT réduisent automatiquement la respiration cellulaire et du coup provoque une chute du rendement photosynthétique. A forte concentration, la respiration est inhibée de 10 à 17% après une heure de traitement par 20mM de Pb et 28-40% après une durée de 3 heures (Pallavi et Rama, 2005). Par contre, à faible concentration de plomb, à 5mM de $Pb(NO_3)_2$ pour une durée

d'exposition de 24 heures, la respiration est stimulé (Romanowska *et al.*, 2002) notamment dans les feuilles détachées des plantes de petit pois, orge et maïs. Le tableau 6 montre bien les structures mitochondriales sensibles à l'action des métaux lourds.

**Tableau.6: Structures ou réactions mitochondriales sensibles à l'action des métaux
D'après Prasad, (1999)**

Structure ou réaction cible	Eléments exerçant une toxicité
Transporteurs de substrats	Hg, Pb
Systèmes de transfert des électrons	Hg, Pb, Zn
Transporteurs adénine/phosphate	Cu, Hg
Perméabilité aux ions K^+ , H^+ , Cl^-	Cd, Cu, Hg, Pb, Zn
Phosphorylation	Hg
Cycle de l'acide citrique	Cd, Cu, Hg, Ni, Pb, Zn

II.3.4. Effets sur le statut hydrique

Les MT en générale, perturbent le statut hydrique et provoquent la réduction de l'intensité transpiratoire. Le Pb et le Cd par exemple réduisent la surface foliaire (Seregin et Ivanov, 2000) qui est la zone principale de la transpiration de la plante (Iqbal and Mushtaq, 1987). Ce phénomène est accentué par la diminution des concentrations en molécules organiques cellulaires comme les sucres et les acides aminés agissant sur le maintien de la turgescence cellulaire (Barcelo and Poschenrieder, 1990). Cette modification de potentiel hydrique cellulaire, en particulier aux niveaux des cellules de gardes, pose des problèmes de régulation d'ouverture et de fermeture des stomates (Qureshi *et al.*, 2007), ce qui engendre une perturbation du statut hydrique entraînant un déficit hydrique (Patra *et al.*, 2004) modifiant ainsi, l'état globale de l'hydratation des cellules des plantes (Cecchi, 2008).

II.3.5. Effet sur les animaux

Les MT à fortes doses provoquent des perturbations au niveau du corps des organismes vivants. Par exemple, le Cd provoque une hypertension et des effets cancérigènes sur les animaux et l'homme (Sébastien, 2005). Il s'accumule en particulier dans le rein et le foie (El Edrissi, 2009). Le mercure est cancérigène, atteint le système nerveux et provoque des risques liés aux amalgames dentaires et engendre la maladie de l'Alzheimer (Grosman et Picot, 2009). L'arsenic fait des lésions de la peau, de la gangrène et cause des maladies cardiovasculaires, pulmonaires, hypertension, cancers et l'arsenicose (Blard, 2005). Pour le baryum, des études ont montré qu'une exposition de courte durée au baryum provoquerait un gonflement du cerveau, une faiblesse

musculaires et atteindrait le cœur, le foie, la rate (Barroso, 2007). Les seuils de toxicité des MT sont variables selon les espèces et les durées d'exposition (Tableau.7).

Tableau.7: Seuil de toxicité des MT pour les animaux et homme selon Quanouki, (2009)

Eléments	Seuil de toxicité pour l'homme (mg/l)	Seuil de toxicité pour l'animal (mg/l)
Cd	3- 300	0.05
Cr	200	1.0
Cu	250	0.5
Fe	200	/
Pb	1	0.1
Zn	150- 600	24

Pour l'intoxication par le plomb appelé saturnisme, les symptômes sont une grande fatigue, manque de concentration, de mémorisation, troubles du comportement et du sommeil, lésions cérébrales et séquelles (Laperche *et al*, 2004). Le Pb atteint le tissu sanguin, réduit le nombre des hématies et leur durée de vie, provoque l'ostéoporose (réduction de la croissance osseuse) et des néphropathies rénales (Schapman, 2004).

Les doses toxiques en Pb pour les différents animaux sont établi dans le tableau suivant ci-dessous.

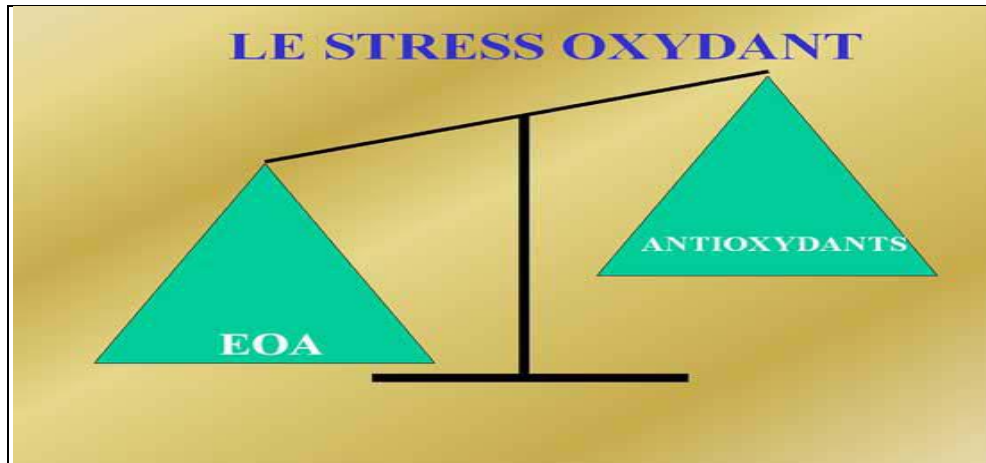
Tableau.8: Seuils de toxicité du plomb pour les animaux d'après Berny, (2005)

Espece	Toxicité aiguë (mg/Kg de PV)	Toxicité chronique (mg/Kg de PV)
Veau	50- 600	20-60
Bovins adultes	80-160	3.3-03.8
Moutons	290-570	4.4
Chèvres	400-800	6.2
Chien, Porc	800	/
Cheval	400-600	/

II.3
.6.
Au
niv
eau
cell
ulai
re

Le stress oxydatif est causé par la présence d'un excès des MT dans le cytoplasme cellulaire. Dans le milieu ambiant cet excès provoque une réaction toxique chez les plantes qui y vivent (Giguère,

2003) en générant une grande production de radicaux libres. Tout commence dans les années 1950 lorsque Den Harman spécialiste en chimie publie la première théorie radicalaire du vieillissement et du stress oxydant (Rousselot, 2007 ; Brack, 2010), qui est une conséquence naturelle du métabolisme de l'oxygène (Bourg, 2005) autrement dit c'est un déséquilibre entre la production des espèces réactives à l'oxygène (ERO) et leur élimination (Robert, 1998; Morel, 2007).



L'oxygène dans le cas naturel est important pour le métabolisme cellulaire aérobie. En effet, à l'état fondamental l'oxygène comporte 2 électrons célibataires sur la couche périphérique. La liaison covalente liant les deux atomes d'oxygène est forte, ce qui lui confère une bonne stabilité et une faible réactivité. Par ailleurs, en présence des MT, l'oxygène tente d'oxyder un autre atome ou une autre molécule en acceptant une paire d'électron, les deux nouveaux électrons, pour pouvoir occuper les places libres des orbitales de l'oxygène doivent avoir des spins parallèles. Or dans le Principe de Pauli, l'oxygène ne pourra donc accepter des électrons qu'un par un. Après avoir arraché un électron afin de l'apparier avec l'un de ses électrons célibataires, ces composés deviennent à leur tour instables, initiant une véritable cascade d'oxydoréduction (Ramel, 2009), En favorisant la formation des ERO. Comme le montre la réaction suivante ci-dessous (Figure.7):

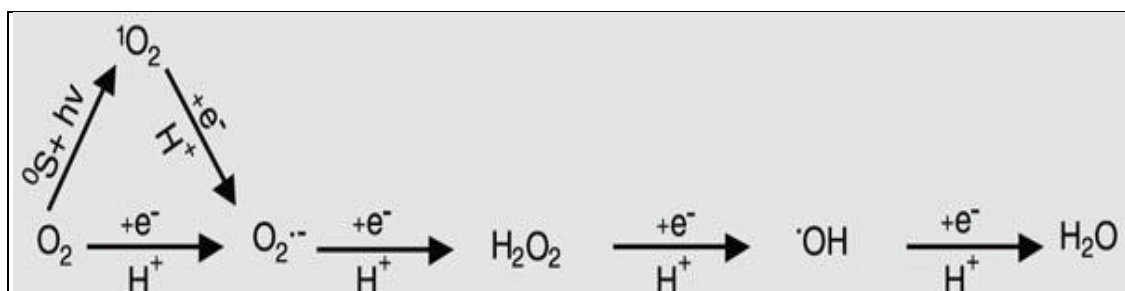


Figure 7: Espèces réactives de l'oxygène produites en cascade à partir de l'oxygène moléculaire d'après Scandalios, (2005)

De nombreux travaux de recherches ont révélé une production élevée de ERO chez les plantes exposées aux MT tels que le fer (Caro and Puntarolo, 1996), le zinc et le cuivre (Chao et al., 2008 ; Markovska et al., 2009), l'uranium (Nanhaoudt et al., 2008), le plomb (Seregin and Ivanov,2000 ; Qureshi et al., 2007 ; Pourrut, 2008), le sélénium (Zembala et al., 2009). Les

radicaux libres sont une forme particulière d'espèce chimiques (atomes ou molécules) qui possède un électron célibataire (ou non apparié) (Soares, 2005 ; Mecran, 2010). Ils sont appelés également forme active de l'oxygène, on distingue deux grandes classes de radicaux libres:

-les radicaux libres primaires, directement formé à partir de l'oxygène et les radicaux libres secondaires ou organiques générés par l'action des radicaux libres primaires (Pourrut, 2008). Parmi les ERO les plus connus: le radical superoxyde (O_2^-) qui est le premier radical formé à partir de l'oxygène, le radical hydroxyle (OH^\cdot), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou encore l'oxygène singlet (O_2^1). Ces espèces peuvent en effet altérer des cibles biologiques telle que: l'ADN ou les membranes cellulaires, l'oxydation des lipides et des protéines et conduisent à la sénescence des plantes puis à leur mort (Chaaya, 2010). Ces espèces viennent de différents organites (Figure.8).

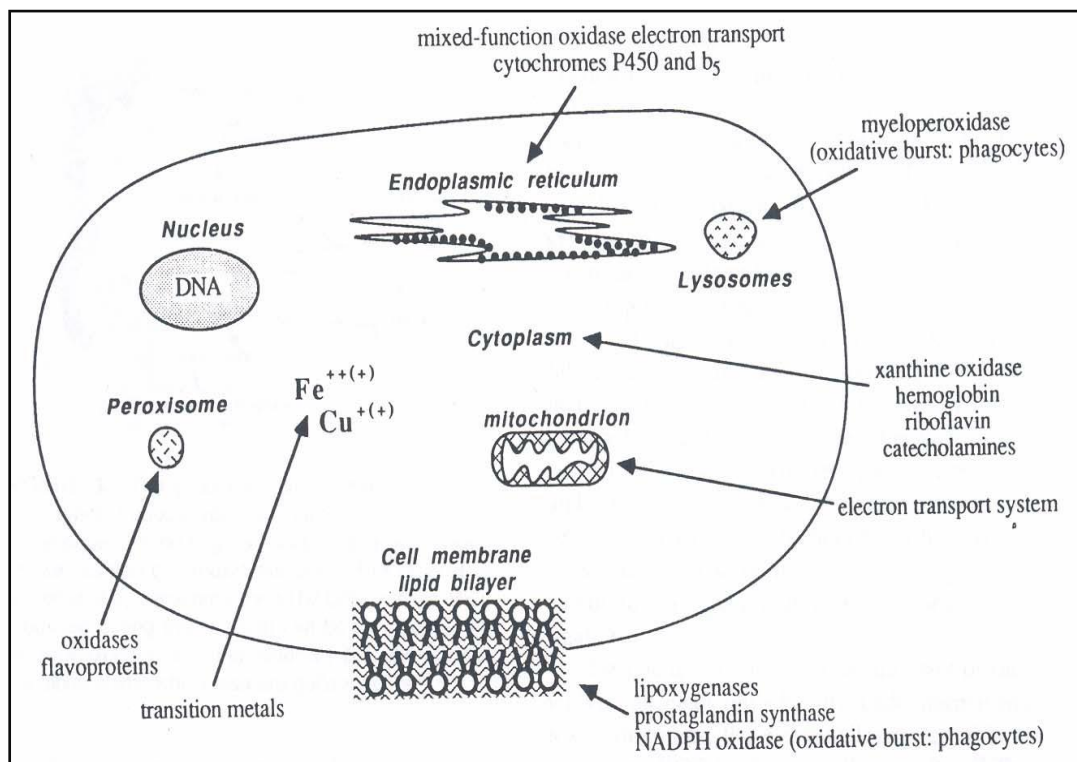
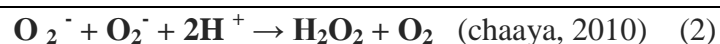


Figure.8: Sources cellulaires de radicaux libres d'après Kehrer, (1993).

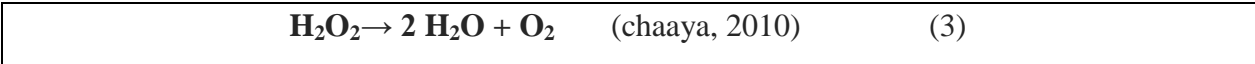
Pour combattre ces ROS, les cellules végétales disposent de deux grands types de défense:

Un système enzymatique, visant à détruire les ROS (tableau.9):

-Les superoxydes dismutases (SOD) qui peuvent éliminer l'anion superoxyde par dismutation, pour former de l'oxygène et de l'eau. (Cecchi, 2008)



-Les catalases, qui détruisent le peroxyde d'hydrogène, en aboutissant également à la formation d'oxygène et de l'eau.



-Les peroxydases, détruisant également le peroxyde d'hydrogène en formant de l'eau.

La figure 9 ci-dessous montre la localisation des différentes voies enzymatiques de détoxication des ROS au niveau d'une cellule végétale.

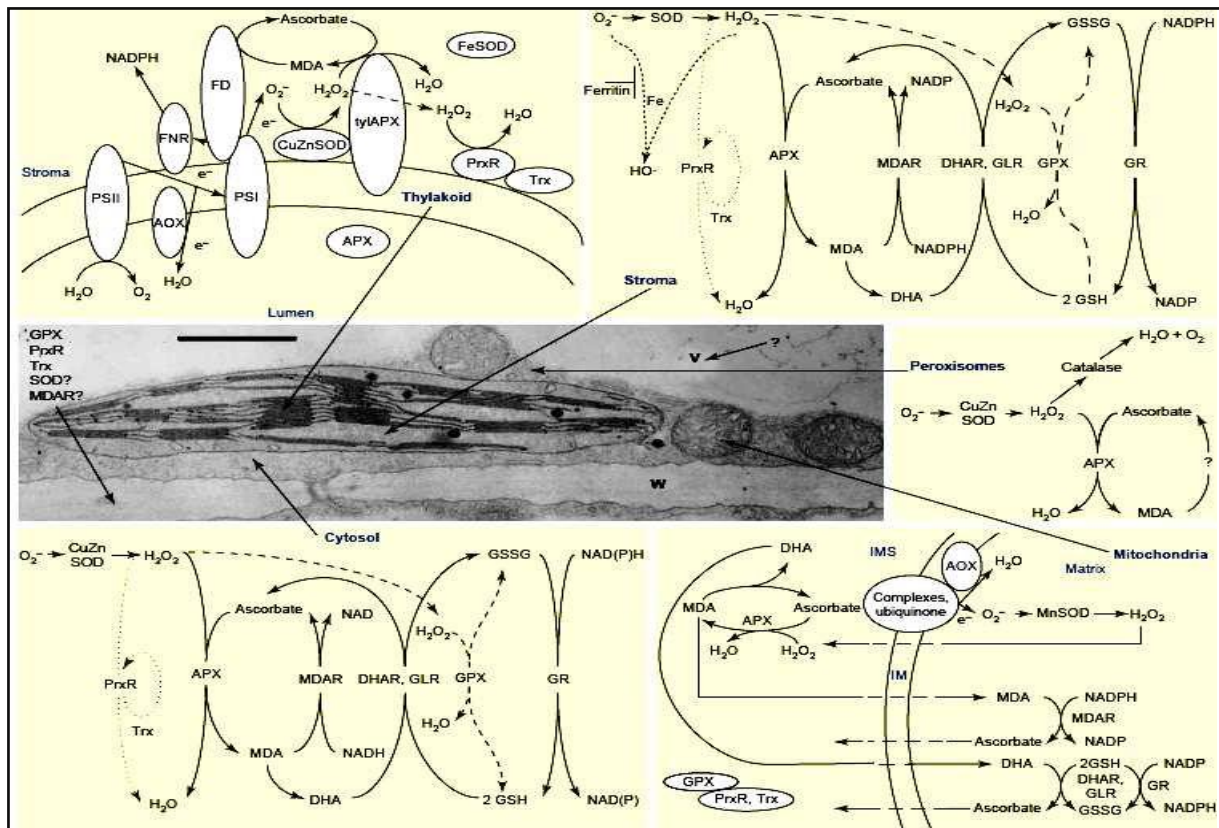


Figure.9: Représentation de la localisation des différentes voies enzymatiques de détoxication des ROS au niveau d'une cellule végétale d'après Mittler *et al.*, (2004).

Les superoxydes dismutase (SOD): dans les plantes il y a trois types de SOD contenant des groupements prosthétiques renfermant des métaux différents : du fer (FeSOD), du manganèse (MnSOD) ou du cuivre et zinc (CuZnSOD). Toutes catalysent la dismutation des superoxydes en dioxygène et peroxydes d'hydrogène. Les SOD se retrouvent à la proximité de production de O_2^- les MnSOD sont localisés principalement dans la matrice de la mitochondrie, dans la matrice de la glyoxysome ou lié à la membrane des peroxysomes des cellules foliaires. FeSOD se situent essentiellement dans le stroma des chloroplastes et chez quelques espèces particulières, dans les matrices des peroxysomes et des mitochondries. Les CuZnSOD se retrouvent sous forme libre dans le cytosol, dans les peroxysomes ou apoplaste, il existe toutefois une CuZnSOD lié à la membrane des thylakoïdes au niveau du PSI. Les catalases (CAT) se situent à la proximité de CTE chloroplastique dont le rôle est détoxiqué le peroxyde d'hydrogène. L'ascorbate peroxydase (APX) présente dans tous les compartiments cellulaires, dans le cytosol et dans l'apoplaste. L'APX catalyse la réduction du peroxyde d'hydrogène en utilisant l'ascorbate comme co-substrat. Le MDH issue de cette réaction peut

ensuite être pris en charge par la monodéhydroascorbate réductase (MDHAR) catalysant sa réduction en ASC en utilisant du NADPH. La deuxième enzyme intervenant dans la régénération de l'ascorbate, la déhydroascorbate réductase (DHAR), catalyse la réduction du DHA en ASC, via l'oxydation de deux molécules de GSH. La dernière réaction de ce cycle est la réduction du GSSH par une flavoprotéines, la glutathion réductase (GR).

Tableau.9: Rôles et localisations subcellulaires des principales enzymes antioxydantes

Enzyme antioxydant	Cibles	Produit final	Localisation	Références
Superoxyde dismutase (SOD)	$O_2^{\cdot -}$	H_2O_2	Chloroplaste, mitochondrie, peroxyosome, apoplaste et cytosol	Bowler <i>et al.</i> , 1992
Catalase (CAT)	H_2O_2	H_2O	Peroxyosome, cytosol	Willekens <i>et al.</i> , 1997
Ascorbate peroxydase (APX)	H_2O_2	H_2O	Chloroplaste, mitochondrie, peroxyosome, apoplaste et cytosol	Asada et Takahashi, 1987; Asada, 1999
Glutathion réductase (GR)	$O_2^{\cdot -}$, OH^- , ascorbate oxydé,	/	Cytosol, mitochondrie, stroma, peroxyosome	Mittler <i>et al.</i> , 2004
Déhydroascorbate réductase	DHA	Asc	Cytosol, plaste	Mittler <i>et al.</i> , 2004
Monodéhydroascorbate Réductase (DHAR)	MDA	Asc	Stroma des plastes	Mittler <i>et al.</i> , 2004
Glutathion peroxydase (GPX)	H_2O_2 , ROOH	H_2O , ROH	Cytosol, chloroplaste, mitochondrie, apoplaste et peroxyosome	Milla <i>et al.</i> , 2003

Un système non enzymatique, avec des macromolécules capables de piéger ces ROS:

-l'acide ascorbique (Vit C), est une vitamine hydrosoluble, qui se trouve dans le cytosol et dans le fluide extracellulaire. Elle peut capter directement l' $O_2^{\cdot -}$ et l' OH^- (Keskas, 2011).

-les tocophérols (Vit E), se fixe à la membrane cellulaire et inhibe la chaîne de réactions de peroxydation des lipides en capturant un radical lipidique peroxyde (LOO[•]). Elle devient à son tour un radical moins actif que le LOO[•] et pourra alors être pris en charge par une autre molécule antioxydante (Hasani, *et al.*, 2007).

-les caroténoïdes sont des pigments liposolubles de couleur jaune, orangée à rouge, (Keskas, 2011). Ce sont des piègeurs de l'¹O₂ et de LOO, mais ils peuvent également neutraliser les radicaux libres.

-le glutathion, est un tripeptide (Glu-Cys-Lys) présent dans la plupart des cellules et compartiments cellulaires. Du fait de sa concentration élevée, il a un rôle essentiel dans le maintien de l'état redox de la cellule. Il peut également participer à la régénération des vitamines E et C en transférant un atome d'hydrogène à leurs radicaux respectifs. Enfin, il participe à des réactions enzymatiques qui contribuent aux défenses antioxydantes.

II.4. Modes de contamination par les métaux lourds

II.4.1. Contamination au niveau des racines

Selon Baize *et al.*, (2005) le plomb est considéré par tous les auteurs comme très mobile et très peu phytodisponible. Mais il faut signaler l'exception notable des podzosols par lesquels le processus naturel de transfert de composés organométalliques (Fe-Mo ou Al-Mo). En effet, les plantes absorbent les métaux contenu dans le sol via le système racinaire ; dans la surface, le plomb s'unit avec les composés carboniques de mucilage des acides uroniques (Seregin et Ivanov, 2000). Dans d'autres travaux de recherche, il est mentionné que le transfert des métaux lourds du compartiment sol vers les plantes se fait par diverses voies et souvent liés à de nombreux micronutriments (Patra *et al.*, 2004):

Métal classe A: (K, Ca, Mg) préfère se lier aux oxygènes riches.

Métal classe B: (Hg, Pb, PC, Au): préfère se lier aux sulfure et nitrogène.

Autres métaux: (Cd, Cu, Zn).

II.4.2. Voies de contamination des végétaux par le plomb

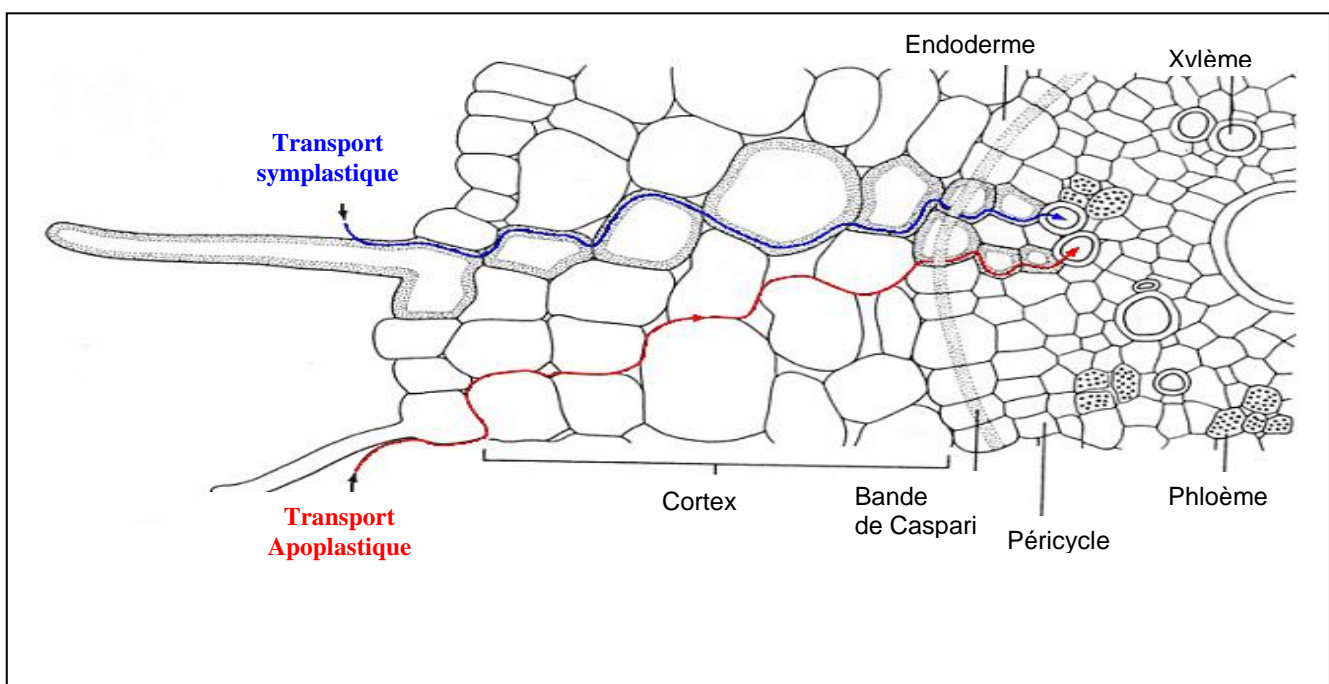
Après pénétration dans les organes végétaux, le plomb passe par deux voies principales:

II.4.2.1. Voie apoplastique

De nombreuses études histologiques ont permis de montrer que le plomb était transporté essentiellement dans l'apoplaste, c'est-à-dire via les espaces intercellulaires et qu'il suivait les

mouvements d'eau à l'intérieur de la plante (Tanton and Crowdy, 1971; Lane and Martin, 1977) (Figure.10, 11). Bien qu'il arrive à diffuser dans la racine, et même à être transféré vers les parties aériennes, seule une faible fraction du plomb présent dans la racine est mobile. Plus de 90% se retrouve sous forme insoluble (Ernst, 1998; Wierzbicka *et al.*, 2007) et est fortement lié aux enveloppes cellulaires externes. Le plomb est principalement lié aux parois (Tung and Temple, 1996; Wierzbicka, 1998), mais peut se trouver associé à la lamelle moyenne (Jarvis and Leung, 2001, 2002) ou à la membrane plasmique (Seregin *et al.*, 2002; Seregin *et al.*, 2004). Il peut également être précipité dans l'espace intercellulaire (Jarvis and Leung, 2001).

Cette répartition, très spécifique du plomb, s'explique par son affinité particulière pour les groupements carboxyles présents sur les molécules de surfaces des parois. Ces sites chargés négativement sont généralement liés à des cations comme le calcium. Les ions Pb^{2+} rentrent donc en compétition avec les ions Ca^{2+} pour l'accès à ces sites (Lane *et al.*, 1978), mais également aux sites de liaison entre molécules de pectines, dans la matrice pariétale. Bien que cela soit dans une moindre mesure, il peut exister des liaisons Pb-O avec des molécules d'hémicelluloses et de celluloses, composants importants des parois primaires et secondaires. Ce type de liaison peut également se former avec des molécules de lignine rentrant dans la composition des parois secondaires (Marmioli *et al.*, 2005). Cette forte affinité pour les composants pariétaux peut expliquer la faible mobilité de ce métal par rapport à d'autres ETM comme le cadmium, dont seulement 56% se retrouvent adsorbés aux constituants cellulaires (Wierzbicka *et al.*, 2007). Cette propriété du plomb serait aussi une des raisons de sa moindre toxicité dans les cellules végétales (Seregin *et al.*, 2004).



II.4.2.2.Voie symplastique

Le passage du plomb par la voie symplastique se fait en même temps que par la voie apoplastique (Figure.10, 11) (Lane et Martin, 1978). La quantité de ce métal passant par cette voie est marginale par rapport à la voie apoplastique, et peu d'études en ont fait état. Cependant, elle a une importance capitale dans la toxicité du plomb car c'est cette fraction, passant par le symplaste, qui cause la majorité des effets délétères observés (Figure. 11). À des doses non létales, le plomb pénètre uniquement dans le symplaste dans les zones de divisions cellulaires actives, comme la zone apicale (Tung and Temple, 1996) ou le protoderme (Wierzbicka, 1998). En effet, les cellules jeunes ne possèdent pas encore de paroi secondaire et leur paroi primaire est très fine. L'accès à la membrane plasmique est donc facilité dans ces zones racinaires. Le plomb symplastique peut se retrouver confiné dans certains compartiments cellulaires, comme les vacuoles (Małecka *et al.*, 2008 ; Meyers *et al.*, 2008), les vésicules dictyosomales (Malone *et al.*, 1974), les vésicules du réticulum endoplasmique (Wierzbicka *et al.*, 2007) ou les invaginations tubulaires de la membrane plasmique, les plasmatabules (Wierzbicka, 1998). A des doses létales, le plomb pénètre dans tous les tissus racinaires, et les membranes plasmiques ne semblent plus jouer leur rôle de barrière physique (Seregin *et al.*, 2004). A ces concentrations, le plomb induit une désorganisation de ces dernières. Il peut alors entrer massivement dans le cytoplasme, le noyau et les différents organites, y compris ceux possédant des doubles membranes, comme les mitochondries (Małecka *et al.*, 2008).

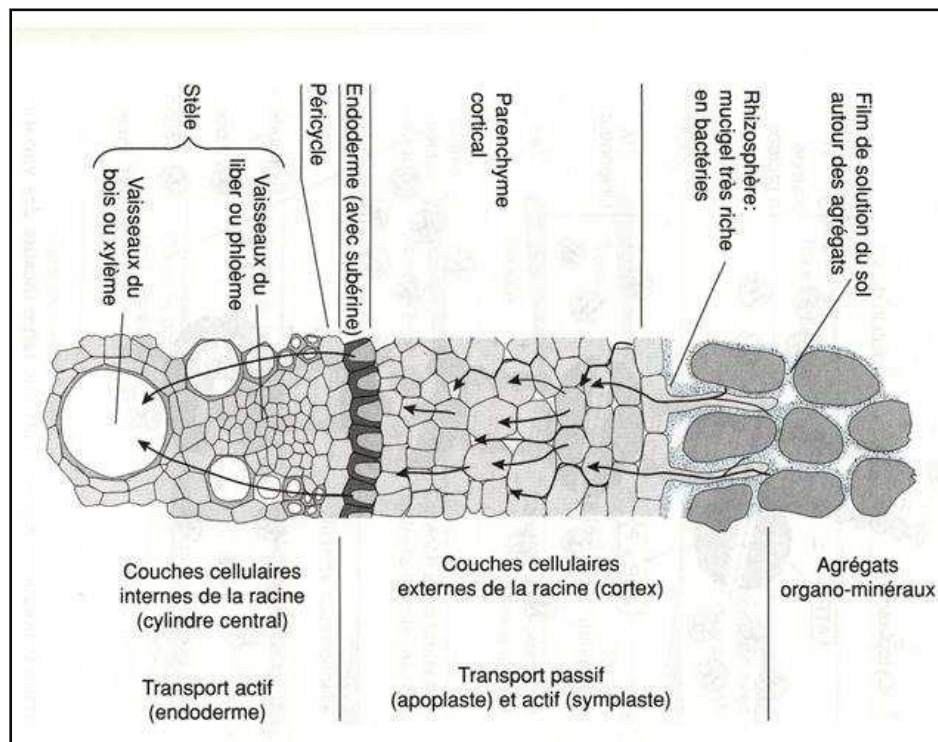


Figure.11: Dessin d'une coupe transversale (CT) de racine, avec la diffusion radiale des ions selon les voies symplastique et apoplastique d'après Gobat *et al.*, (1998)

II.4.3. Conditions d'absorption des métaux par la plante

L'aptitude des métaux lourds à être libérés dans la solution du sol est fonction du pH du sol. Plus celui-ci est faible (< 6), plus certains métaux sont facilement susceptibles d'être libérés et migrer vers la plante (Yatrabi et Nejmeddine, 2000). Par ailleurs, l'addition de matière organique au sol diminue la disponibilité du plomb pour les plantes. Les teneurs les plus élevées des métaux lourds sont trouvées dans les sols argileux, ceci démontre bien que l'accumulation des métaux dans les sols est fonction des groupes texturaux avec la relation: Argileux $>$ limoneux $>$ sableux. Enfin, La phytodisponibilité est relative à la plante et à son stade de développement (Ablain, 2002).

II.4.2. Contamination aérienne (voie foliaire)

La contamination des végétaux par les métaux lourds, vient avant tout des parties aériennes (Figure.12), les poussières contenant des métaux lourds ne pénètrent pratiquement pas les plantes, mais elles s'y accumulent en formant un dépôt inerte à leur surface. Et elles peuvent pénétrer sous certaines conditions de précipitation et d'acidité (Lefèvre, 1998.).

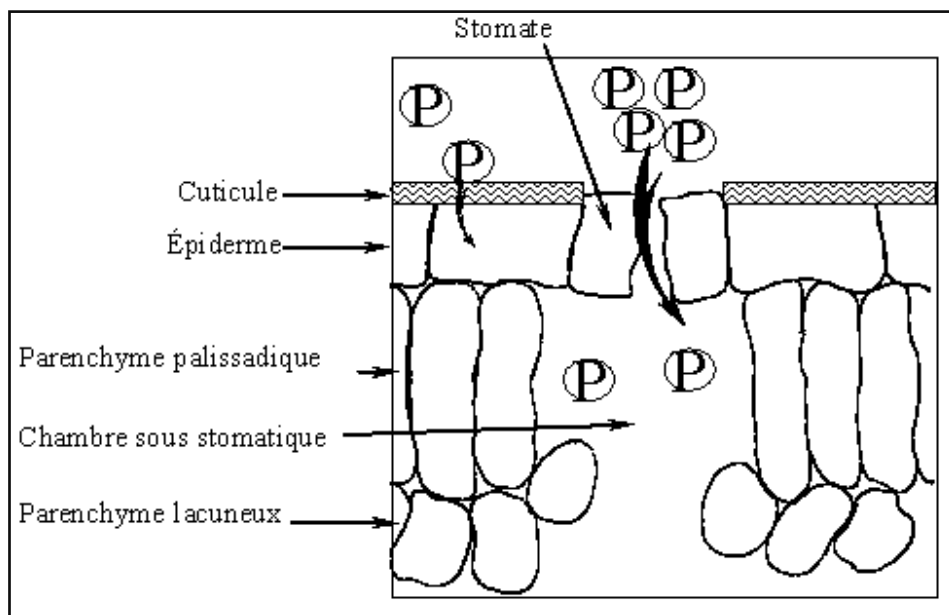


Figure. 12: Les différentes voies d'entrée des polluants dans les feuilles d'après Cuny *et al.* (2006)

II.5. La phytoremédiation

En 1934, une étude comparative entre une population provenant d'une mine de cuivre et une population non minière de l'espèce: *Melandrium sylvestre*, conduisait pour la première fois à l'idée

de la résistance à un métal en tant que résultat de la sélection naturelle (Prat, 1934). Ensuite il a fallu attendre les années 50 pour que ces études se poursuivent de manière indépendante en grande Bretagne et en Allemagne pour démontrer la tolérance aux MT. Cette capacité des espèces métallophytes à survivre et à se reproduire sur un sol métallifère, est aujourd'hui, utilisée comme moyen biologique appelé phytoremédiation pour dépolluer les sols (Frerot, 2004). Donc, la phytoremédiation est définie comme étant l'utilisation des plantes pour nettoyer les sols, l'air et les eaux (Vavasseur et Peltier, 2003) et transformer les polluants en composés moins toxiques (Jemal et ghorbal, 2002 ; Frérot *et al.*, 2009). Elle peut être utilisée sur des substances solides, liquides ou gazeuses (Pilon, 2005), *in-situ* ou *ex-situ* (Cunningham et Berti, 1993). En effet, Les végétaux ont un système racinaire très étendu qu'ils utilisent pour extraire l'eau et les minéraux du sol nécessaire à leur croissance, lors de cette extraction, ils absorbent aussi d'autres composés dissous dans la phase aqueuse. Cette caractéristique est importante dans le processus de phytodépollution, car les végétaux sont capables d'absorber de grandes quantités d'eau qu'elles puissent à des profondeurs de 2 à 5 m, voire plus pour certaines plantes comme la luzerne. En effet, les plantes résistantes ou adaptées aux métaux lourds, ont développé des systèmes biochimiques pour l'adaptation aux contraintes géochimiques locales mais aussi pour la modification de leur environnement direct. Après l'absorption d'un polluant, les plantes peuvent soit le séquestrer dans un compartiment cellulaire sous forme de sels pour limiter son interaction avec le fonctionnement cellulaire normal, soit le dégrader et/ou le métaboliser pour neutraliser sa toxicité (Vila, 2006). La phytoremédiation comme moyen de dépollution des sols fait intervenir plusieurs mécanismes permettant aux plantes l'élimination des MT (Schnoor, 1997 ; Schroder et Collin, 2002 ; Susurla *et al.*, 2002 ; Pilon, 2005 ; Campos *et al.*, 2008).

II.5.1.La Phytoextraction

La phytoextraction apparaît la meilleure approche pour éliminer les contaminants du sol (Figure. 15) (Ghosh et Spingh, 2005 ; Henry, 2000 ; Eapen et D'Souza, 2005). Elle consiste à utiliser des plantes dites hyper accumulatrices (Grath *et al.*, 2001). Pour de plus amples renseignements, une plante est considérée comme hyperaccumulatrice quant elle peut accumuler en grande quantité les MT sans que cela n'affecte leur vie (figure.13)(Dubois, 2005). Ces plantes remarquables accumulent précisément les MT en générale jusqu'à 1 à 5% de leurs poids sec (PS), stoker 0.1% (m/m) de Ni, de Co, de Cu ou de Pb, 1.0% de Zn et 0.01% de Cd (Baker et Brooks, 1989; Baker et al, 2000). Ceci à été proposé depuis une quinzaine d'années (Cunningham et al, 1995), car ces plantes ont la faculté d'extraire du sol des polluants et de les concentrer dans les parties aériennes ou racinaires, qui sont ensuite récoltées puis incinérées ; les cendres sont alors mis en décharge ou, mieux réutilisées en métallurgie. Grace à la photosynthèse, ces plantes peuvent être considérées, comme de véritables pompes solaires à produits toxiques. *Thlaspi caerulescens*, par

exemple, est une métallophyte capable d'accumuler dans des parties aériennes des quantités de zinc pouvant représenter 1.7% de la masse sèche des feuilles. Les plantes utilisées par cette technique doivent avoir une tolérance accrue aux métaux lourds, sorte d'aptitude extrême à accumuler les polluants dans leurs parties aériennes (feuilles, tiges), une croissance rapide et une forte production de biomasse récoltable.

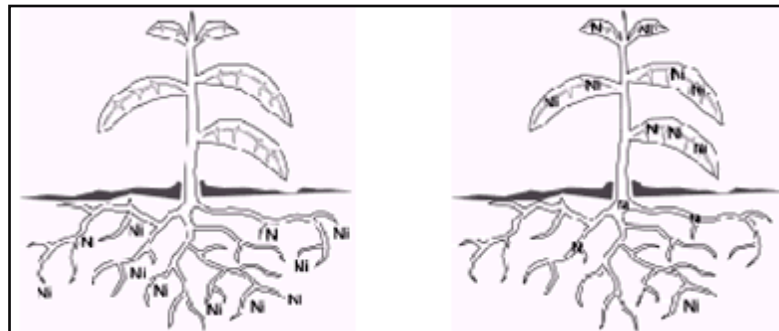


Figure. 13: Phytoaccumulation du nickel par une plante d'après United Nations Environment Programme (2005)

Plus de 400 espèces sont connues pour leurs propriétés accumulatrices de MT (Melanson, 2006). Comme *Alyssum sp*, *Thlaspi sp*, *Brassica sp*, *viola sp*, *Astragalus sp* Reeves et Baker, 2000) (figure 14), *vertiver grasse* (Truong, 1998). Pulford et Watson, (2003) passent en revue l'état de la recherche de la phytoremédiation des MT par des essences ligneuses: *Betula pendula* et *Salix viminalis* et montrent leurs capacités naturelles à accumuler le Zn.

Pour l'accumulation du Pb: *Cistus libanotis* accumule 1820mg/Kg de Pb dans la plante pour un sol en contenant 725mg/Kg (Laplaze *et al.*, 2009), le *Lantana camera* accumule plus de 10 000 ppm, le Bambou rempli, accumule plus de 1000 ppm (Thi et Go, 2005; Thi et Zarbi, 2007).



Alyssum



Thlapsi



Brassica

Figure 14

La phytodégradation, emploie des plantes en association avec des micro-organismes pour dégrader les polluants organiques du sol (Figure.15).

II.5.3.La rhizofiltration

La rhizofiltration, consiste à utiliser certaines espèces terrestres ou aquatiques qui absorbent, concentrent et stockent les contaminants des eaux polluées. Cette technique est particulièrement efficace pour l'élimination du Pb, Cd, Cu, Ni, Zn et Cr, éléments retenus dans les racines (Chaudhry *et al.*, 1998). Cette méthode présente l'avantage de pouvoir être appliquée *in-situ* ou *ex-situ* avec des espèces végétales pas nécessairement hyper accumulatrices, tel que le tournesol, la moutarde indienne, le tabac, le seigle, l'épinard et le maïs. Lorsque les racines de ces plantes arrivent à leur capacité maximale de rétention, elles sont récoltées, de même que pour la biomasse obtenue lors de la phytoextraction.

I.5.4. La phytostabilisation

La phytostabilisation, c'est l'utilisation des plantes pour limiter l'érosion et immobiliser les polluants dans les couches superficielles évitant en particulier leur migration vers les eaux de surface et souterraines (Figure.15) (Jenal et Ghorbal, 2002). Les plantes utilisées doivent être:

- tolérantes aux MT,
- aptes à immobiliser les polluants dans la rhizosphère et
- à ne pas les accumuler dans les parties aériennes, comme le trèfle, le ray-grass, *Mixanthus*, *Robivier*, faux-Acacia et l'érable (Tableau. 10) (Douay, 2010).

II.5.5. La phytovolatilisation

La phytovolatilisation c'est l'utilisation des plantes pour extraire les polluants du sol et les transformer en composés volatils (Figure.15) (Jenal et Ghorbal, 2002).

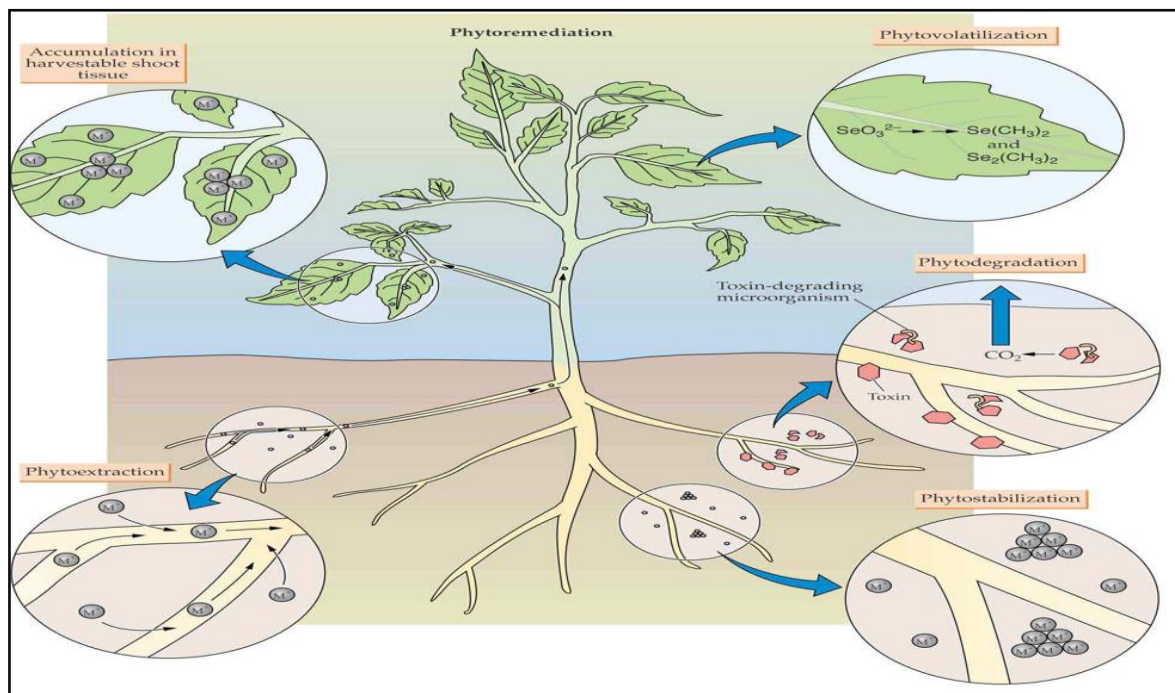


Figure.15: Les différents types de phytoremédiation d'après Buchanan *et al.*, (2002).

Tableau. 10: Principales phytotechnologies d'après le conseil général de la Vendée, (2008)

Polluants à traiter	Plantes utilisées	Action
	Phytostabilisation	
Métaux (Pb, Cd, Zn, Cu, As, Cr, Se).	Plantes à racines fibreuses et profondes.	Confinement des polluants par le couvert végétal pour limiter le risque de lessivage et d'envol des polluants.
	Phytoextraction	
Métaux (Pb, Cd, Zn, Cu),	Thlaspi, Alyssum, Brassica (moutarde).	Extraction des polluants du sol par des plantes accumulatrices dans leurs parties récoltables (feuilles, tiges, racines).
	phytovolatilisation/phytostimulation	
Métaux (As, Hg, Se),	<i>Brassica juncea</i> (moutarde) plantes marécageuses.	Volatilisation du polluant absorbé par la plante et éliminé par évapotranspiration.

Chapitre III:

Matériel Et Méthodes

CHAPITRE III: MATÉRIEL ET MÉTHODES

III. 1. Matériel végétal

Trois variétés de blé dur (Waha, Vitron et Gta) ont fait l'objet de cette étude ces variétés provient de la station ITGC de Guelma. Les semences des trois variétés ont été fournies par ITGC de Guelma (tableau.13).

Tableau. 13: Caractéristiques des variétés selon Benbelkacem et Kellou, (2000)

Caractéristiques Variétés	Origine	Caractéristiques
Waha	ICARDA (Syrie)	Très bonne productivité, paille courte.
Vitron	Espagne	Présente une paille moyenne, une bonne productivité et une bonne adaptation aux plateau et zones sahariennes.
Gta dur	CIMMYTY (Mexique)	Variété précoce, productivité moyenne. Le grain est gros et roux.

III. 2.1. Essai de germination

L'essai de germination s'est déroulé selon une expérience complètement aléatoire et randomisé, avec trois répétitions (R_1 , R_2 , R_3) et quatre traitements: C_0 , C_1 , C_2 , C_3 . Les semences désinfectées préalablement sont placées sur des rondelles de papier buvard tapissant les boîtes de pétries (Figure.16). Les traitements par les concentrations préparées (0, 0.15, 0.25, 0.3g/l) sont fait à partir d'un sel, le nitrate du plomb $Pb(NO_3)_2$. Les graines sont imbibées à raison de 25ml de solution chaque 48heures. L'essai de germination qui s'est déroulé dans le laboratoire est caractérisé par des conditions favorables, la température est de $23^{\circ}C$, l'humidité 30% et la photopériode lumière/obscurité est de 16/08 heures.

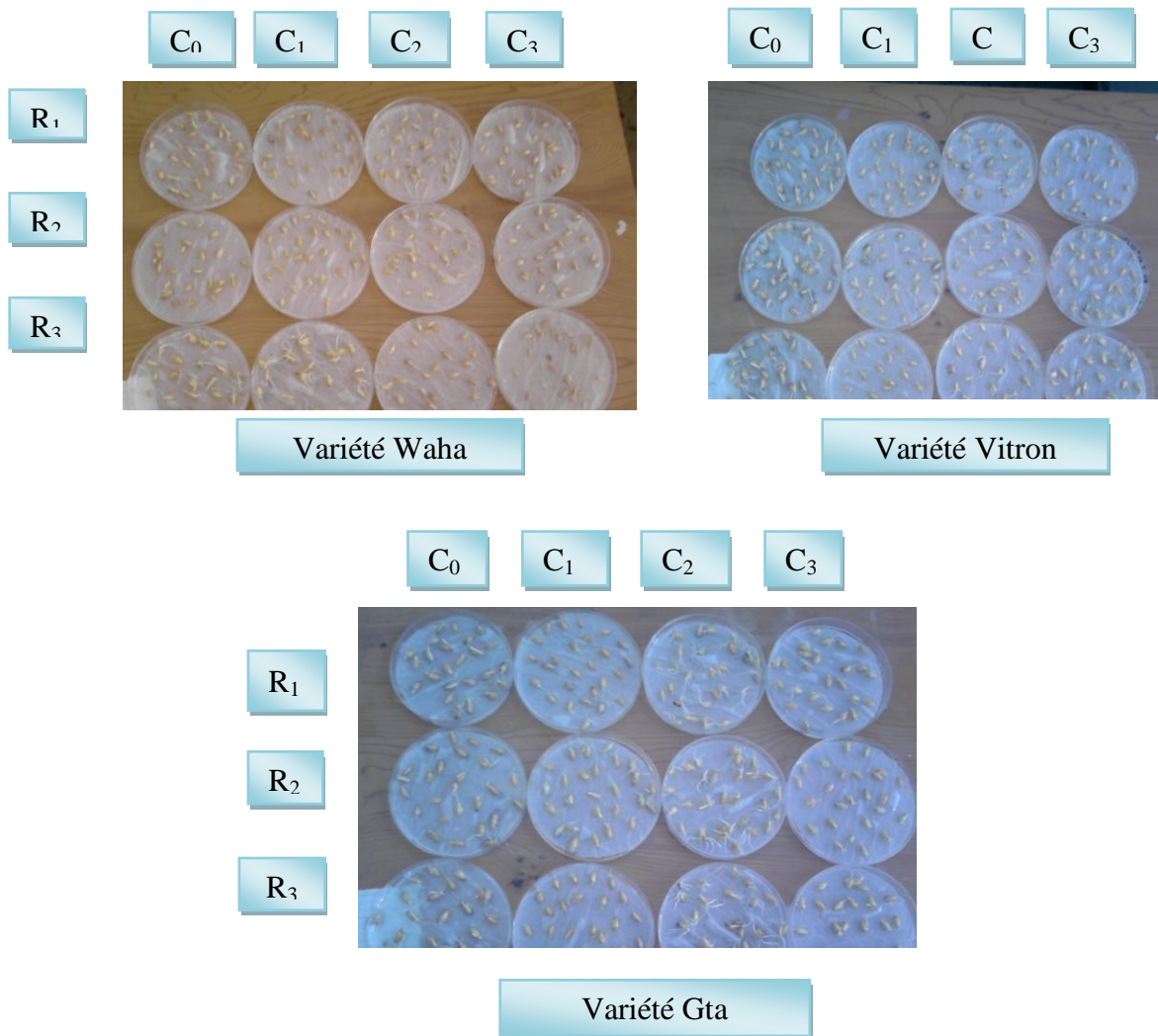


Figure. 16: Dispositif expérimental de l'essai de germination
 (C₀: 0g/l, C₁: 0.15g/l, C₂: 0.25g/l, C₃: 0.35g/l, R: répétition)

III. 2.2. Essai de la croissance

Dans cet essai, les variétés utilisées sont réparties selon le même dispositif expérimental de la germination (expérience aléatoire randomisée) avec trois répétitions (R₁, R₂, R₃) et quatre traitements (0, 0.15, 0.25, 0.3g/l) de Pb(NO₃)₂. Les semences sont mis dans des pots de 21 cm de diamètre et contiennent 1Kg de sol de texture équilibrée, sont irriguées à raison de 250ml par les

solutions de nitrate du plomb chaque 48 heures. Les pots sont placés dans des conditions semi-contrôlées dans une serre. La température est de 26⁰C et l'humidité de 30% (figure 17).

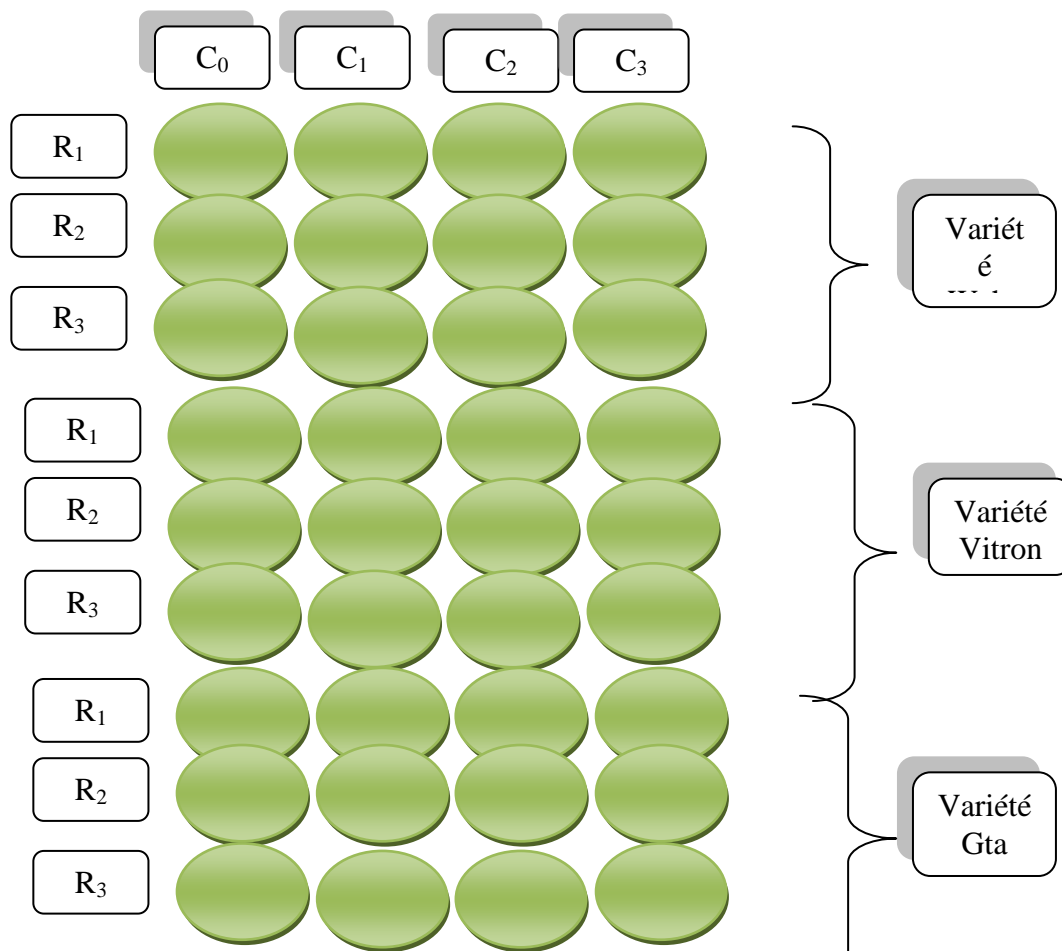


Figure.17: dispositif expérimental de l'essai de croissance

C₀: 0g/l, C₁: 0.15g/l, C₂: 0.25g/l, C₃: 0.35g/l, R: répétition

III. 3. Méthodes d'étude

III. 3.1. Phase de la germination

Dans cette phase de germination nous avons procédé à la détermination des paramètres germinatifs, des caractéristiques physiologiques, biochimiques et enzymatiques

III. 3.1.1. Paramètres morphologiques

III. 3.1.1.1. La Faculté germinative

C'est le pourcentage maximal de grains germés sur le nombre total de grains mis à germer, elle s'exprime en pourcentage (%) selon la formule suivante :

$$FG = \frac{NG}{NGG} \times 100 \quad (4) \quad \text{où}$$

NG: nombre de graines germées.

NGG: nombre de graines mises à germer.

III. 3.1.1.2. La Cinétique de germination

La vitesse de la germination est d'une importance majeure, car elle permet de prévoir la vigueur des plantules durant le processus de germination. Elle est donnée par la formule suivante :

$$\text{La cinétique de germination} = \frac{\text{nbre de graines le 1er jour}}{1} + \frac{\text{nbre de graines germées le 2ème jour}}{2} + \dots + \frac{\text{nbre de graines germées le n ème jour}}{n} \quad (5)$$

III. 3.1.1.3. L'Allongement des coléoptiles

La longueur de la coléoptile de chaque plantule issue de la germination est mesurée à l'aide d'une règle graduée pour chaque variété et chaque traitement. Les mesures de ce paramètre sont effectuées à partir du 6^{ème} jour de l'expérimentation jusqu'à la fin de l'essai (12^{ème} jour).

III. 3.1.1.4. Biomasse aérienne (PF) et racinaire (PR)

La biomasse aérienne des feuilles sèches et racinaire est déterminée après passage à l'étuve pendant 24 heures à une température de 105°C, par simple pesée.

III. 3.1.2. Paramètres biochimiques

III. 3.1.2.1. Dosage de la chlorophylle et des pigments caroténoïdes

L'extraction: le principe consiste à peser 0.2 g de feuilles vertes, les broyer dans un mortier après l'ajout d'une pincée de carbonate de calcium (CaCO₃) pour neutraliser l'acidité vacuolaire et 25 ml d'acétone à 80% ensuite faire la filtration.

Le dosage: la chlorophylle est dosée par spectrophotométrie, selon le principe de la loi de « Beer-Lambert ». La quantité de chlorophylle est déterminée par le système d'équation à inconnues suivant:

$$\begin{aligned} \text{Chl a} &= 12.7D.O_{663} - 2.69D.O_{645} & (6) \\ \text{Chl b} &= 22.9D.O_{645} - 4.68D.O_{663} & (7) \\ \text{Chl a} + \text{Chl b} &= 8.02D.O_{663} + 20.2D.O_{645} & (8) \end{aligned}$$

La lecture des densités optiques (D.O) des extraits à 645 et à 663nm, puis la résolution de ce système d'équation nous donnent les teneurs en chlorophylles (a) et (b) en µg/ml, extrapolés encore en µg/g de MF (Mazliak, 1979).

- La valeur des caroténoïdes est déterminée comme suit :

III. 3.1.2.2. Dosage des sucres solubles

Les sucres solubles sont dosés par la méthode Shields et Burnett (1960), qui utilise l'anthrone en milieu sulfurique, l'extraction des sucres solubles se fait après macération de 0.1g de matière végétale dans 3ml d'éthanol à 80% pendant 48 heures. Ensuite faire passer les tubes au rotavapor pour l'évaporation de l'éthanol, et mettre 20ml d'eau distillée dans la totalité de l'extrait.

Préparation du réactif à l'anthrone: au moins 4 heures à l'avance (mettre 0.2 g d'anthrone pur dans 100 ml d'acide sulfurique pur).

On prélève 2ml de l'extrait dans les tubes à essai puis on ajoute 4ml du réactif à l'anthrone. On place les tubes au bain-marie à 62⁰ C pendant 8 minutes. Ensuite on les met dans un bain de glace pour les refroidir afin d'arrêter la réaction. Enfin, procéder à la lecture au spectrophotomètre à 585nm après un repos de 30minutes à l'obscurité. La détermination du contenu en sucres solubles est faite sur la base d'un courbe étalon réalisé avec des concentrations connues de glucose.

III. 3.1.2.3. Dosage de la proline

La proline est dosée selon la technique de Monneveux et Nemmar (1986), qui consiste à mettre (0.1g) de la matière végétale dans un tube à essai et ajouter 2ml de méthanol à 40%, l'ensemble est ensuite chauffé au bain-marie à 80⁰C pendant 60minutes ; les tubes sont recouverts de papier aluminium pour éviter la volatilisation de l'alcool.

Après refroidissement, on prélève 1ml de la solution, à laquelle on ajoute 1ml d'acide acétique (CH₃ COOH) et 1ml de mélange réactionnel modifié contenant (120ml d'eau distillé + 300ml d'acide acétique + 80ml d'acide ortho phosphorique) et 0.025 mg de Ninhydrine.

Les solutions sont portées à ébullition pendant 30minutes, elles virent au rouge; après refroidissement, on ajoute 5ml de toluène, après agitation deux phases se séparent:

- 1- La phase inférieure sans proline.
- 2- La phase supérieure qui contient la proline, celle-ci est ensuite récupérée et déshydratée par l'adjonction de NaSO₄.

Enfin on précède à la détermination de la teneur en proline des échantillons par la lecture au spectrophotomètre à la longueur d'onde 525nm, après étalonnage de l'appareil par le mélange (acide acétique+ eau distillée+ acide ortho phosphorique + Ninhydrine). La teneur des échantillons inconnus est déterminée par la suite grâce à une courbe d'étalonnage.

III. 3.1.2.4. Dosage des protéines

Les protéines sont dosées selon la méthode de Bradford(1976), qui utilise le bleu brillant de Coomassie G250 (BSA) comme réactif et le sérum d'albumine bovine (BSA) comme standard. Le dosage s'effectue en 3 étapes:

Préparation de l'échantillon: (0.1g) de l'échantillon de chaque concentration est broyé dans un mortier avec 5ml d'eau distillée, puis filtré et versé dans des tubes avec 5 autres contenant de l'eau distillée.

Préparation de réactif de Bradford: pour préparer ce réactif, il faut prendre 0.1g de BBC (Bleu brillant de Coomassie), lui ajouter 50ml d'éthanol à 95% puis le placer sur un agitateur pendant 2 heures. Rajouter ensuite 100ml d'acide ortho phosphorique à 85% et compléter à l'eau distillée jusqu'à 1 litre.

Le dosage: dans des tubes à essai propres, on prélève 0.2ml de l'échantillon végétal et 1.6 ml d'eau distillée (à l'aide d'une micropipette), 5 minutes avant la lecture on ajoute 0.2ml du réactif de Bradford. Le dosage se fait par lecture au spectrophotomètre à la longueur d'onde 595nm après l'étalonnage de l'appareil par la solution témoin (1.8ml d'eau distillée + 0.2ml du réactif de Bradford). La teneur en protéines des échantillons inconnus est déterminée également à l'aide d'une courbe standard faite à partir de concentrations connues de BSA.

III. 3.1.3. Paramètres enzymatiques

III. 3.1.3.1. Détermination de l'activité de la catalase

L'activité de la catalase est déterminée par la méthode de Gabriela *et al*, (2005), (0.5g) de feuilles sont broyées avec 25ml de solution tampon (pH= 7) pour préserver l'activité enzymatique. Le broyat récupéré est centrifugé à 5000tr/min pendant 5minutes. Le surnageant est filtré pour l'obtention de l'extrait enzymatique qui sera conservé à 4°C jusqu'à son utilisation.

La catalase est un enzyme permettant la transformation de l'eau oxygénée (H₂O₂) en eau (H₂O) et dioxygène (O₂). Pour mesurer cette activité, l'extrait enzymatique est mis en contact avec de l'eau oxygénée pendant une durée déterminée. 1ml d'extrait enzymatique est mis dans 10ml H₂O₂ à 0.01N pendant 5mn. La réaction est arrêtée par l'introduction de 25ml d'H₂SO₄ à 2%. Le volume réactionnel est titré par le permanganate de potassium (KMnO₄) jusqu'à la stabilité de la coloration rose.

L'activité de la catalase est exprimée en $\mu\text{kat/g}$ de MF (μKat = disparition d'une μmole de substrat par seconde) selon la formule suivante:

$$CAT = \frac{n \cdot (Vt - V) \cdot VE}{t} \cdot PE \cdot MF \quad (9)$$

Avec:

n: nombre de mole de H₂O₂ oxydées par 1 ml de KMnO₄: 5 µmoles/ml de permanganate de potassium.

Vt: volume moyen de permanganate de potassium pour le dosage des témoins en (ml).

V: volume moyen de permanganate de potassium pour le dosage des extraits enzymatiques en (ml).

VE: volume de l'extrait enzymatique brut: 25 (ml).

PE: volume d'extrait enzymatique qui est introduit dans la réaction mesurée: 1 (ml).

T: temps de réaction (300 secondes).

MF: masse de matière fraîche en grammes: 0.5(g).

III. 3.1.3.2. Détermination de l'activité de la peroxydase

L'activité peroxydasique est déterminée selon la méthode de Baaziz *et al.*, (2006). Le principe est l'utilisation du peroxyde d'hydrogène pour former un produit coloré en présence du gaïacol. Après un temps de réaction, l'activité enzymatique est déterminée par la lecture de l'absorbance à 470nm sur une durée de 300 secondes.

L'activité est calculée d'après la formule suivante:

$$\text{POX} = \frac{4 \cdot \frac{\Delta A}{\Delta t} \cdot \text{VR} \cdot \text{VD} \cdot \text{VE}}{\epsilon \cdot e \cdot \text{PE} 2 \cdot \text{PE} 1 \cdot \text{MF}} \quad (10)$$

VR: mélange réactionnel: 3(ml).

VD: volume de dilution: 40 (ml).

VE: volume de l'extrait brut: 25(ml).

ε: coefficient d'extinction du gaïacol: 26.6 (cm²/µmole).

e: épaisseur du tube: 1(cm).

PE2: volume de l'extrait dilué: 1(ml).

PE1: volume de l'extrait brut utilisé dans la dilution: 1(ml).

MF: masse de matière fraîche : 0.5(g).

III. 3.1.3.3. Détermination de l'activité de gaïacol peroxydase

L'activité gaïacol peroxydase(GPOX) est déterminée par spectrophotométrie à 470nm suivant la technique de Mac Adam (1992). Le coefficient d'extinction linéique molaire utilisé est ε=26,6mM/cm. Pour un volume final de 3ml, le mélange réactionnel contient: 100µl d'extrait enzymatique, 2700µl tampon phosphate (100mM, pH 6.5), 100µl gaïacol (18mM), 100µl H₂O₂. 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 GPOX est exprimée en $\mu\text{moles oxydées /min/gde MF}$. Elle est calculée par la formule suivante:

$$\text{Act} = \frac{\Delta A \times V_t}{\epsilon \times \Delta t \times L \times V_e \times p} \quad (11)$$

Act: activité enzymatique en nmoles/min/mg de protéines

ϵ : coefficient d'extinction linéique molaire en (M)

ΔA : différence moyenne de l'absorbance

V_t : volume total du mélange réactionnel en (ml)

V_e : volume de l'extrait enzymatique en (ml)

L: largeur de la cuve de mesures en (cm)

P: poids des protéines en (mg)

T: temps de lecture en (min)

III. 3.1.4. Dosage de glutathion(GSH)

Le dosage du glutathion est déterminé selon la méthode de Weckberker et Cory (1988). (0.5g) de feuilles fraîches sont broyées à froid avec 4ml de tampon phosphate (0.1 M, pH=6,5). Le broyat est ensuite filtré et centrifugé à 5000tr/mn pendant 15minutes. L'homogénat doit d'abord subir une déprotéinisation par l'acide sulfosalicylique (ASS à 0,25%). Pour cela, au 0,8ml de l'homogénat sont additionnés 0,2ml d'ASS, le mélange est vortexé et laissé pendant 15min dans un bain de glace puis centrifugé à nouveau à une vitesse de 1000 tr/min pendant 5minutes. Le surnageant est conservé au congélateur à -80°C jusqu'au moment du dosage. Le volume réactionnel contient : 0.5ml d'extrait enzymatique, 1ml tampon tris-EDTA, 0.025ml DTNB. L'étalonnage de l'appareil se fait par 0.5ml d'eau distillé, 1ml tampon Tris-EDTA, 0.025ml DTNB. La teneur en glutathion est déterminée par la lecture des (D.O) au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 412nm. La concentration du GSH est obtenue par la formule suivante:

$$\text{GSH} = \left(\frac{D_0 \times 1 \times 1,525}{13,1 \times 0,8 \times 0,5} \right) \times \frac{1}{\text{mg de protéines}} \quad (12)$$

La concentration du GSH est exprimée en $\mu\text{moles/mg}$ de protéines.

1: volume total des solutions utilisées dans la déprotéinisation= (0.8ml d'homogénat+0.2ml d'ASS).

1.525: volume total des solutions utilisées dans le dosage de la GSH au niveau du surnagent= (0.5ml surnagent+1ml Tris-EDTA+0.025ml DTNB).

13.1: coefficient d'absorbance (concernant le groupement (-SH) à 412nm).

0.8: volume de l'homogénat trouvé dans 1(ml).

0.5: volume du surnagent trouvé dans 1.525.

III. 3.2. La phase de la croissance

III. 3.2.1. Paramètres morphologiques

III. 3.2.1.1. Nombre des feuilles

Le nombre de feuilles a été comptabilisé sur un sous-échantillon de 30 plantes par variété et par traitement.

III. 3.2.1.2. Surface foliaire

La surface foliaire a été déterminée par une méthode qui consiste à couper un carré en papier de 1cm de coté et de le peser juste après. Ensuite prendre une feuille du blé sur papier calque ou (en photocopie) de la même nature du papier et la peser aussi par la suite. Par un simple calcul de règle de 3, On déduit ainsi la surface foliaire (SF) des échantillons étudiés (Paul *et al.*, 1979).

III. 3.2.1.3. Poids spécifiques des feuilles (PSF)

Le poids spécifique des feuilles, c'est-à-dire le poids de feuilles par unité de surface foliaire, peut être utilisé comme un indice de production et permis de mettre en évidence l'adaptation de l'appareil foliaire aux différentes conditions énergétiques et contraintes du milieu. le poids sec des feuilles récoltées et séchées à l'étuve et au dénominateur, la surface foliaire calculée selon la méthode de Paul *et al.*, (1979).

$$\boxed{\text{PSF} = \text{PS}/\text{SF} \quad (13)} \quad \text{Ou :}$$

PSF : Poids spécifique des feuilles

PS : Poids sec des feuilles en (g)

SF : Surface foliaire en (cm⁻²)

III. 3.2.2. Paramètres biochimiques

Dans ce deuxième essai de la croissance, les protocoles de dosage de la **chlorophylle, des pigments caroténoïdes, des sucres solubles, de la proline, des protéines et du glutathion** sont les mêmes que ceux utilisés dans l'essai de la germination (chapitre III. 3.1.2).

III. 3.2.3. Paramètres enzymatiques

Pour la détermination de l'activité des enzymes du système antioxydant (POX, CAT, GPOX), Les méthodes utilisées sont les mêmes que celles de la phase de germination (chapitre III.3.1.3.)

III. 3.2.3.1. Détermination de l'activité ascorbate peroxydase (APX)

L'activité de l'enzyme ascorbate peroxydase est réalisée par spectrophotométrie selon la méthode de Nakano et Asada (1987). Le volume réactionnel final de 3ml contient: 100 μ l d'extrait enzymatique, 50 μ l d'H₂O₂ à 3% et 2850 μ l de tampon pH (50mM ; 0,5mM ascorbate, pH=7,2). L'étalonnage de l'appareil se fait en l'absence de l'extrait enzymatique. La lecture des DO est effectuée à une longueur d'onde de 290nm, pendant 1min et ce pour un coefficient d'extinction linéique molaire $\epsilon = 2800\text{M/cm}$. L'activité APX est exprimée en nmoles/min/mg de protéines.

CHAPITRE. IV:

Résultats

CHAPITRE. IV: RÉSULTATS

IV.1.Résultats de la germination

IV.1.1. Paramètres morphologiques

IV.1.1.1. Faculté germinative

L'observation des résultats (Figure.18) montre que les graines de l'essai sont viables. En effet, dans les lots témoins les trois variétés présentent une bonne faculté germinative. Concernant l'effet du plomb sur ce paramètre, il a été constaté un effet inhibitif chez toutes les graines traitées, avec des différences hautement significatives ($P < 0.001$). D'une manière générale l'effet du plomb est inversement proportionnel à la concentration en plomb dans les solutions. Plus la concentration est élevée plus le taux de germination est faible. Signalons par ailleurs, que la concentration 0.3g/l a provoqué l'arrêt total du processus de germination chez les trois variétés étudiées.

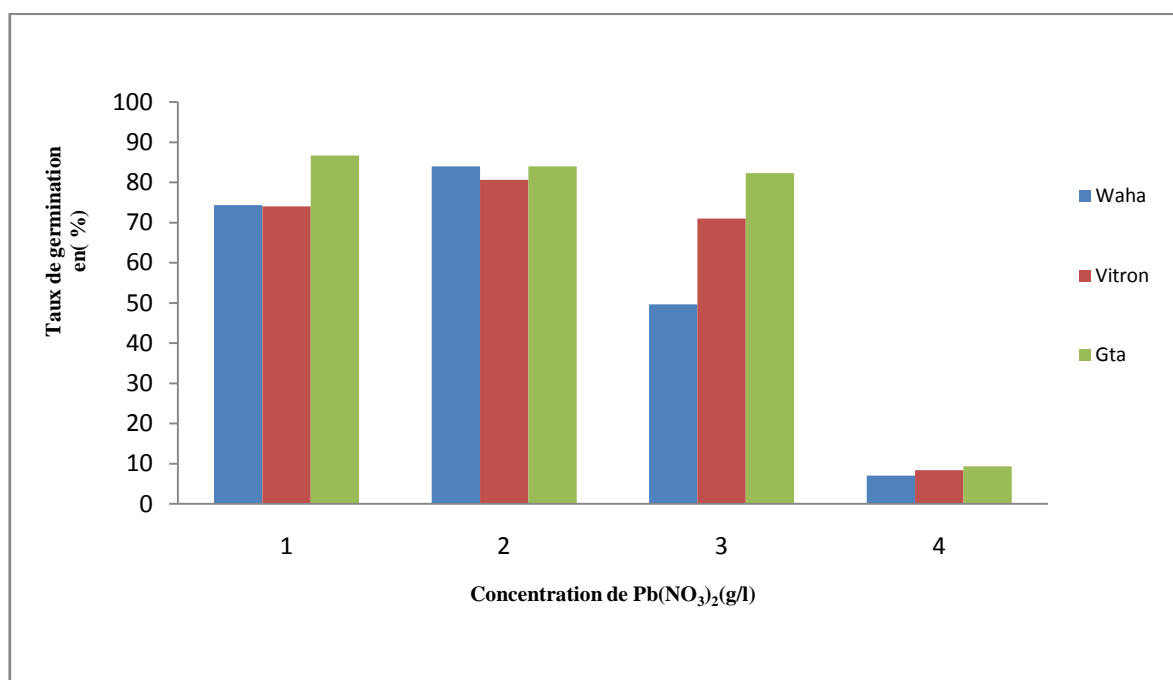


Figure.18: Effet du $Pb(NO_3)_2$ sur la faculté germinative

[1] : 0 g/l, [2] : 0.15g/l, [3]: 0.25 g/l, [4]: 0.35g g/l de $Pb(NO_3)_2$

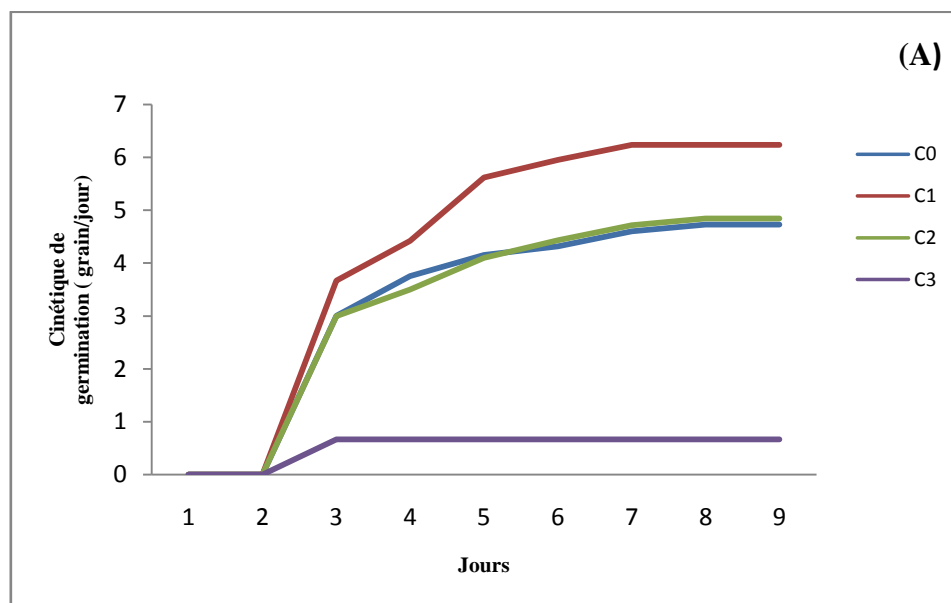
IV.1.1.2. Cinétique de la germination (Vm)

D'après les résultats obtenus (Figure.19), le plomb affecte la vitesse de la germination des trois variétés. En effet, le traitement des graines avec la concentration 0.15g/l augmente la vitesse de

germination (V_m) des trois variétés. Par contre, les autres traitements réduisent cette énergie chez les trois variétés avec un seuil d'inhibition se situant entre (0.25 et 0.35g/l). L'analyse statistique T-test (comparaison de moyennes 2 à 2) montre que ce paramètre varie d'une manière très hautement significative entre les trois variétés étudiés ($P < 0.001$).

L'observation des courbes de germination nous donne une idée complète de l'évolution de la germination en fonction des différents traitements par le plomb. La figure 19 nous fait remarquer, l'existence de trois phases distinctes dans l'essai de germination.

- Une phase de latence, ou il n'y a pas de germination, c'est la période d'imbibition qui a été en moyenne de 2 jours pour les trois variétés étudiées, Waha, Vitron et Gta.
- Une phase active durant laquelle la germination augmente rapidement d'une manière exponentielle. C'est la germination au sens stricte « *sensu-stricto* » qui a duré jusqu'au 5^{ème} jour.
- Une phase lente, dont la durée est fonction du test et du matériel végétal, qui indique la fin du processus de germination (palier). Signalons par ailleurs, qu'à travers ces courbes de germination, on peut également voir l'effet du plomb sur ce phénomène, en effet, plus l'amplitude des courbes est plus rapprochée de l'axe des X plus l'effet du Pb est important et vice-versa (l'inverse est vrai)



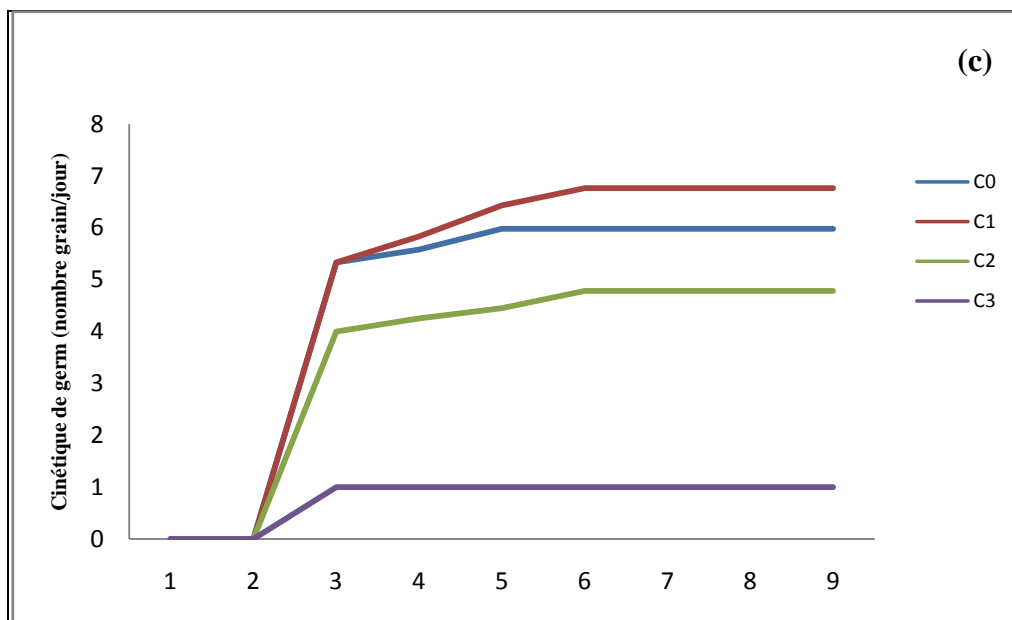
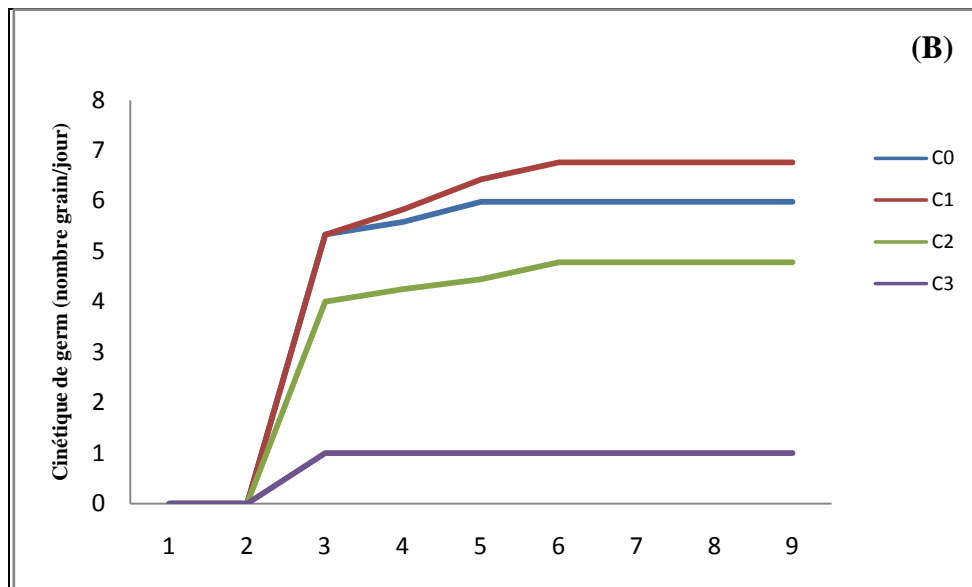


Figure. 19: Effet du $Pb(NO_3)_2$ sur la cinétique de germination

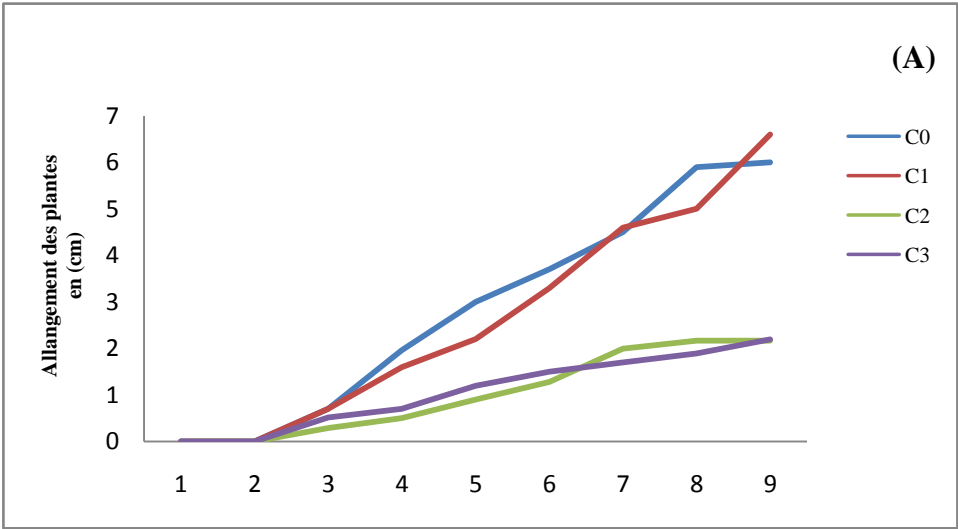
(A) Waha, (B) Vitron, (C) Gta

(C₀:0 g/l, C₁: 0.15g/l, C₂: 0.25 g/l, C₃: 0.35g g/l de $Pb(NO_3)_2$)

IV.1.1.3. Allongement des coléoptiles

Les mesures de l'allongement des coléoptiles des trois variétés, aux cours des neufs jours (9) du processus germinatif sous stress plombifère sont reportées dans la figure 20. La croissance en longueur des plantules durant cette période s'est déroulée normalement dans les lots témoins (entre 5 et 7cm de hauteur pour les trois variétés). En revanche, dans les lots traités les résultats sont différents, la concentration 0.15 g/l a en effet activé l'allongement des coléoptiles des variétés Vitron et Gta avec des valeurs respectives de 8.1 et 9cm. Par ailleurs, le traitement des graines par

les fortes doses en Pb, a réduit la croissance des coléoptiles chez les trois variétés, d'une manière très hautement significative ($P \leq 0.001$).



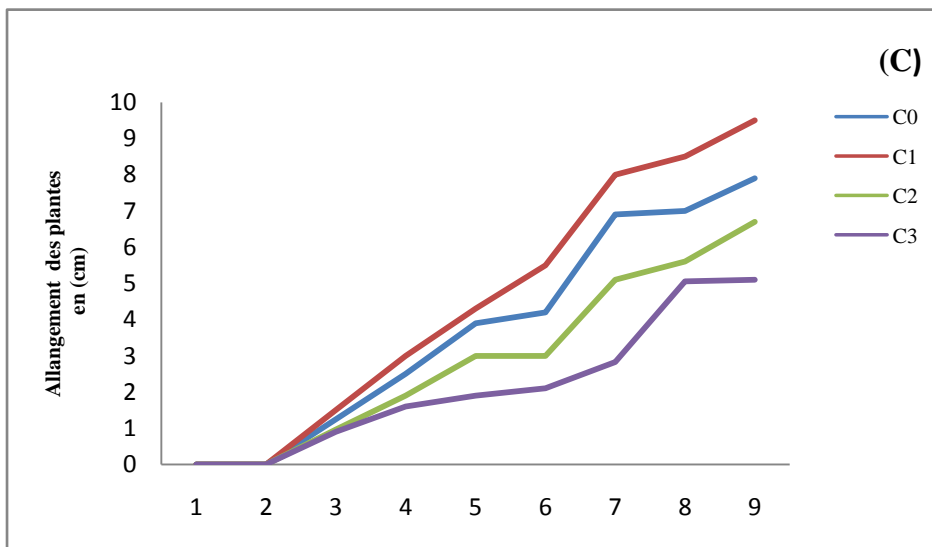
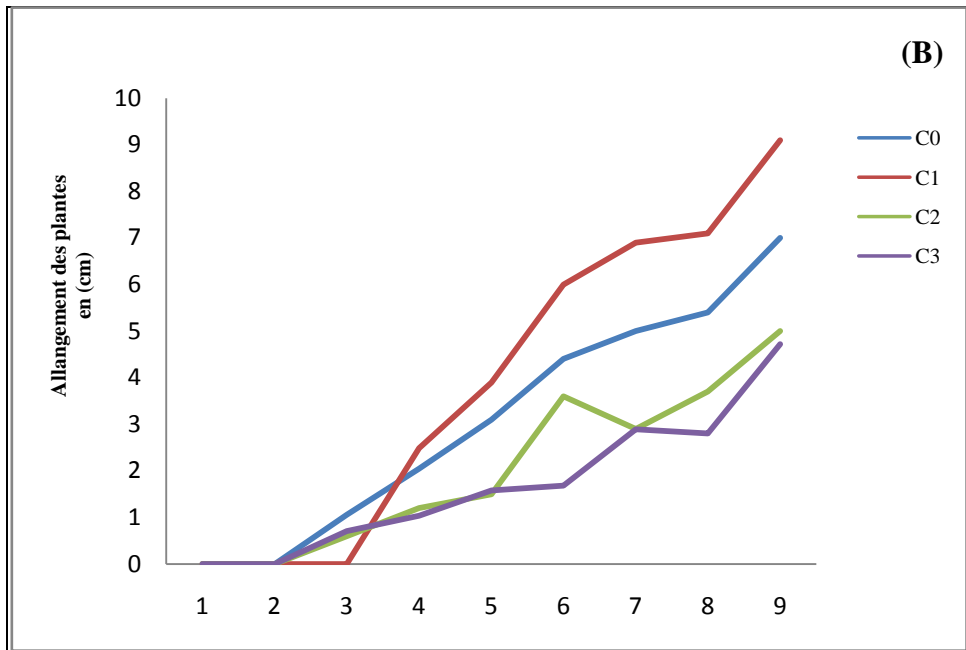


Figure. 20: Effet du $Pb(NO_3)_2$ sur l'allongement des coléoptiles

(A) Waha, (B) Vitron, (C) Gta

(C₀:0 g/l, C₁: 0.15g/l, C₂: 0.25 g/l, C₃: 0.35g g/l de $Pb(NO_3)$)

IV.1.1.4. Biomasse aérienne et souterraine

Pour la biomasse aérienne et souterraine (Figure.21), les résultats de l'effet du plomb sont similaires à ceux des paramètres germinatifs. La teneur 0.3g/l a entraîné une réduction importante du poids sec des feuilles de la variété Waha. Cette même concentration a provoqué un arrêt total de la croissance racinaire (poids sec des racines) chez les trois variétés.

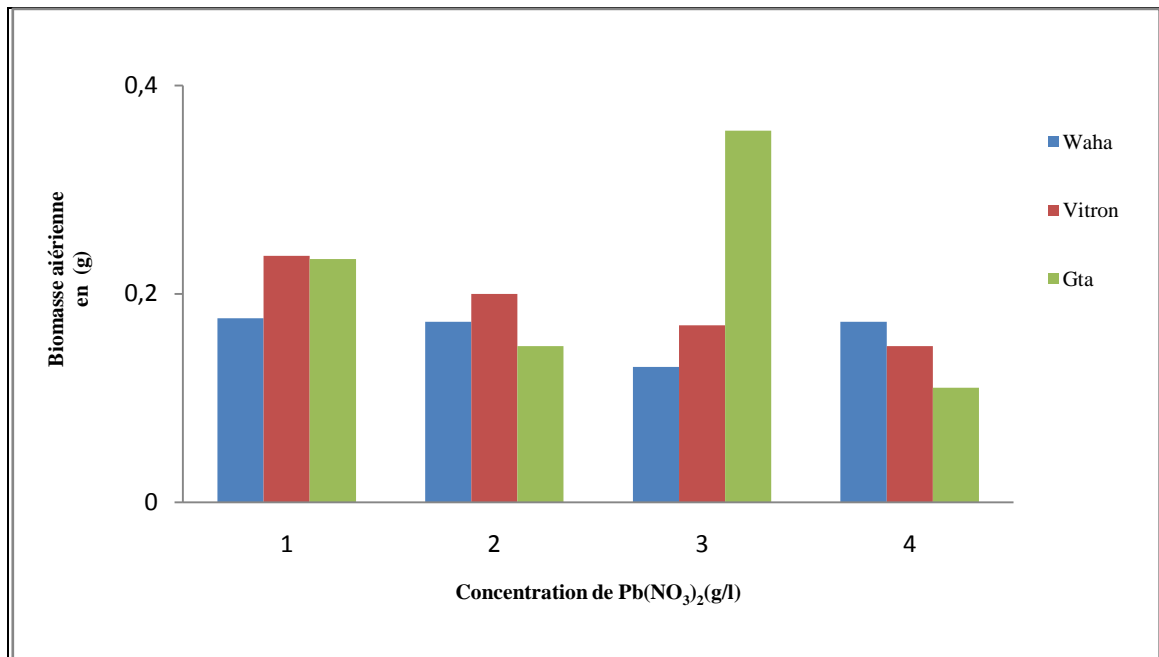


Figure. 19: Effet du $Pb(NO_3)_2$ sur la biomasse aérienne

[1] :0 g/l, [2] : 0.15g/l, [3]: 0.25 g/l, [4]: 0.35g g/l de $Pb(NO_3)_2$

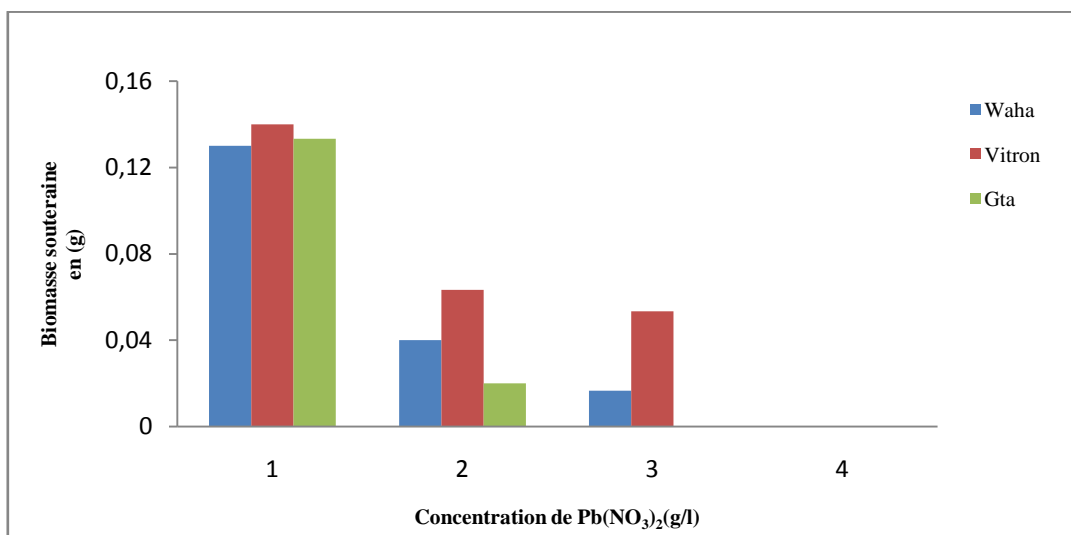


Figure. 21: Effet du $Pb(NO_3)_2$ sur la biomasse souterraine

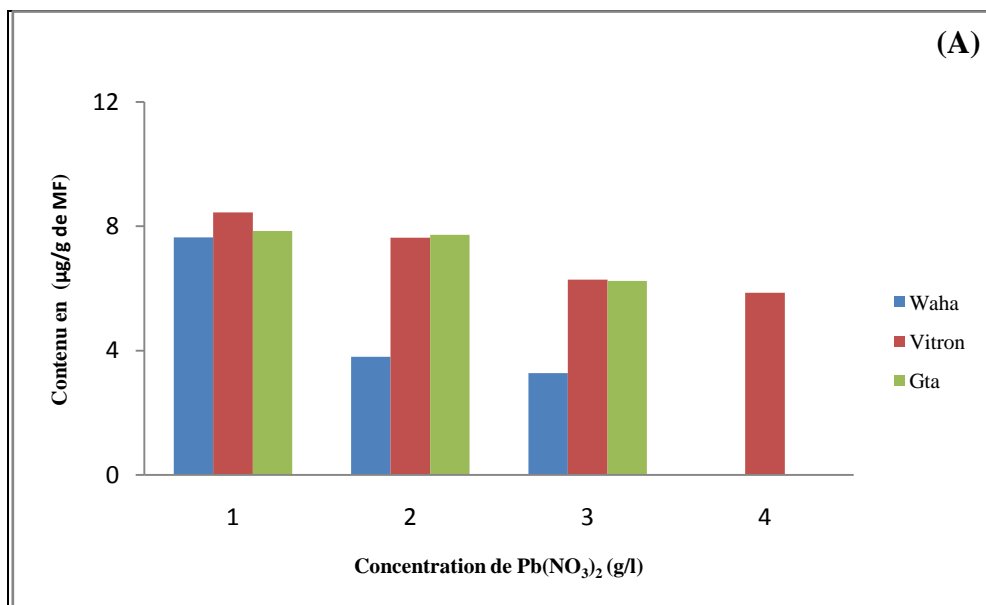
[1] :0 g/l, [2] : 0.15g/l, [3]: 0.25 g/l, [4]: 0.35g g/l de $Pb(NO_3)_2$

IV.1.2. Paramètres biochimiques

IV.1.2.1. Contenu des pigments photorécepteurs

IV.1.2.1.1. Contenu en chlorophylles

Les effets du Pb sur les contenus en pigments sont consignés dans la figure (22). L'effet du plomb sur la teneur en chlorophylle est variable selon la variété et selon la concentration utilisée. En effet, le contenu en chlorophylle totale (a+b) chez la variété Waha a été réduit d'une manière proportionnelle, (plus la dose du polluant est forte, plus la réduction est importante). Tandis que chez les autres variétés (Vitron et Gta), les doses élevées ont provoqué une légère élévation de la teneur en chlorophylle d'une manière générale. Quant on considère les types de chlorophylles indépendamment, on remarque que la quantité de chlorophylle (a) est supérieure à la quantité de chlorophylle (b) chez les trois variétés, et que le facteur concentration en plomb a une relation proportionnelle avec les variétés Waha et Vitron dans la quantité de chlorophylle (a), même remarque pour la chlorophylle (b) chez les trois variétés. L'analyse de la variance montre des différences très hautement significatives ($P \leq 0.001$) entre les variétés et entre les concentrations pour la chlorophylle (a) et (b).



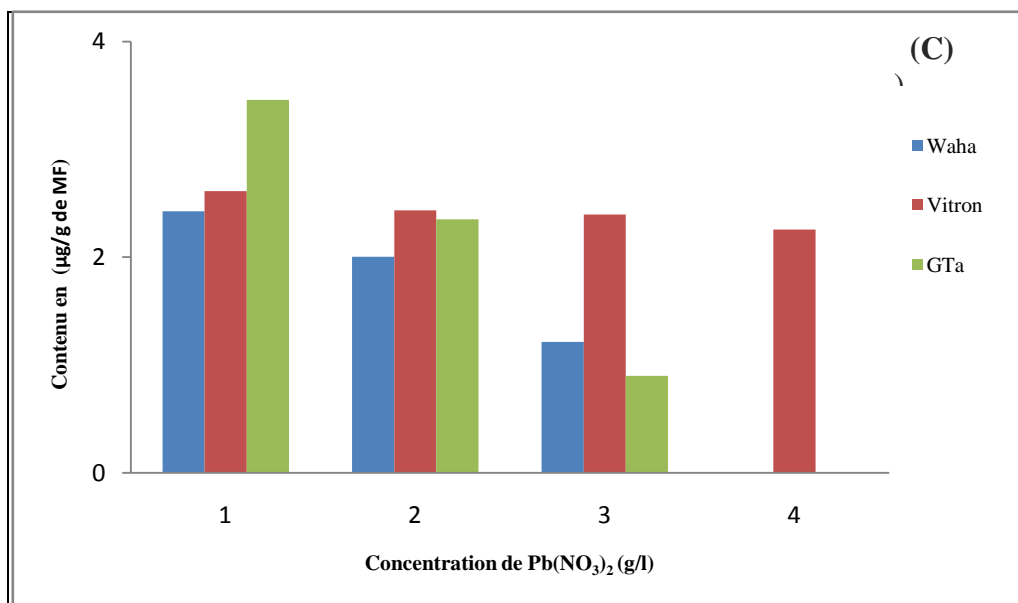
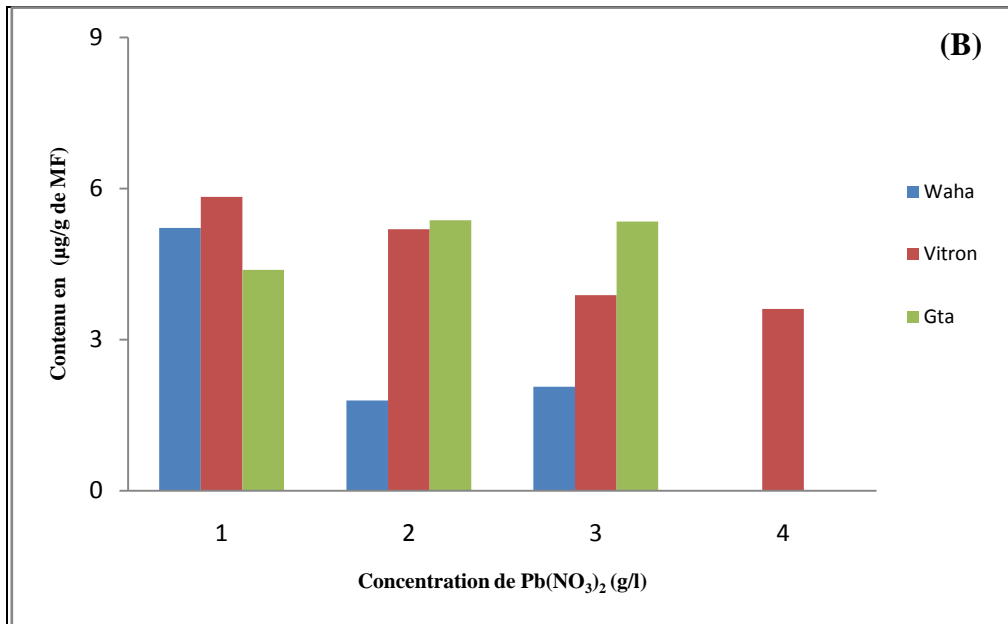


Figure. 22: Effet du Pb(NO₃)₂ sur le contenu en pigments: (A) chlorophylle (a+b), (B) chlorophylle (a), (C): chlorophylle (b)
 [1]:0 g/l, [2]: 0.15g/l, [3]: 0.25 g/l, [4]: 0.35g g/l de Pb(NO₃)₂

IV.1.2.1.2. contenu en caroténoïdes

La figure 23 met en évidence un effet dépressif du plomb sur la synthèse ou la libération des caroténoïdes pour les trois variétés étudiées. La teneur en caroténoïdes nous montre que la variété Gta présente plus de caroténoïdes ($3.06\mu\text{g/g}$ de MF) que les autres variétés dans les lots témoins (2.50 et $2.43 \mu\text{g/g}$ de MF de Waha et Vitron respectivement). L'analyse statistique T-test (comparaison de moyennes 2 à 2), montre que ce paramètre varie d'une manière très hautement significative chez les variétés étudiées.

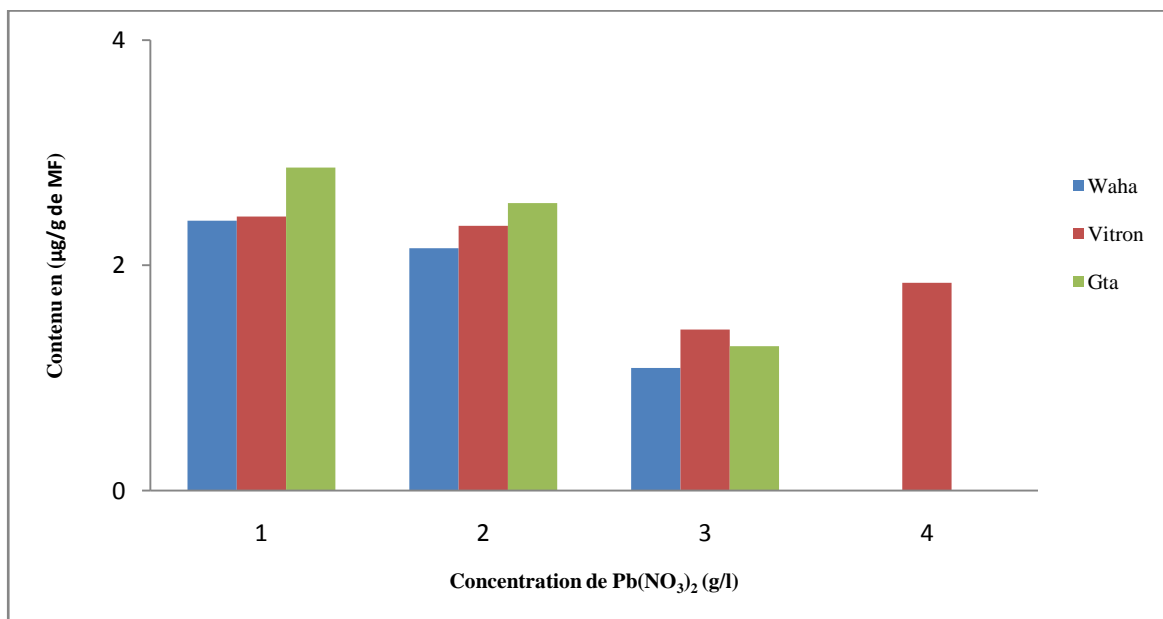


Figure. 23: Effet du $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ sur le contenu en caroténoïdes.

[1]:0 g/l, [2]: 0.15g/l, [3]: 0.25 g/l, [4]: 0.35g g/l de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$

IV.1.2.1.3. Contenu en sucres solubles

Le contenu en sucres solubles extrait des feuilles des plantules est consigné dans la figure 24. Les résultats obtenus montrent que la variété Vitron contient plus de sucres ($29.81\mu\text{g/g}$ de MF) que les autres variétés (23.42 et $11.29 \mu\text{g/g}$ de MF pour Waha et Gta respectivement). Chez les plantules issues de graines traitées par le plomb, la quantité de sucres solubles obtenue dans la variété Waha est presque le double que celle de la variété Gta (avec la concentration 0.15g/l). En outre, dans les graines traitées avec la forte dose (C_2) on a observé une diminution du contenu en sucres. Par ailleurs, pour les autres variétés, le contenu en sucres varie proportionnellement avec l'élévation de la teneur en plomb. La concentration 0.35g/l a inhibé complètement la synthèse et/ou la libération des sucres chez les variétés Waha et Gta. Du vue statistique, les résultats obtenus montrent l'existence de différences très hautement significatives ($P \leq 0.001$).

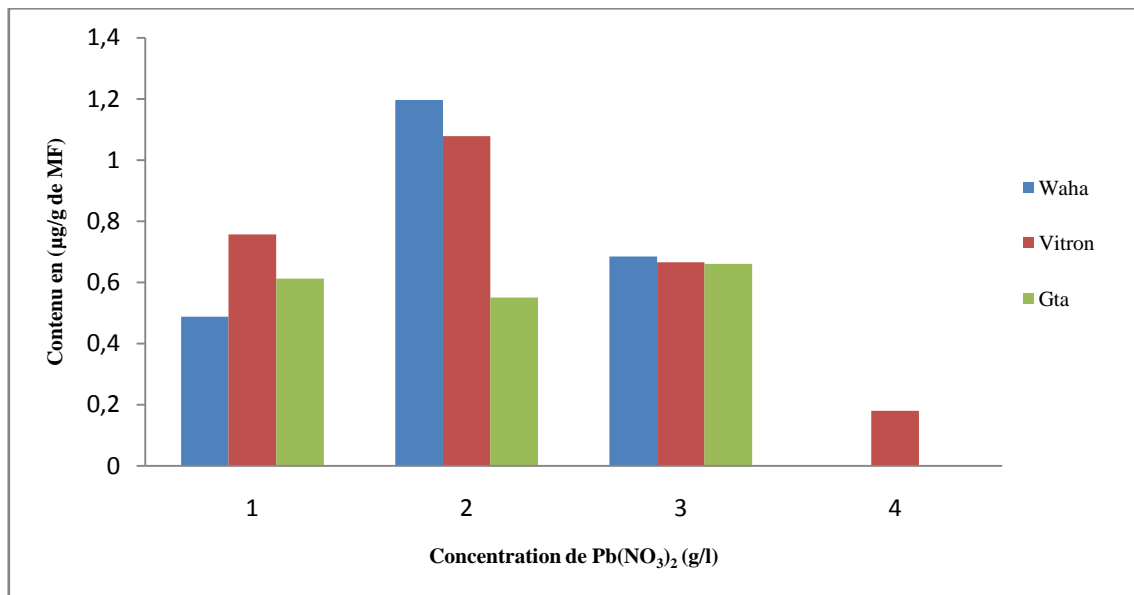


Figure. 24: Effet du Pb(NO₃)₂ sur le contenu en sucres solubles

[1]:0 g/l, [2]: 0.15g/l, [3]: 0.25 g/l, [4]: 0.35g g/l de Pb(NO₃)₂

IV.1.2.1.4. Contenu en protéines

A la lumière des résultats, la figure. 25 suggère que le contenu en protéines des feuilles dans les lots témoins, est plus important chez la variété Vitron (31.54 µg/g de MF) que ses homologues Waha et Gta avec respectivement des valeurs de l'ordre de 12.90, 17.7 µg/g de MF. Chez les plantules issues de graines traitées, la quantité de protéines a été faible chez les deux variétés Vitron et Gta. A l'inverse, chez la variété Waha le contenu en protéines a été légèrement augmenté avec la concentration 0.15g/l et réduit avec les autres traitements. L'analyse statistique montre que ce caractère varie d'une manière très hautement significative chez les trois variétés ($P \leq 0.001$).

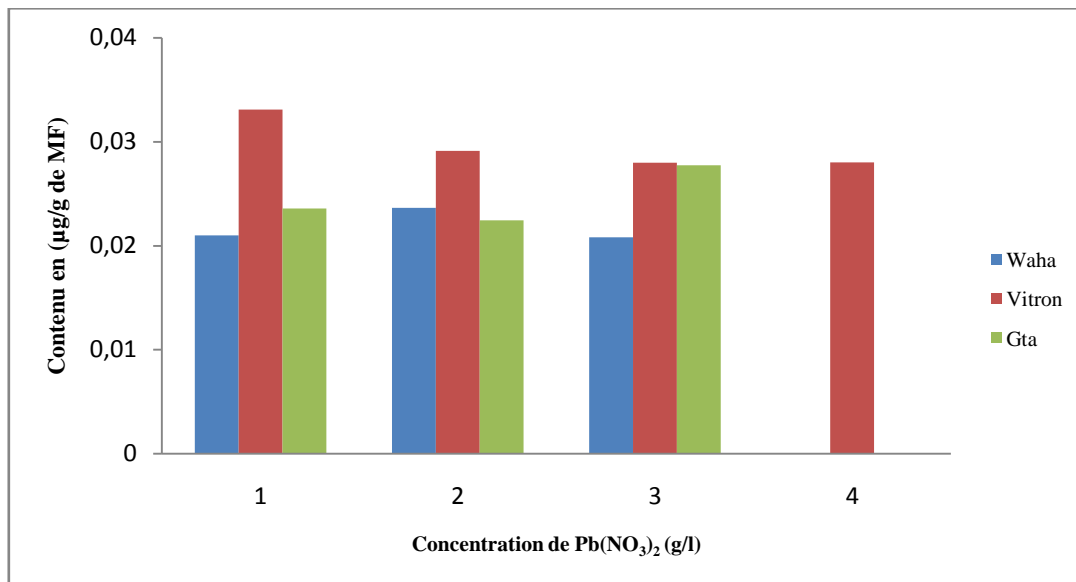


Figure. 25: Effet du Pb(NO₃)₂ sur le contenu en protéines totaux

[1]: 0 g/l, [2]: 0.15g/l, [3]: 0.25 g/l, [4]: 0.35g g/l de Pb(NO₃)₂

IV.1.2.1.5. Contenu en proline

Les résultats de dosage de l'acide aminée proline (figure 26) montrent que son contenu varie d'une façon très hautement significative ($P \leq 0.001$) Il est faible chez la variété Vitron (3.4 µg/g de MF) par rapport aux autres variétés respectives Waha et Gta avec des valeurs de (32.3, 22.6 µg/g de MF).

D'une manière générale, les différentes concentrations (0.15, 0.25, 0.35g/l) provoquent la chute graduelle de la quantité de proline chez les variétés Waha et Gta. Par contre chez la variété Vitron., la deuxième et la troisième concentration (0.15 et 0.25 g/l) ont augmenté son contenu. La concentration 0.35g/l quant à elle, est une concentration inhibitrice pour les trois variétés.

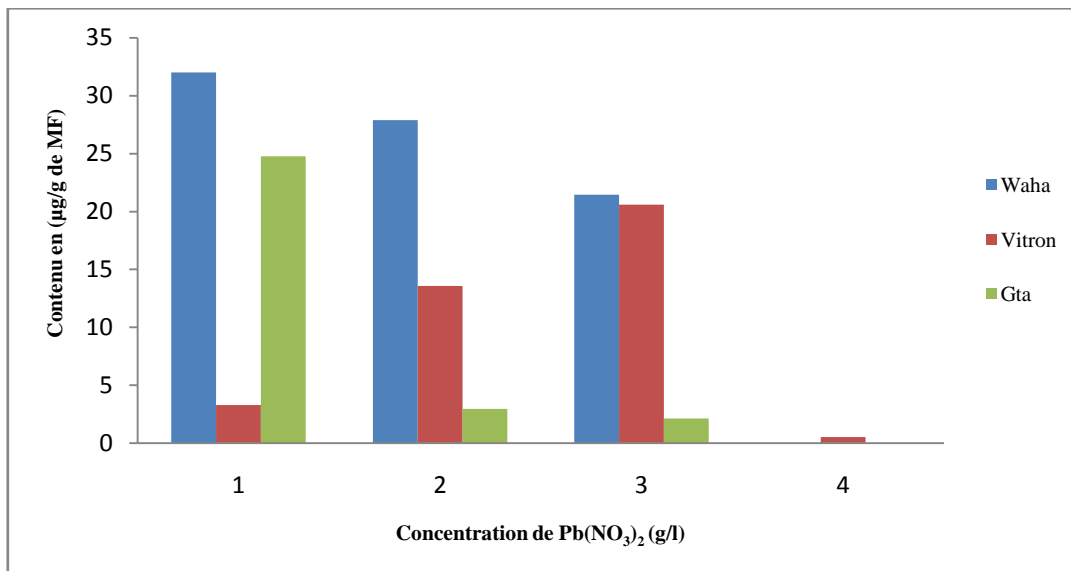


Figure. 26: Effet du Pb(NO₃)₂ sur le contenu en proline
 [1]: 0 g/l, [2]: 0.15g/l, [3]: 0.25 g/l, [4]: 0.35g g/l de Pb(NO₃)₂

IV.1.3. Paramètres enzymatiques

IV.1.3.1. Effet du plomb sur l'activité de la peroxydase

Les résultats (Figure.27) montrent que l'activité peroxydasique varie d'une manière hautement significative entre les trois variétés étudiés ($P \leq 0.001$). Le traitement des graines par la dose la plus faible en plomb (0.15g/l) a provoqué une légère élévation de l'activité peroxydasique. Par contre, les fortes concentrations (0.25, 0.3g/l) ont induit une régression de l'activité enzymatique avec des valeurs de 6.8 µKat/s de MF pour la variété Waha, 5.03µKat/s de MF pour la variété Vitron et activité nulle µKat/s de MF de la variété Gta.

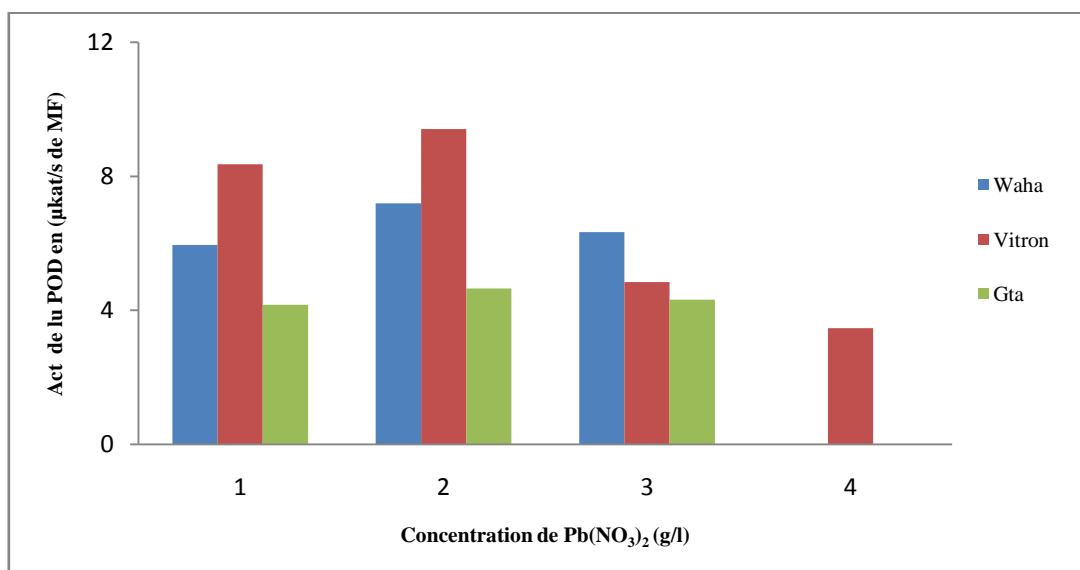


Figure. 27: Effet du $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ sur l'activité de la peroxydase

[1]: 0 g/l, [2]: 0.15g/l, [3]: 0.25 g/l, [4]: 0.35g g/l de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$

IV.1.3.2. Effet du plomb sur l'activité de la catalase

L'effet du plomb sur la catalase (figure 28) montre des différences très hautement significatives pour les trois variétés ($P \leq 0.001$). La figure révèle que les fortes concentrations en $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ réduisent l'activité de la catalase chez la variété Waha et Gta (0.0 $\mu\text{Kat/g}$ de MF respectivement pour la plus forte dose à savoir (0.35 g/l). Par contre chez la variété Vitron, ces mêmes teneurs stimulent légèrement l'activité de cette enzyme (catalase).

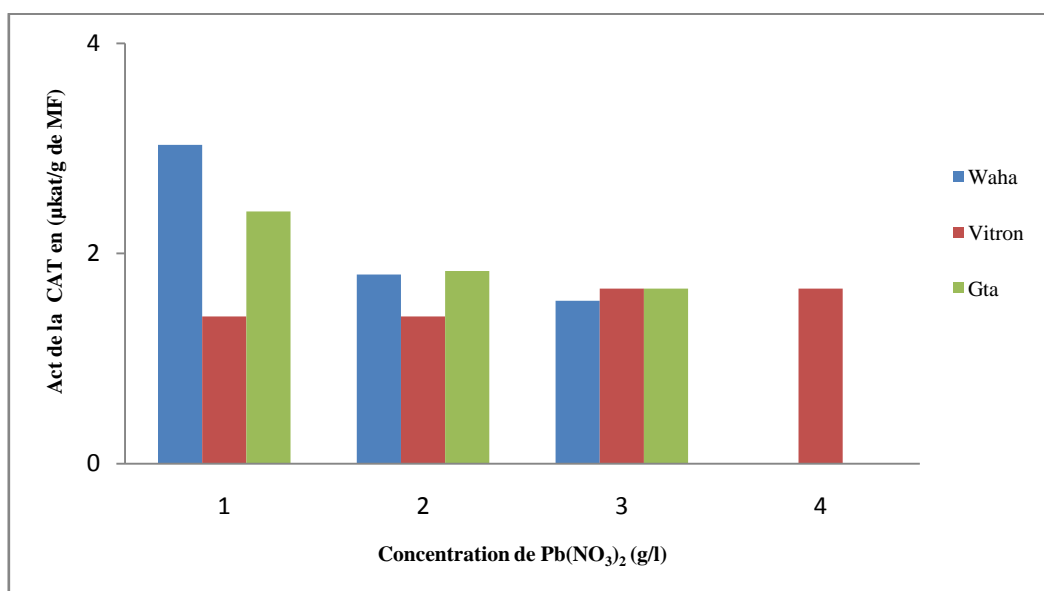


Figure. 28: Effet du $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ sur l'activité de la catalase

[1]: 0 g/l, [2]: 0.15g/l, [3]: 0.25 g/l, [4]: 0.35g g/l de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$

IV.1.3.3. Effet du plomb sur l'activité du gaïacol peroxydase (GPOX)

L'activité du GPOX chez la variété Waha (0.116nmols/min/mg de protéines) est supérieure à l'activité des autres variétés dans les lots témoins (figure 29), avec la concentration 0.15g/l de solution du $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$. En outre, cette activité a été réduite chez les trois variétés pour toutes les concentrations à l'exception des doses C_2 et C_3 qui l'ont légèrement stimulé chez la variété Vitron avec des valeurs respectives de (0.09 et 0.07nmols/min/mg de protéines).

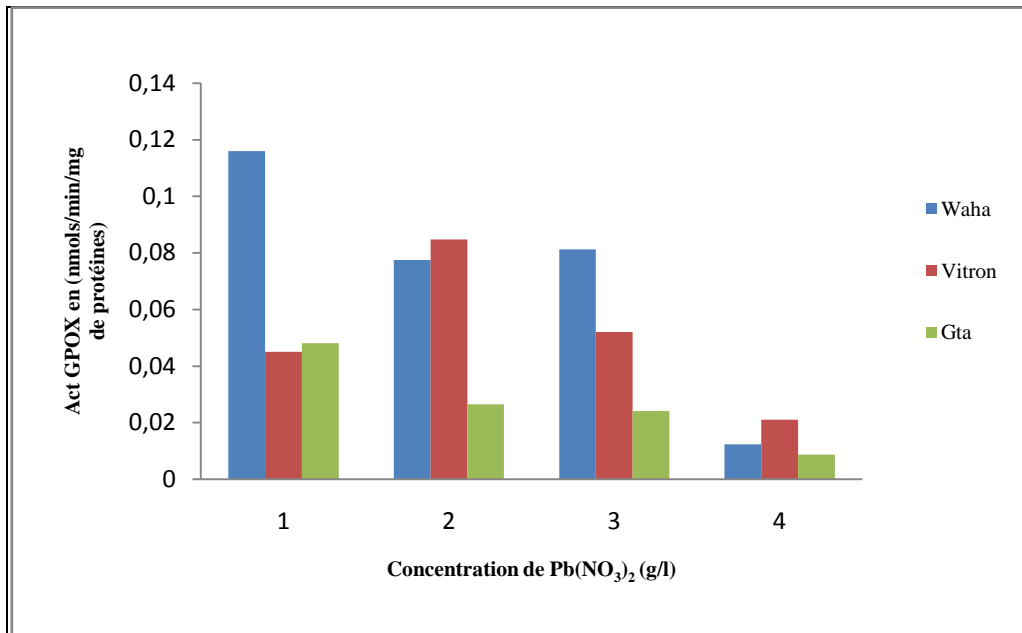


Figure. 29: Effet du Pb(NO₃)₂ sur l'activité du gaïacol peroxydase
 [1]: 0 g/l, [2]: 0.15g/l, [3]: 0.25 g/l, [4]: 0.35g g/l de Pb(NO₃)₂

IV.1.4. Effet du plomb sur le contenu en glutathion

Les résultats obtenus montrent que le contenu en glutathion varie d'une façon très hautement significative chez les trois variétés ($P \leq 0,001$) Le contenu en glutathion (figure 30) a d'une façon globale diminué chez les plantules des graines traitées chez les trois variétés étudiées avec un effet important de la forte dose (C₄) à l'exception de la dose (C₂) qui a un peu stimulé sa synthèse chez la variété Vitron (0.7 μ moles/mg de protéine)

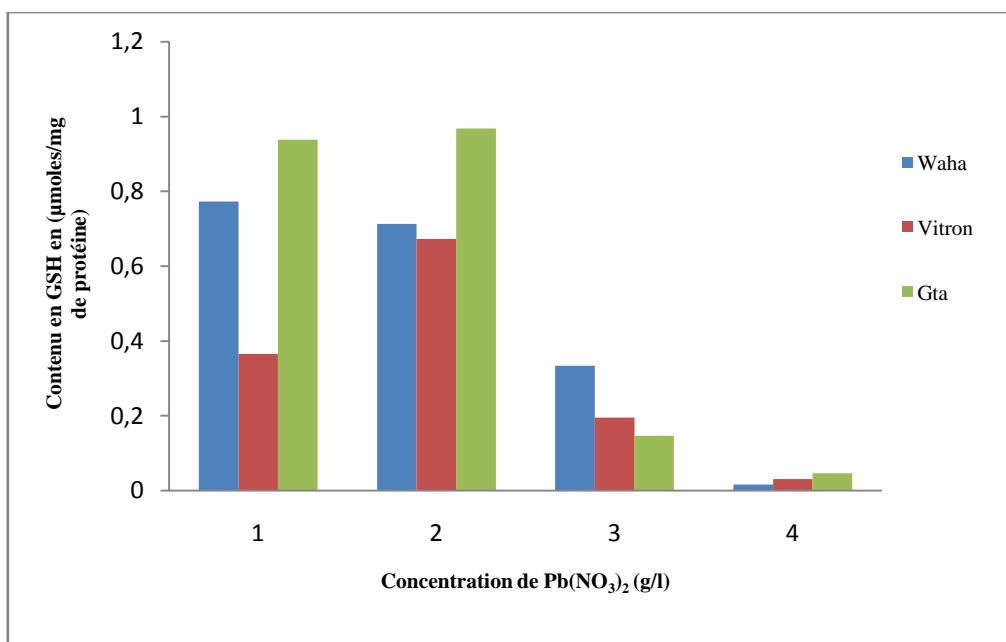


Figure. 30: Effet du Pb(NO₃)₂ sur le contenu en glutathion

[1] :0 g/l, [2] : 0.15g/l, [3]: 0.25 g/l, [4]: 0.35g g/l de Pb(NO₃)₂

IV.2.Résultats de la croissance

IV.2.1. Paramètres morphologiques

IV.2.1.1. Nombre de feuilles par plante

Selon la figure 31, le nombre des feuilles par plante des trois variétés est compris entre 4 et 5 dans les pots des plantes témoins. Le nombre de feuilles des plantes où la concentration est de 0.15g/l, est important par rapport aux plantes témoins des trois variétés. De plus, dans les lots où la concentration en nitrate du plomb est élevée, le nombre des feuilles se réduit graduellement. On remarque que la variété Vitron a le nombre le plus élevé des feuilles dans la concentration 0.15g/l. L'analyse de la variance montre que le nombre des feuilles n'est pas significatif chez les trois variétés étudiées, et très hautement significatif entre les concentrations du plomb ($p \leq 0.001$).

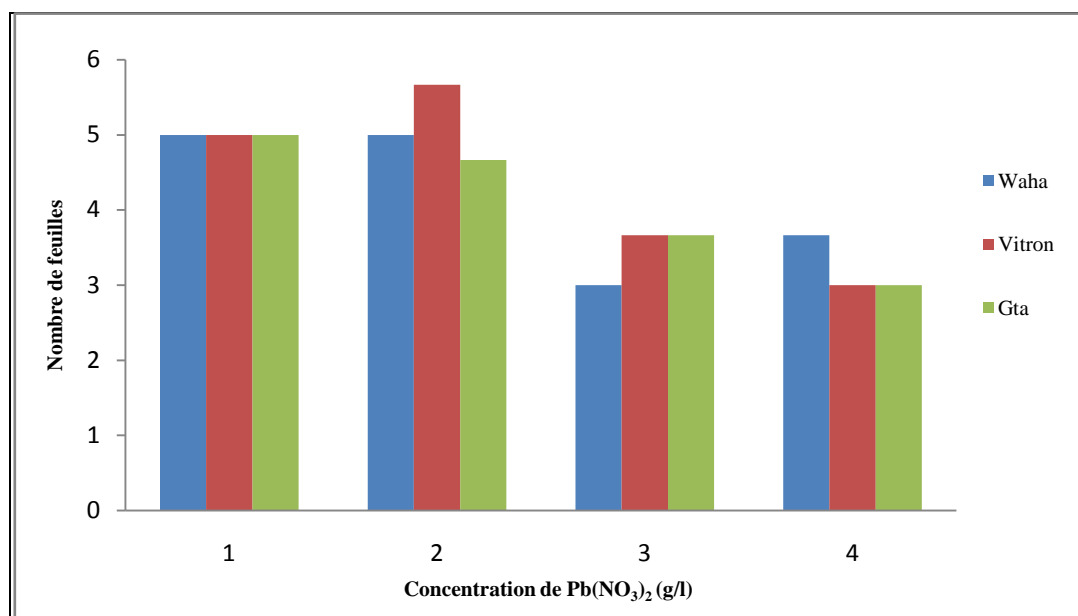


Figure. 31: Effet du Pb(NO₃)₂ sur le nombre des feuilles

[1]: 0 g/l, [2]: 0.15g/l, [3]: 0.25 g/l, [4]: 0.35g g/l de Pb(NO₃)₂

IV.2.1.2. Surface foliaire

Les résultats obtenus après la pesée et le calcul (figure 32), donnent que la surface foliaire des trois variétés est apparue presque similaire (entre 28.25 et 28.05 cm²), après le rajout de traitement de solution de nitrate du plomb, la surface foliaire des trois variétés se réduit progressivement avec des valeurs différentes, les tests statistiques indiquent des différences très hautement significatives entre les variétés et entre les concentrations des solutions utilisés ($p \leq 0.001$).

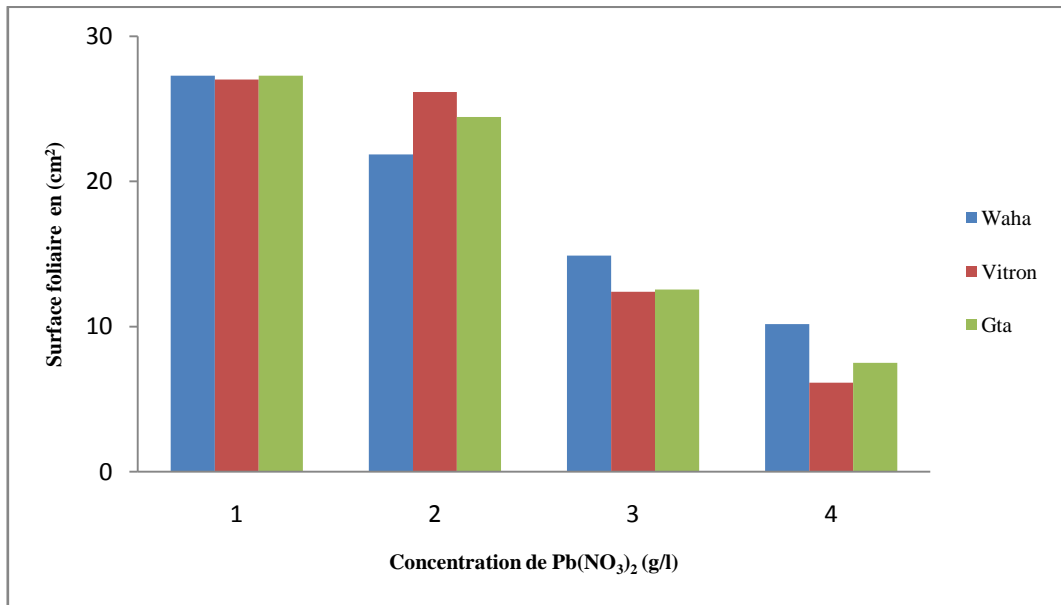


Figure. 32: Effet du Pb(NO₃)₂ sur la surface foliaire
 [1]: 0 g/l, [2]: 0.15g/l, [3]: 0.25 g/l, [4]: 0.35g g/l de Pb(NO₃)₂

IV.2.1.3. Poids spécifique des feuilles

D'après la figure 33, on a observé que, dans les lots témoins (0 g/l de Pb(NO₃)₂), le poids spécifique des feuilles se situe entre 0.28 et 0.30 g/cm². Par contre, dans les lots traités ou la concentration du nitrate de plomb augmente ce paramètre est réduit progressivement, chez les trois variétés. L'analyse statistique montre des différences très hautement significatives entre les traitements appliqués.

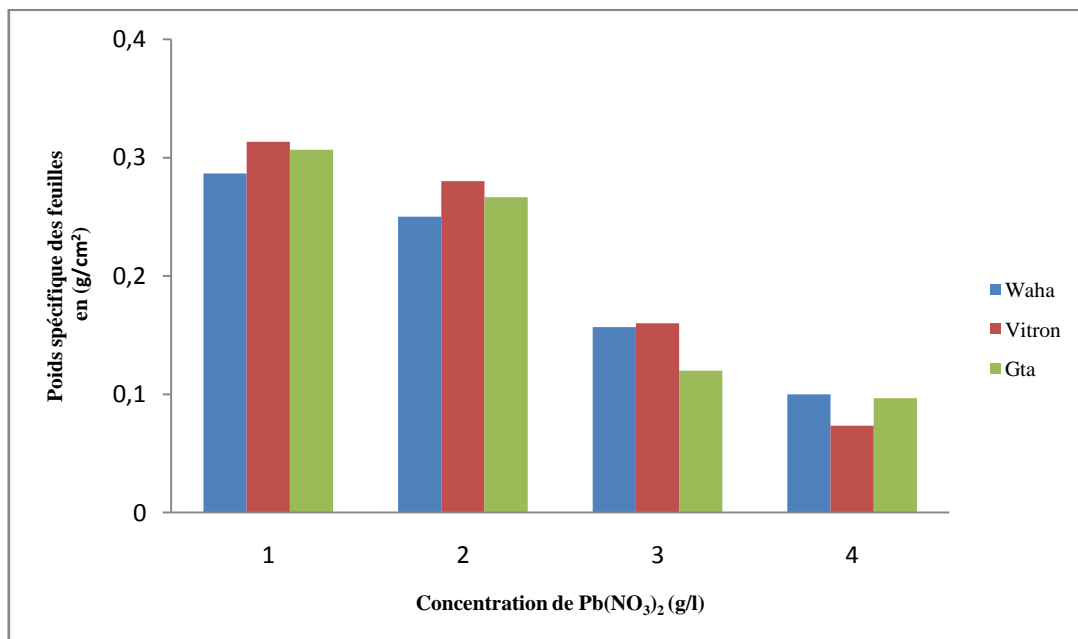


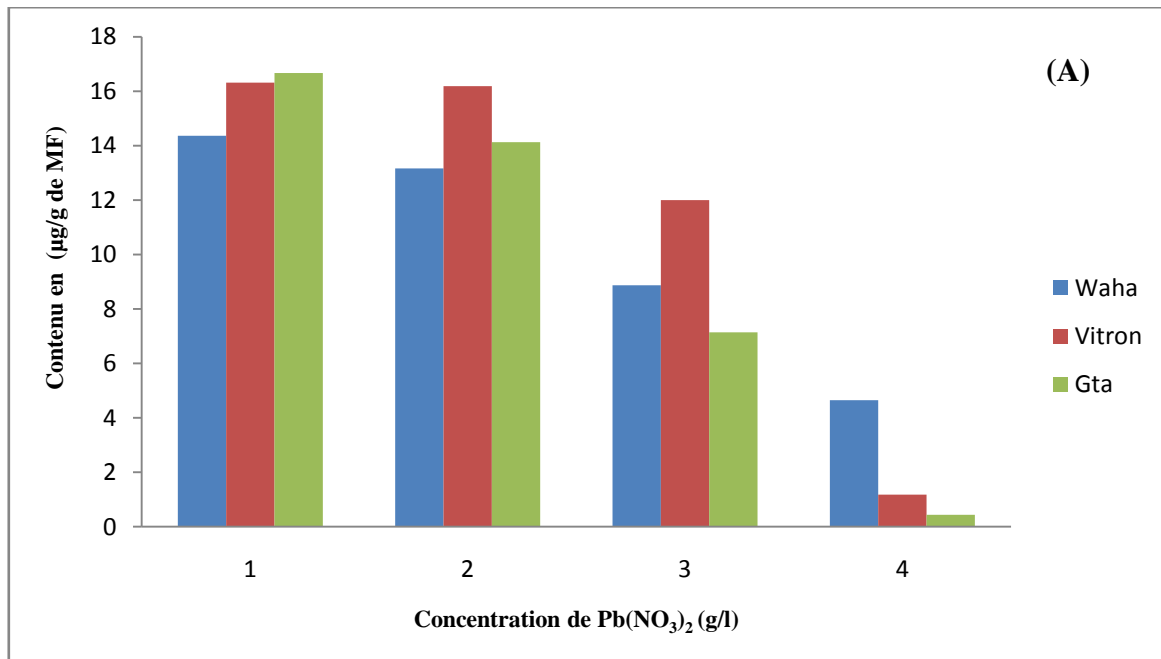
Figure. 33: Effet du $Pb(NO_3)_2$ sur le poids spécifique des feuilles
[1]: 0 g/l, [2]: 0.15g/l, [3]: 0.25 g/l, [4]: 0.35g g/l de $Pb(NO_3)_2$

IV.2.2. Paramètres biochimiques

IV.2.2.1. Contenu en chlorophylles

L'effet du nitrate du plomb sur les pigments chlorophylliens, chlorophylle (a), chlorophylle (b) et chlorophylle totale (a+b) est mentionné dans la figure 34.

Le contenu en chlorophylle totale (a+b) chez la variété Vitron est supérieur aux autres variétés (17.86 μ g/g de MF) dans les lots témoins. Par contre, dans les lots traités avec les trois concentrations de solution du $Pb(NO_3)_2$, on constate que le contenu de la chlorophylle totale est diminué. Cependant, quand on prend les types de chlorophylle indépendamment, on remarque le même constat pour la chlorophylle (b). A l'opposé, celui de la chlorophylle (a) augmente dans la deuxième concentration du nitrate du plomb ($Pb(NO_3)_2$) (0.15g/l), puis se réduit. L'analyse statistique montre bien l'existence de différences très hautement significatives entre les variétés et entre les concentrations chez la chlorophylle (a+b) et la chlorophylle (a) et une différence hautement significative entre les variétés et très hautement significative entre les concentrations.



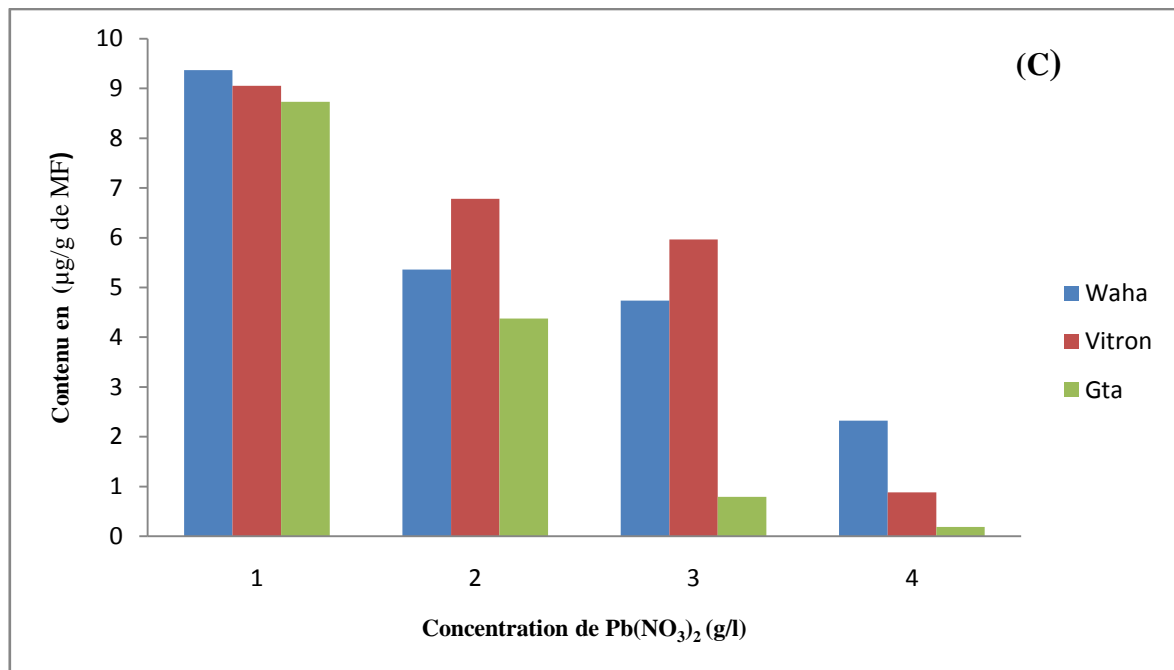
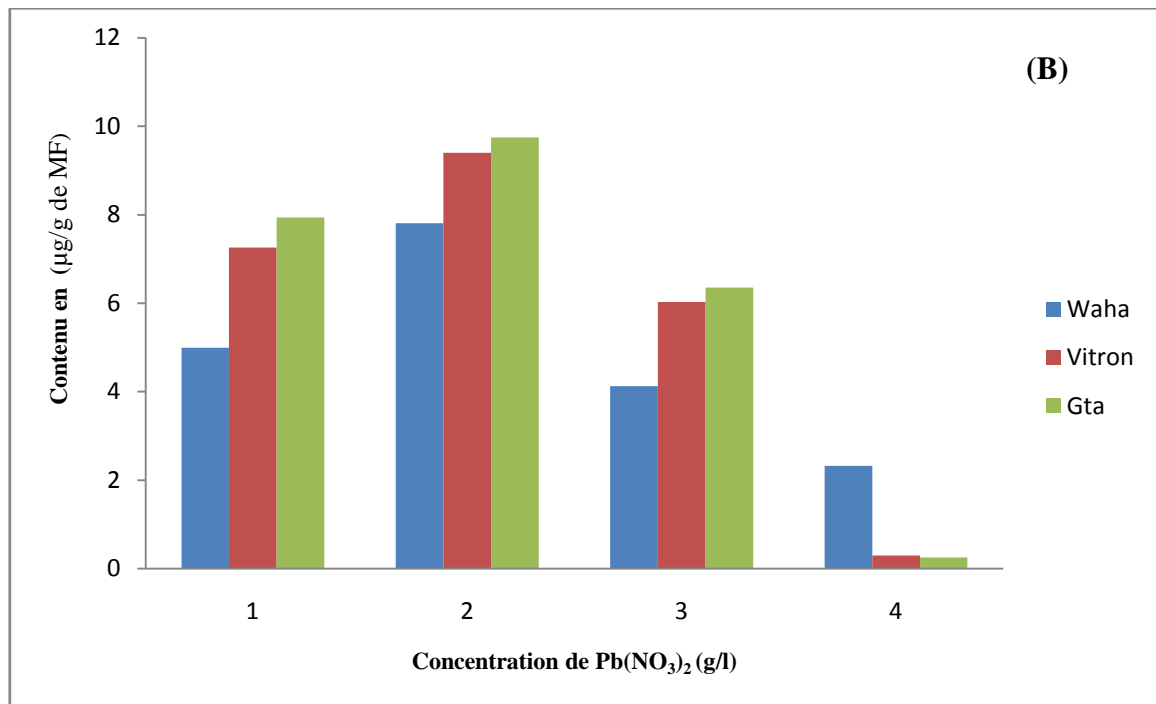


Figure. 34: Effet du Pb(NO₃)₂ sur le contenu en pigments: (A) chlorophylle (a+b), (B) chlorophylle(a) et chlorophylle(b)

[1]: 0 g/l, [2]: 0.15g/l, [3]: 0.25 g/l, [4]: 0.35g g/l de Pb(NO₃)₂

IV.2.2.2. Contenu en caroténoïdes

Le contenu en caroténoïdes (Figure 35) chez la variété Vitron (3.36µg/g de MF) est légèrement plus élevé que celui des autres variétés (3.29, 3.33 µg/g de MF de Waha et Gta respectivement). Par ailleurs, le traitement par le plomb, a provoqué une baisse progressive de ce contenu de l'ordre de (1.40, 1.04, 0.59 µg/g de MF) des variétés respectives Waha, Vitron et Gta avec la plus forte concentration. L'analyse de variance à deux facteurs de classification a montré

des différences très hautement significatives entre les concentrations du plomb et entre les variétés étudiées.

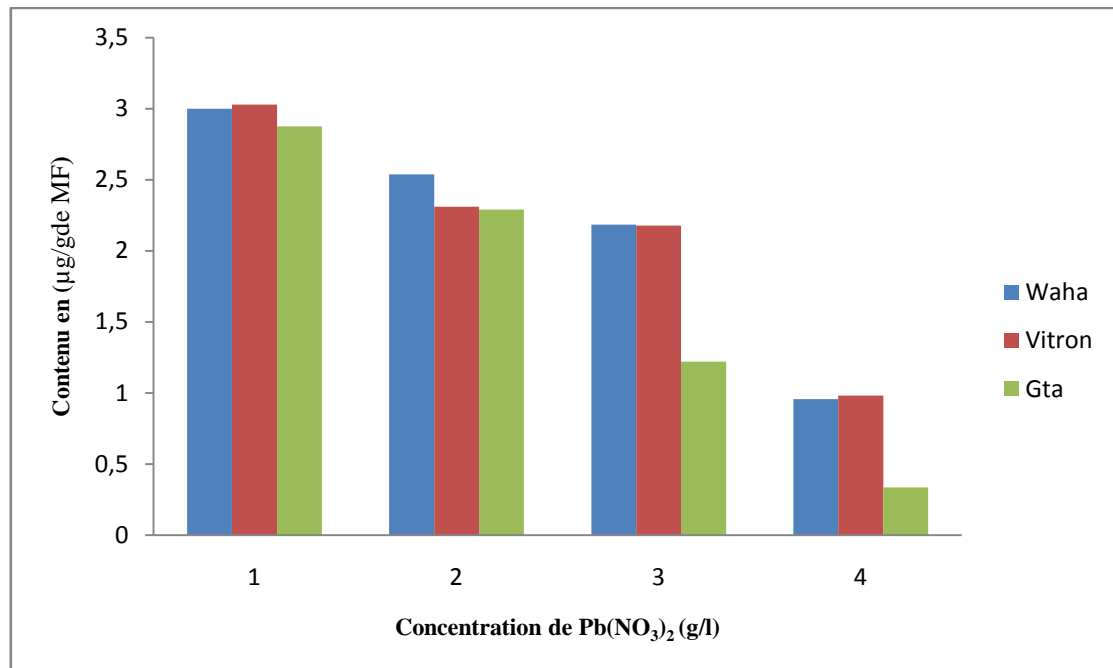


Figure. 35: Effet du $Pb(NO_3)_2$ sur le contenu en pigments caroténoïdes

[1]: 0 g/l, [2]: 0.15g/l, [3]: 0.25 g/l, [4]: 0.35g g/l de $Pb(NO_3)_2$

IV.2.2.3. Contenu en protéines

Dans les lots témoins, le contenu en protéines chez la variété Gta est plus élevé que les autres variétés (7fois plus élevé que celle Waha et presque 2 fois que celle Vitron) (figure 36). Après le traitement il est apparu que les concentrations 0.15 et 0.25 g/l ont provoqué une légère augmentation des protéines chez la variété Waha et Vitron. En revanche, la plus forte concentration à savoir (0,35g/l) a induit une diminution de la synthèse protéique. L'analyse statistique montre que ce paramètre varie d'une manière très hautement significative entre les trois variétés étudiées et les quatre traitements.

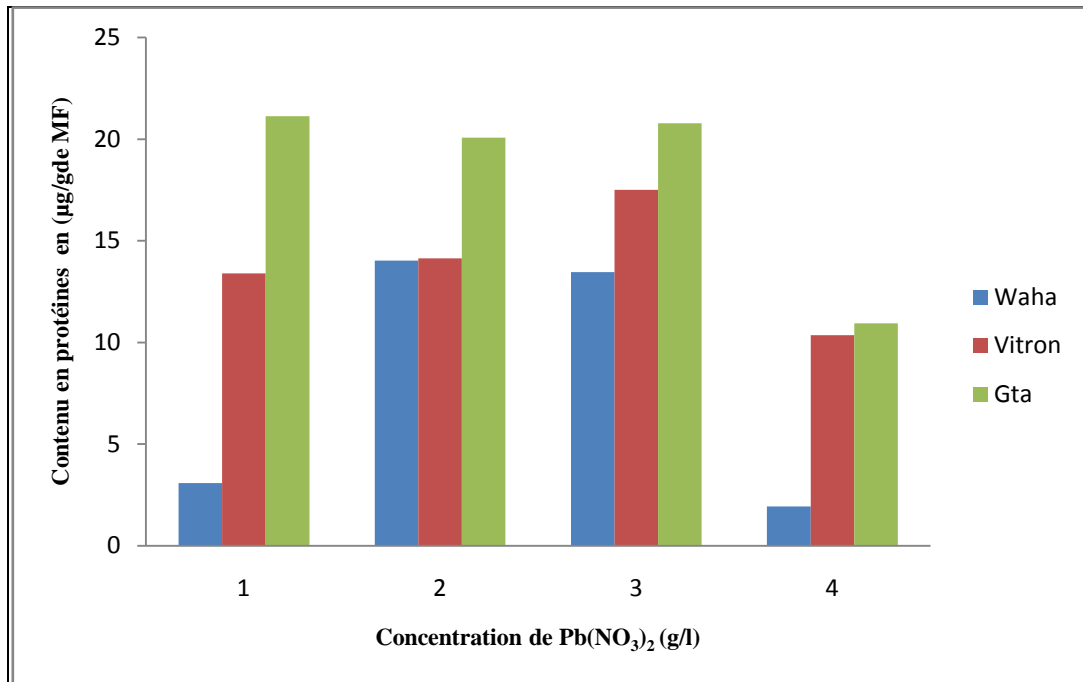


Figure. 36: Effet du Pb(NO₃)₂ sur le contenu en protéines
 [1]: 0 g/l, [2]: 0.15g/l, [3]: 0.25 g/l, [4]: 0.35g g/l de Pb(NO₃)₂

IV.2.2.4. Contenu en proline

La quantité de proline chez la variété Waha (22.85µg/g de MF) est supérieure à celle des autres variétés (l'ordre) avec respectivement (11.10 et 5.73 µg/g de MF dans les lots de témoins (figure 37). En effet, ce caractère varie d'une façon très hautement significative (***)

Le contenu de cet acide aminé augmente avec l'élévation des concentrations de nitrate du plomb utilisée (0.15 et 0.25 g/l), puis diminue dans la concentration la plus forte (0.35g /l).

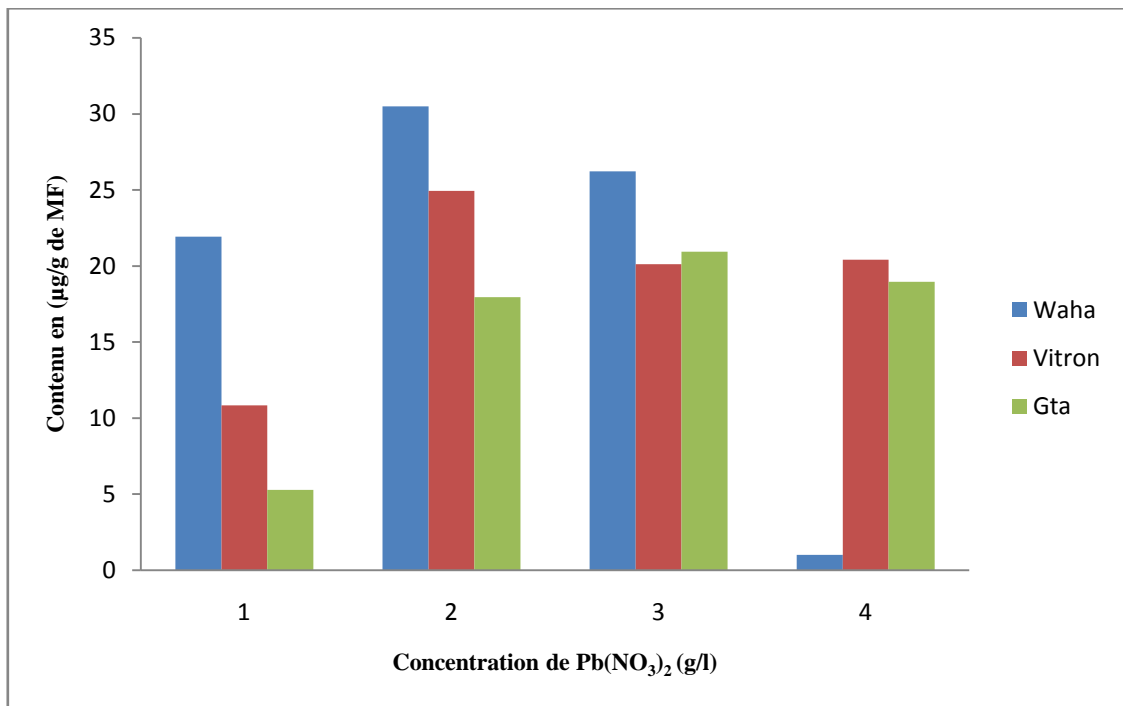


Figure. 37: Effet du Pb(NO₃)₂ sur le contenu en proline
 [1]: 0 g/l, [2]: 0.15g/l, [3]: 0.25 g/l, [4]: 0.35g g/l de Pb(NO₃)₂

IV.2.2.5. Contenu en sucres solubles

Le contenu en sucre solubles varie d'une manière très chez les variétés et traitements étudiés. La quantité des sucres solubles trouvée chez la variété Vitron est plus importante que celle des autres variétés (presque le double). En outre, dans les lots traités par le plomb le contenu en sucres solubles chez la variété Vitron se réduit de (52.14, 41.15 et 35.78 µg/g de MF dans les concentrations respectives: 0.15, 0.25 et 0.35 g /l et ce contenu reste un peu stable (entre 35 et 40 µg/g de MF) dans les quatre concentrations chez les variétés Waha et Gta (figure 38).

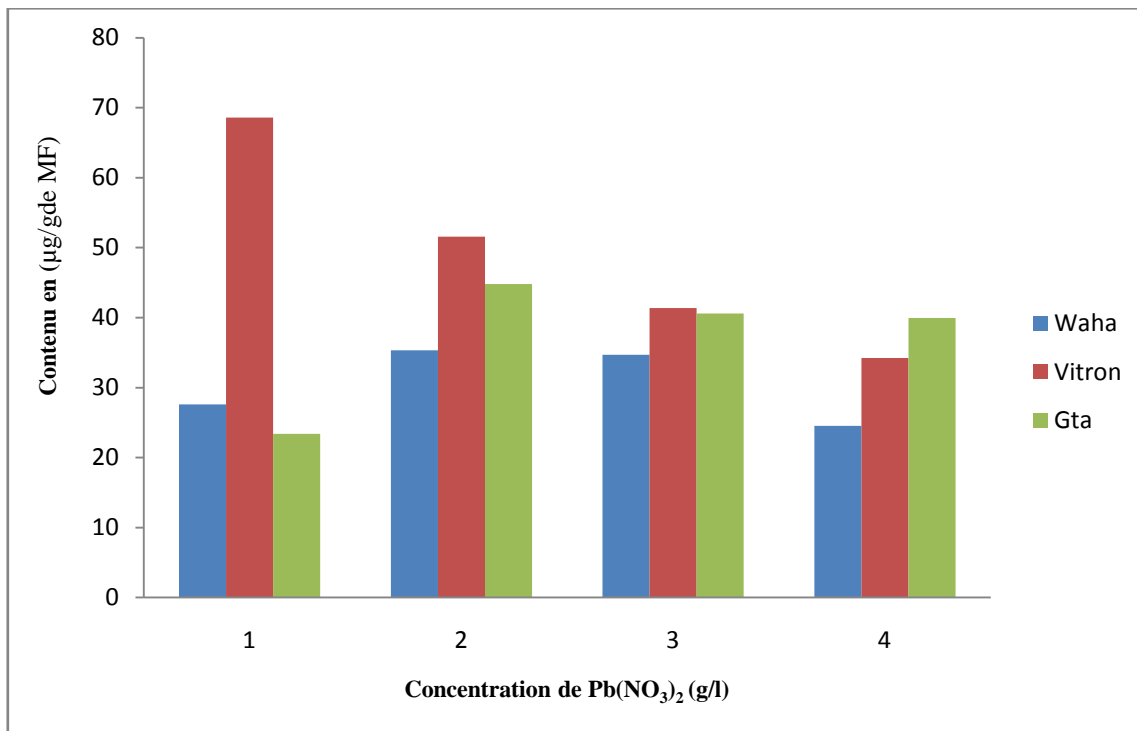


Figure. 38: Effet du Pb(NO₃)₂ sur le contenu en sucres solubles

[1]: 0 g/l, [2]: 0.15g/l, [3]: 0.25 g/l, [4]: 0.35g g/l de Pb(NO₃)₂

IV.2.3. Paramètres enzymatiques

IV.2.3.1. Effet du plomb sur l'activité du catalase

L'effet du plomb l'activité de catalase est représentée par la figure 39. En effet, l'activité de cette enzyme est élevée chez la variété Vitron dans les lots témoins dans les feuilles et les racines (2.70, 3.3 µKat/g de MF) respectivement. Par ailleurs, Après les différents traitements, cette activité semble être légèrement perturbée chez cette même variété. Par contre, cette enzyme (la catalase) est caractérisée par une bonne activité dans les autres variétés même avec les hautes concentrations dans les feuilles. A l'opposée, dans les racines l'activité catalasique est réduite dans les traitements par les fortes doses 0.25 et 0.35 g/l. L'analyse statistique montre des différences très hautement significatives ($p \leq 0.001$).

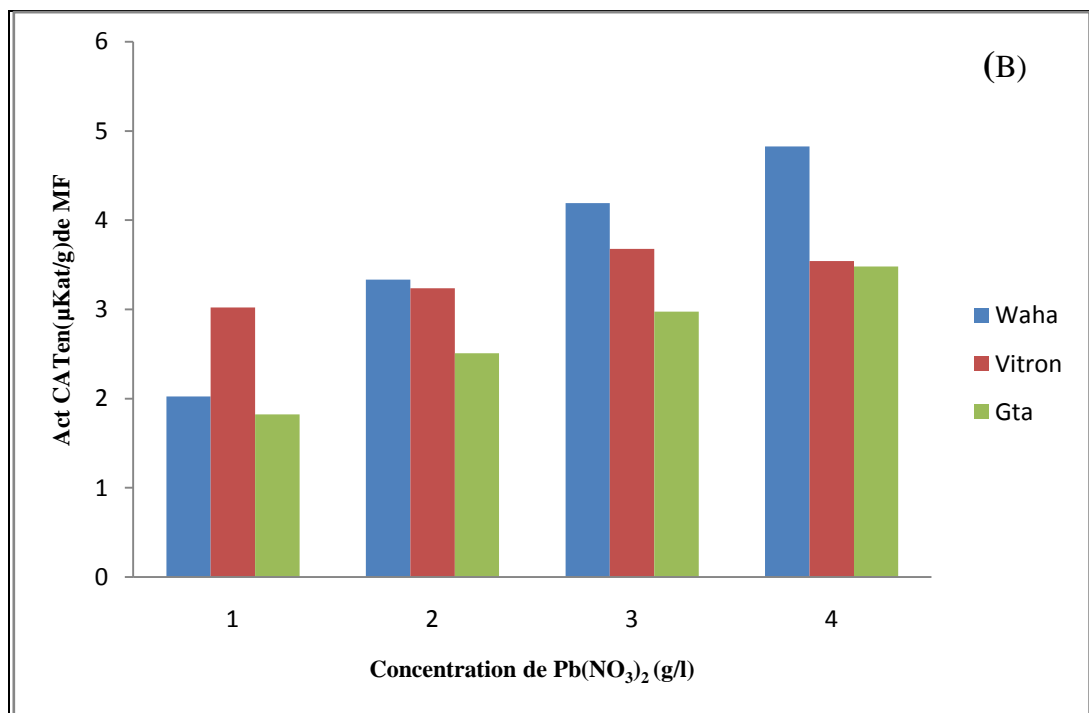
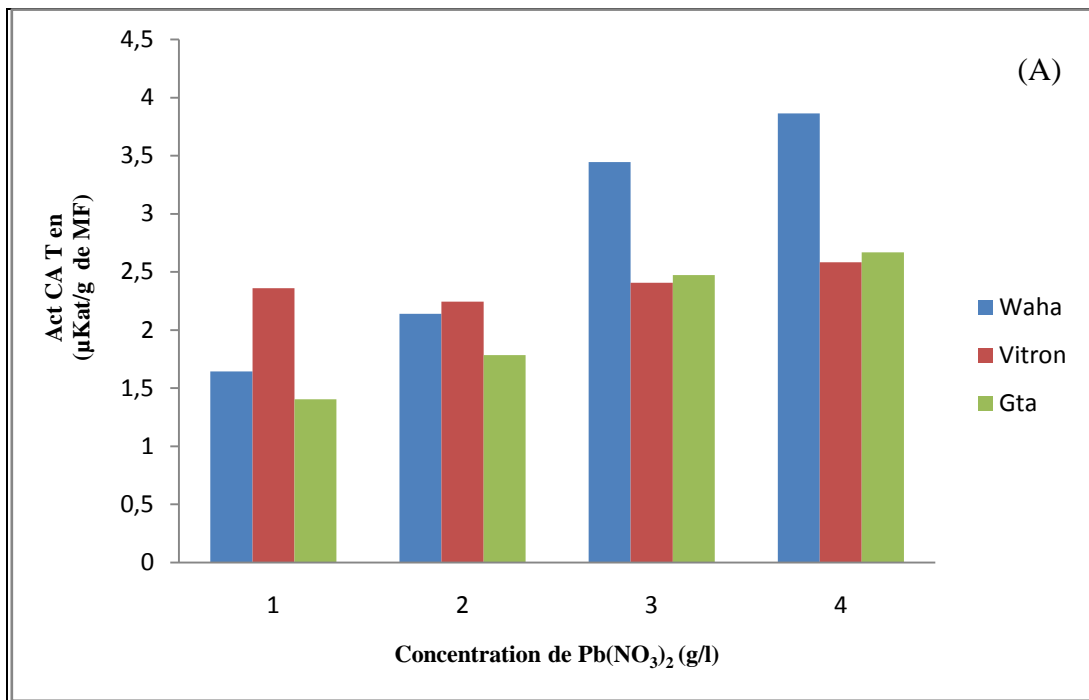


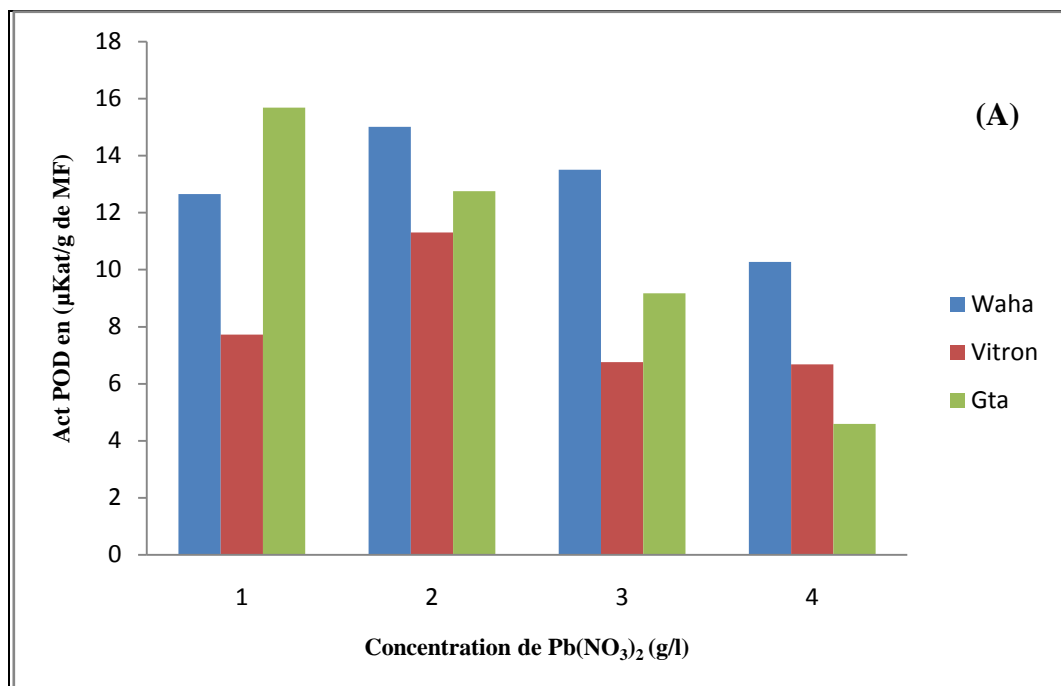
Figure. 39: Effet du $Pb(NO_3)_2$ sur l'activité de la catalase. (A) feuilles, (B) racines.

[1]: 0 g/l, [2]: 0.15g/l, [3]: 0.25 g/l, [4]: 0.35g g/l de $Pb(NO_3)_2$

IV.2.3.2. Effet du plomb sur l'activité de la peroxydase

Les résultats de l'activité de la peroxydase (POD) sont enregistrés dans la figure 40. En effet, l'activité de cette enzyme semble augmenter légèrement chez le traitement C₁ (0.15 g/l) avec (15.75, 11.7 µKat/s de MF) par rapport aux témoins (13.20, 8.3µKat/s de MF) chez les variétés Waha et Vitron, dans les feuilles. C'est le même constat observé dans les racines avec cette même dose et les témoins pour les trois variétés. Puis l'activité de la POD diminue progressivement pour les deux dernières concentrations dans les feuilles et les racines.

L'analyse de variance à deux facteurs contrôlés a révélé des différences très hautement significatives (***) entre les concentrations du métal et les variétés étudiés dans les feuilles et les racines.



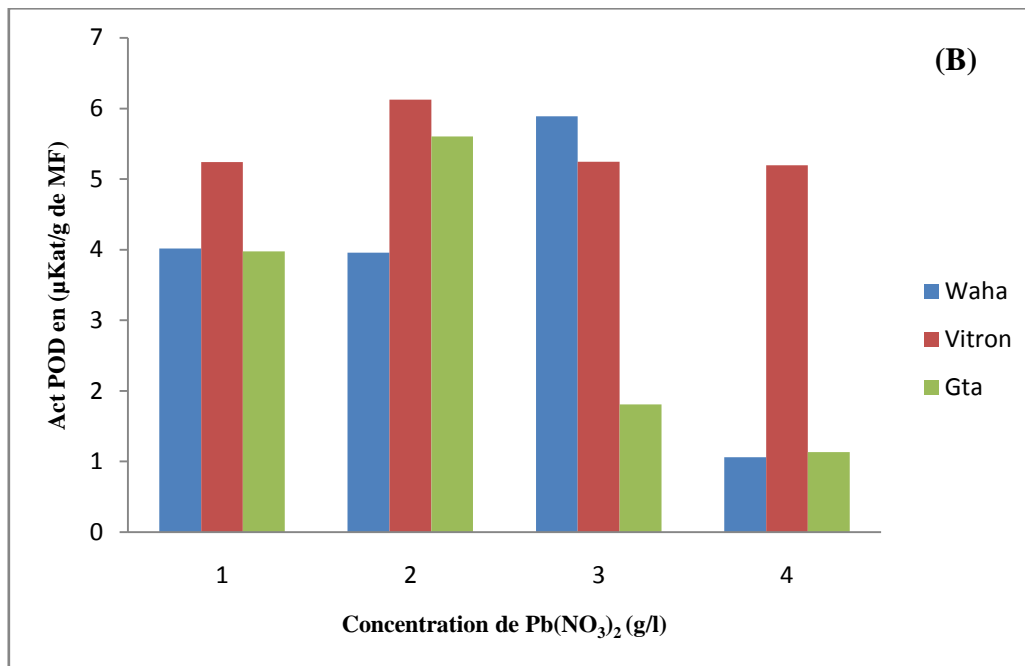


Figure. 40: Effet du Pb(NO₃)₂ sur l'activité de la peroxydase. (A) feuilles, (B) racines.

[1]: 0 g/l, [2]: 0.15g/l, [3]: 0.25 g/l, [4]: 0.35g g/l de Pb(NO₃)₂

IV.2.3.3. Effet du plomb sur l'activité de l'ascorbate peroxydase

La figure 41 illustre l'effet du plomb sur l'activité ascorbate peroxydase des trois variétés de blé dur étudiées.

Il ressort de ces résultats que la plus faible activité de cette enzyme ascorbate peroxydase (APX) dans les feuilles caractérise la variété Vitron avec une valeur de (0.07mol/min/μg de protéines) et la variété Waha dans les racines (0.04mol/min/μg de protéines). En présence du plomb, l'activité de l'APX augmente chez les variétés Waha et Gta dans les feuilles et seulement Waha dans les racines. En revanche, l'activité de cette enzyme est nettement réduite dans le traitement par les fortes concentrations dans les feuilles et les racines. L'analyse de variance à deux facteurs contrôlés a révélé des différences très hautement significatives entre les traitements appliqués et entre les variétés utilisées et ça dans les feuilles et dans les racines.

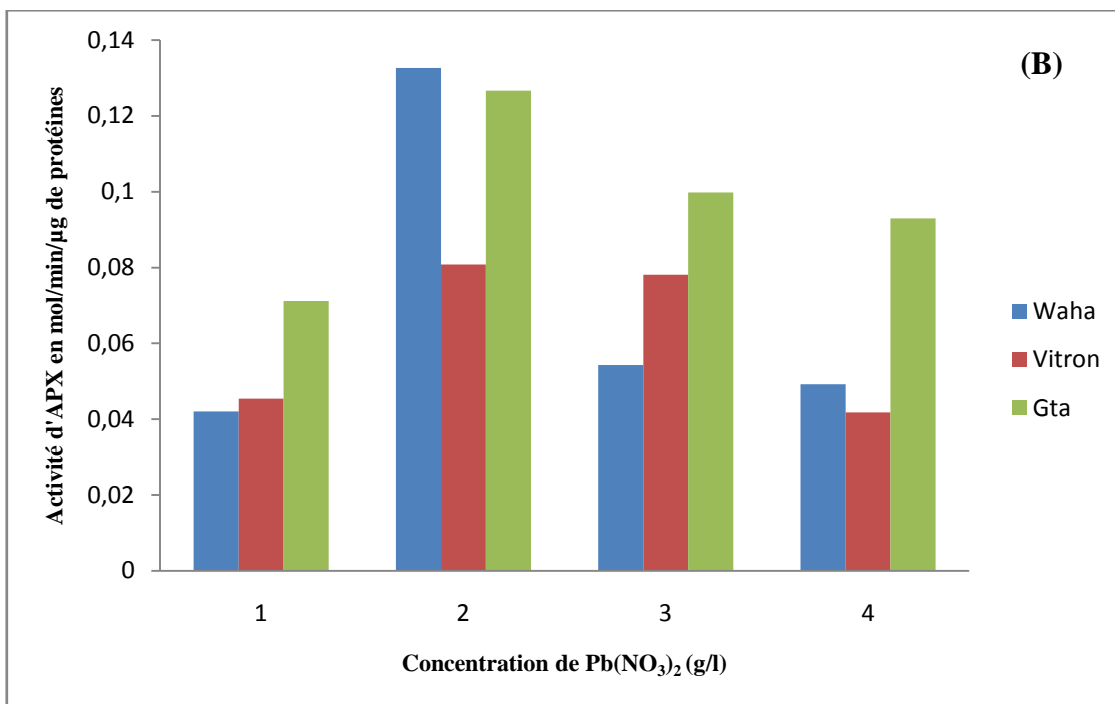
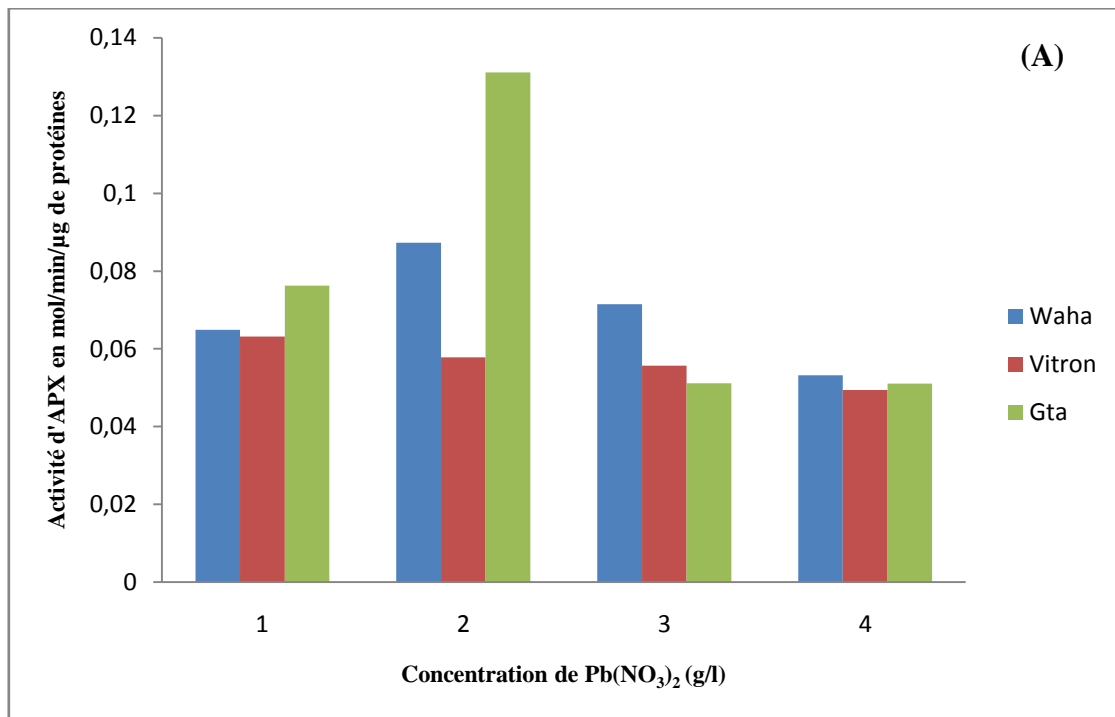


Figure. 41: Effet du $Pb(NO_3)_2$ sur l'activité de l'ascorbate peroxydase. (A) feuilles, (B) racines. [1]: 0 g/l, [2]: 0.15g/l, [3]: 0.25 g/l, [4]: 0.35g g/l de $Pb(NO_3)_2$

IV.2.3.4. Effet du plomb sur l'activité du gaïacol peroxydase

Les résultats de l'activité de l'enzyme gaïacol peroxydase (GPOX) sont reportés dans la figure 42. En effet, celle-ci révèle bien que l'activité du GPOX a augmenté chez la variété Gta

traitée avec la dose 0,15g/l de solution du $Pb(NO_3)_2$ par rapport au témoin. Signalons par ailleurs, que cette activité a été sensiblement réduite par l'utilisation des fortes doses notamment (0,25 et 0,35g/l) chez les trois variétés. L'analyse statistique montre bien que ce caractère varie d'une manière très hautement significative ($p \leq 0,001$).

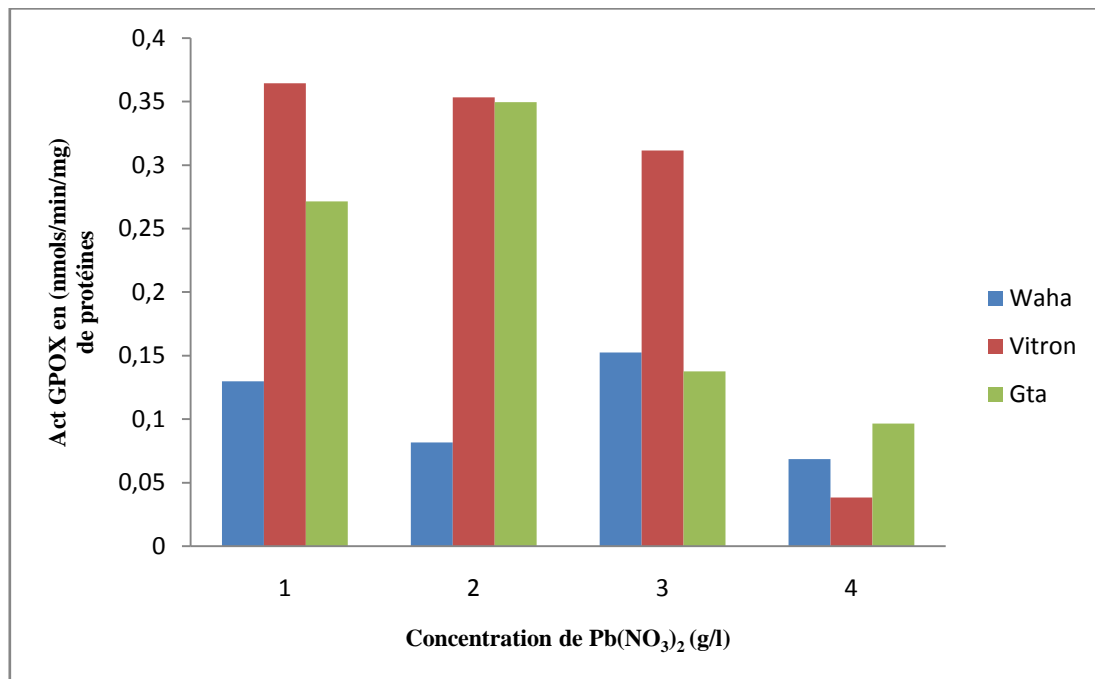


Figure. 42: Effet du $Pb(NO_3)_2$ sur l'activité du gaïacol peroxydase
 [1]: 0 g/l, [2]: 0.15g/l, [3]: 0.25 g/l, [4]: 0.35g g/l de $Pb(NO_3)_2$

IV.2.4. Effet du plomb sur le contenu en glutathion

Les résultats de la détermination du contenu en glutathion (GSH) sont mentionnés sur la Figure 43. En effet, toutes les doses utilisées du plomb ont entraîné une augmentation très hautement significative ($P \leq 0,001$) de ce paramètre chez les trois variétés. La 1^{ère} dose (la plus faible : 0,15g/l) a entraîné une légère augmentation du contenu de GSH chez la variété Vitron (de 0.272 à 0.599 μ moles/mg de protéines) par rapport au témoin. Alors que les fortes doses (0.25g/l et 0.35g/l de la solution du nitrate du plomb), ont entraîné une diminution du contenu de la GSH chez les trois variétés étudiées.

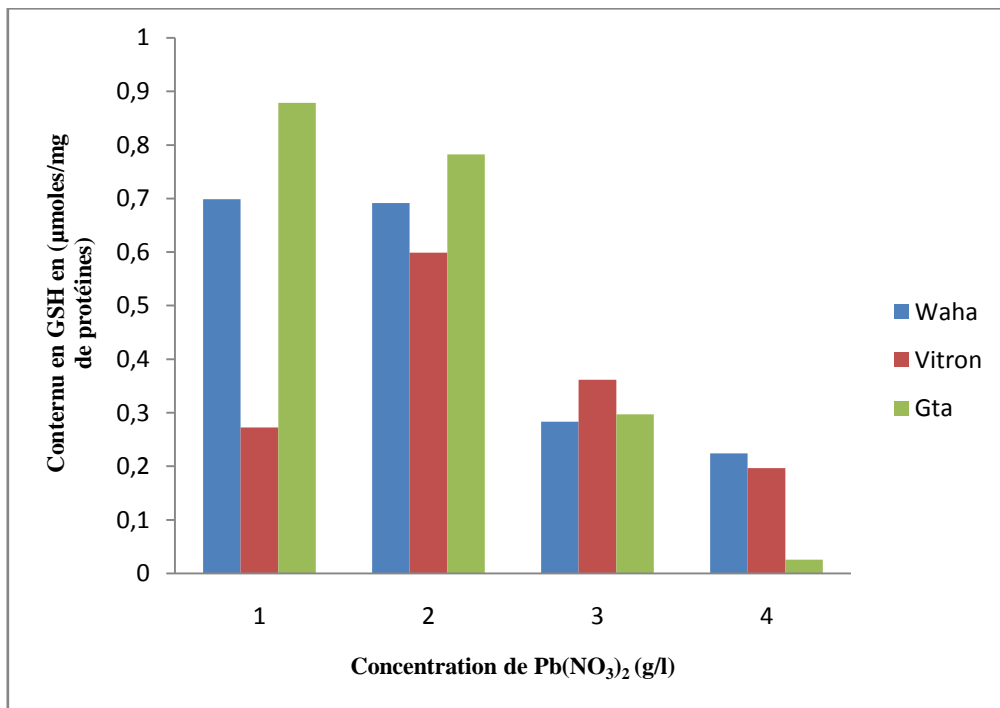


Figure. 43: Effet du Pb(NO₃)₂ sur le contenu en glutathion
[1]: 0 g/l, [2]: 0.15g/l, [3]: 0.25 g/l, [4]: 0.35g g/l de Pb(NO₃)₂

Discussion

DISCUSSION

La problématique de notre travail s'inscrit dans une thématique importante, développée au sein de notre laboratoire et visant à évaluer l'impact d'une contamination métallique, réaliste sur des végétaux, particulièrement le blé. Cette étude constitue une suite logique, complémentaire à des travaux déjà effectués sur le devenir du plomb dans le système sol- plante a proximité d'un sol contaminé par une usine de recyclage du plomb (Cecchi, 2008) et/ou des travaux au laboratoire sur des espèces sentinelles telles que la fève: *Vicia faba* (Pourrut, 2008). Pour notre étude, les doses du métal choisi sont fonction de la réalité environnementale c'est-à-dire proche des concentrations pouvant se rencontrer dans des sols pollués par des activités anthropiques.

Dans ce contexte, nous nous proposons de présenter une discussion générale des principaux résultats obtenus dans notre travail. Cette discussion sera composée de deux parties :

- une première partie concernant les effets du plomb sur la germination et le développement des plantules de blé, caractérisés, à l'aide de plusieurs biomarqueurs de stress (biochimiques), l'état physiologique de plantes de *Triticum durum* soumises à différentes concentrations en plomb,
- une deuxième partie qui met en évidence certains mécanismes conduisant à la phytotoxicité du plomb, en s'intéressant, plus particulièrement, au rôle joué par les espèces réactives de l'oxygène (ERO) notamment l'activité des enzymes antioxydantes.

Le développement des plantes traverse plusieurs phases de croissance allant de graine (germination) à la graine (récolte). Ces phases sont bien distinctes du point morphologique. A cet effet, nous distinguons chez les céréales: la levée, le tallage, la montaison la floraison etc.

Dans ce travail, nous nous sommes fixé à étudier l'impact du plomb sur uniquement la période de germination et une courte durée de la croissance.

En effet, la germination ou l'embryogénèse tardive, est la première phase du développement d'une plante (Tourte *et al.*, 2005), dans laquelle la graine retourne à la vie active après une période de dormance (Théron, 1964 ; Meyer *et al.*, 2004). Lors de la germination l'embryon augmente de volume par l'utilisation de l'énergie provenant de l'oxydation des réserves sous l'influence de l'action des différentes enzymes hydrolasiques, qui dégage progressivement les enveloppes qui l'entourent et la sortie de la coléoptile et des radicules. Dans cette phase la graine a besoin de conditions externes et internes favorables pour un développement normal.

Les résultats obtenus dans cette première partie de ce travail, montre que le plomb a exercé un effet négatif sur tous les paramètres germinatifs. Des études antérieures, Seregin et

Kozidzinska, (1998) ; Sylwia *et al.*, (2009) en fait les mêmes constats. En effet, il a été trouvé que le plomb induit une inhibition de la faculté germinative des graines du blé, du haricot (Wixrbicka et Obidzinska, 1998) et de la fève (Pourrut *et al.*, 2008).

Les résultats obtenus montrent que les concentrations toxiques en plomb, pour la croissance sont variables chez les variétés étudiées. Dans certaines recherches, cette variation est notée même entre les espèces. En effet, la toxicité du plomb dépend fortement des interactions de cet élément métallique avec les espèces végétales considérées et également du mode de culture et des facteurs environnementaux. Dans notre travail la concentration 0.3g/l est une concentration inhibitrice de la croissance des variétés de blé dur étudiées. D'autres travaux, ont montré que pour des concentrations extractibles à l'EDTA dans un sol atteignant 800 mg.Kg⁻¹ de sol, la croissance du Ray Grass n'était pas affectée (Rooney *et al.*, 1999). Par contre, Päivöke (2002), quant à lui a montré que la toxicité du plomb vis-à-vis du pois dépendait fortement de l'âge de la plante en plus de la concentration en plomb dans le sol. Cependant, ce même auteur signale des effets néfastes sur la croissance des plantes pour des concentrations en plomb inférieures à 500 mg.Kg⁻¹. Liu *et al.*, (2003) ont démontré que la sensibilité ou la tolérance des plantes au plomb était cultivar-dépendante. En effet, leurs travaux réalisés sur différents cultivars de riz mettent en évidence des retards de croissance et de développement provoqués par 800 mg.Kg⁻¹, mais uniquement pour certains cultivars, d'autres n'y étant pas sensibles. Ceci démontre bien que la toxicité du plomb dépend fortement du comportement des plantes vis-à-vis de ce métal. Malkowski *et al.*, (2002) ont montré que la croissance du maïs était inhibée par la présence de 10µM de plomb dans la solution de culture. Fodor *et al.*, (1996) et Wozny and Jerzynska (1991), ont également mis en évidence la toxicité de 10µM de plomb en solution sur la croissance et de développement du concombre et du haricot respectivement. On a trouvé que les racines sont plus sensibles aux métaux lourds, parce qu'elles sont les premiers organes touchés par la contamination, viennent ensuite, les feuilles et les coléoptiles. Ces résultats sont conformes à d'autres travaux effectués par Kopittke *et al.*, (2007) dans une étude réalisée sur la cornille (*Vigna unguiculata*), qui ont montré que les racines sont plus sensibles que les parties aériennes à l'exposition au plomb. Par ailleurs, la production de biomasse racinaire est inhibée dès le seuil minimal de 0,1µM de plomb dans la solution, avec une apparition de symptômes visibles sur les racines à partir de 1,5µM. L'inhibition de la biomasse des parties aériennes se manifestant quant à elle à partir de 0,3µM.

Donc, d'une manière globale, le plomb semble affecter la croissance et la morphogénèse des plantes, en perturbant de très nombreux mécanismes physiologiques, entraînant un nanisme des plantes. L'inhibition de la division et de l'élongation cellulaire sont les phénomènes les plus souvent reportés pour expliquer ces effets du plomb (Seregin et Ivanov, 2001 ; Malkowski *et al.*, 2002 ; Patra *et al.*, 2004 ; Kopittke *et al.*, 2007). Ceci avait déjà été mis en évidence il y a près de 84

ans par Hammett (1929) qui avait montré une diminution de l'index mitotique dans les racines de maïs et d'oignon, provoquée par la présence de $Pb(NO_3)_2$, et qu'il avait expliqué par la fixation du plomb sur les groupements $-SH$ des protéines.

Concernant les paramètres physiologiques étudiés, la diminution du taux de chlorophylle (a), (b) dans les fortes doses chez les trois variétés. chez les plantes exposées aux métaux lourds est un phénomène très courant et supposé comme étant préliminaire à l'inhibition de la photosynthèse (Prasad, 1999, Oncel *et al.*, 2000). Cependant, les effets observés semblent dépendre de l'âge des feuilles, les feuilles mûres étant plus sensibles que les feuilles néoformées comme l'ont montré des études réalisées par (Barcelo *et al.*, 1988 ; Krupa et Moniak, 1998). En effet, le plomb provoque les enzymes impliquées dans la biosynthèse de la chlorophylle ou bien la RUBISCO qui permet la fixation du CO_2 (Seregin et Ivanov, 2001 ; Patra *et al.*, 2004). L'inhibition de ce type d'enzyme entraîne une forte perturbation de la photosynthèse. De nombreuses études ont été menées pour connaître les cibles des métaux au niveau de la voie de la biosynthèse des pigments photorécepteurs (Stobart *et al.*, 1995 ; Shalygo *et al.*, 1997). Les enzymes impliquées seraient inhibées par une interaction des métaux avec des groupements thiols, parmi elles, l'ALA-synthase et la protochlorophyllide réductase. L'activité de ces enzymes est connue, être inhibée par les métaux lourds chez *Cucumis sativus*, *Hordeum vulgare*, *Phaseolus vulgaris*, ou *Triticum aestivum*.

Ceci entraîne une réduction de la teneur en chlorophylle ainsi que celle de tous les pigments photosynthétiques y compris les caroténoïdes et également une croissance réduite des feuilles. Une concentration plus élevée en plomb provoque une substitution de l'atome de magnésium (Mg) au centre de la molécule de chlorophylle par un atome de plomb(Pb), provoquant un arrêt de la photosynthèse (Kupper *et al.*, 1996).

Chez les trois variétés de blé dur, on a trouvé une augmentation graduelle dans le contenu en sucres solubles. Ce résultat semble être en parfait accord avec ceux trouvés par Pourrut (2008). En effet, les glucides (sucres solubles) s'accumulent même sous l'effet d'autres métaux comme le cadmium (Costa et Spitz, 1997 ; Aoun, 2009), l'arsenic (Jha et Dubey, 2004). Cette accumulation résulte d'une altération des activités enzymatiques, notamment l'invertase acide, le saccharose synthase et l'amidon phosphorylase.

En ce qui concerne les protéines, les trois variétés ont eu une réponse différente vis-à-vis du plomb. En effet, on a constaté une augmentation dans le contenu des protéines chez Waha et Gta avec la dose 0.15g/l et une réduction chez Vitron. Plusieurs auteurs ont signalé que les stress environnementaux peuvent provoquer une baisse ou une hausse des protéines totales (Rai *et al.*, 1983 ; Kumar & Singh, 1991). Dans le premier cas, la réduction des protéines à cause des métaux

lourds peut être expliqué par des réactions de protéolyse et libération d'acides aminées (Berlett et Stadtman, 1997 ; Siedlecka et Krupa, 2002 ; Hsu et Kao, 2003 ; Pena *et al.*, 2006 ; Sharma et Dietz, 2006). Dans le deuxième cas, Chaoui (1997), a montré que le contenu en protéines n'est pas affecté, dans les parties stimulées des plantes par le Cd et le Zn chez *Phaseolus vulgaris*. D'autres auteurs comme Shraddha Singh *et al.*, (2004) ont trouvé une accumulation nette des protéines dans les racines et les feuilles de tomate, proportionnelle à la concentration du métal étudié. En revanche et d'une manière générale, Stalt *et al.*, (2003) ont indiqué que l'exposition des plantes à différentes concentrations de cadmium a tendance à stimuler la synthèse des protéines particulièrement, les phytochélatines dont le rôle est la détoxification.

Les résultats du contenu en proline dans nos essais, ont signalé une augmentation chez la variété Vitron même avec la dose forte 0.25g/l. et une diminution graduelle chez les autres variétés étudiés. Ceux-ci sont également corroborés par les travaux de Sharma et Dietz (2006), Yingli *et al* (2010) sur un grand nombre d'espèces végétales. Cette augmentation a également été observée sous l'effet d'autres métaux tels que le Mn (Lei *et al.*, 2007), le Zn, Co, Cu (Alia *et al.*, 1995 ; Schat *et al.*, 1997 ; Sharmila et Pardha Saradhi, 2002) mais aussi sous l'action d'autres types de stress : salin (Demiral et Türkan, 2005), hydrique (Taulavuori *et al.*, 2005), radiations UV (Pardha Saradhi *et al.*, 1995), thermique (Taulavuori *et al.*, 2005). Aussi, une augmentation de ce soluté compatible a été observée sous l'effet du cadmium chez le tournesol, la silène, le haricot et le soja (Kastori *et al.*, 1992 ; Schat *et al.*, 1997 ; Zhang *et al.*, 2000 ; Balestrasse *et al.*, 2005).

Par ailleurs, la proline est considérée comme agent adaptatif et marqueur de stress favorable. Différentes fonctions sont attribuées à l'accumulation de ce soluté telles que: l'osmorégulation, la chélation et détoxification des métaux, notamment du zinc et du nickel (Bert, 2000 ; Sun *et al.*, 2007), la protection des enzymes, la régulation de l'acidité cytosolique, la stabilisation des réactions de la synthèse protéique et piégeage des espèces réactives à l'oxygène (ROS), assurant ainsi une protection des constituants cellulaires. (Sharmila et Pardha Saradhi, 2002).

L'absorption d'ETM conduit le plus souvent à la génération d'un stress oxydatif (Foy *et al.*, 1978; Briat and Lebrun, 1999; Schutzendubel and Polle, 2002; Clemens, 2006). La contamination des plantes par le plomb, induit une élévation de la production d'H₂O₂ et d'O₂⁻ (Malecka *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2007; Przymusiński *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2000).

Les peroxydases, les catalases, l'ascorbate peroxydase et le gâiacol peroxydase sont des catégories d'enzymes qui facilitent la formation et l'élimination de l'eau oxygénée qui est toxique

pour le métabolisme cellulaire ($\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$). Dans notre travail et chez les plantes traitées par le plomb, l'activité de ces antioxydants dans un premier temps semble augmenter (;) pour les faibles concentrations et diminuer pour les fortes concentrations. Ces résultats sont similaires avec ceux déjà obtenus par Malecka *et al.*, 2001; Pang *et al.*, 2002; Ruley *et al.*, 2004; Mittler *et al.*, 2004 ; Reddy *et al.*, 2005; Mishra *et al.*, 2006b ; Chaaya., 2010) pour l'activité de la catalase. Par contre, plusieurs publications rapportent une inhibition de son activité par le plomb (Verma and Dubey, 2003; Choudhury and Panda, 2004; Seregin *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2007; Dey *et al.*, 2007; Hu *et al.*, 2007; Qureshi *et al.*, 2007; Gopal and Rizvi, 2008). L'activation ou l'inhibition de cette enzyme semble être dépendante de l'espèce traitée et non de l'organe étudié, de la durée ou de l'intensité du traitement. L'activité peroxydasique quant à elle, a augmenté comme ça a été rapporté dans de nombreux travaux de recherche (Mishra and Choudhuri, 1999; Rucinska and Gwozdz, 2005; Huang *et al.*, 2008). L'ascorbate peroxydase (APX), est une métallo-enzyme contenant un groupe ferriprotoporphyrine IX. Elle est présente dans tous les compartiments cellulaires, dans le cytosol et dans l'apoplaste, sous forme soluble ou liée aux membranes (Asada, 1999; Foyer and Noctor, 2000; Mittler, 2004; Asada, 2006). Elle est connue pour son implication dans les stress abiotiques et biotiques (Klessig *et al.*, 2000). En effet, l'APX catalyse la réduction du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en utilisant l'ascorbate comme co-substrat. L'augmentation de l'activité APX sous stress oxydatif engendré par le Pb montre bien son rôle dans l'élimination de l'eau oxygénée formé suite à l'accumulation du Pb dans les racines et les feuilles des plantes. Nos résultats obtenus à l'issue de cette étude concernant cette enzyme sont comparables a ceux mentionnés par (Kampfenkel *et al.*, 1995; Patra et Panda, 1998; Prasad *et al.*, 1999; Rucinska *et al.*, 1999 et Gallego *et al.*, 2002).

En outre, une augmentation de l'activité du gaïacol peroxydase (GPOX) est induite dans les feuilles chez les plantes traitées par le Pb. Ceci, met bien en évidence le rôle important joué par cette enzyme dans l'élimination de l'eau oxygénée (H_2O_2) produite en excès et toxique pour le métabolisme cellulaire et l'élimination des ROS induit par le stress oxydatif imposé par les métaux (Shah *et al.*, 2001; Schützenbüdel et Polle, 2002; Srivastava *et al.*, 2004; Smeets *et al.*, 2005; Mishra *et al.*, 2006a; Hsu et Kao, 2007; Semane *et al.*, 2007).

En revanche, concernant les molécules antioxydantes, les pigments caroténoïdes sont réduits avec les fortes doses dans les trois variétés étudiées. En effet, ces pigments associés au PS.II ou à l'antenne collectrice, participent à la protection de l'appareil photosynthétique contre les ROS (Asada, 1994; Miller *et al.*, 1996) .Par contre, pour la deuxième molécule antioxydante le glutathion (GSH) on a remarqué une augmentation du contenu par le traitement avec la dose la plus faible (0.15g/l) chez la variété Vitron et une réduction progressive avec l'augmentation des doses de

traitement. Ce tripeptide joue un rôle essentiel dans la détoxification des métaux en les chélatant directement. Il joue également un rôle fondamental dans la régulation du statut redox des cellules et dans la neutralisation des ROS. Le glutathion pourrait constituer la première ligne de défense des plantes contre la flambée oxydative générée par le plomb. Les résultats de ce travail sont comparables à ceux rapportées par certains auteurs (Asada et Takahashi, 1987 ; May *et al.*, 1998; Noctor *et al.*, 1998).

En se basant sur des repenses biochimiques des effets induit par le plomb durant la germination, l'espèce Gta est moins sensible à la pollution par ce métal par rapport autres espaces (Vitron et Waha) du point de vue (sucres solubles, protéines, proline et activité catalisique) (tableau. 14, 15).

Tableau 14: Effet du plomb sur les paramètres biochimiques

		Phase de la germination					Phase de la croissance				
		Chl(a)	Ch(b)	Sucres solubles	protéines	proline	Chl(a)	Ch(b)	Sucres solubles	protéines	proline
Waha	C1	↓	↓	↑	↑	↓	↑	↓	↑	↑	↑
	C2	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
	C3	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
Viton	C1	↑	↑	↑	↓	↑	↑	↓	↓	↑	↑
	C2	↓	↔	↔	↓	↑	↓	↓	↓	↓	↓
	C3	↓	↔	↑	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
Gta	C1	↑	↓	↑	↓	↓	↑	↓	↑	↔	↑
	C2	↓	↓	↑	↓	↓	↓	↓	↑	↔	↑
	C3	↓	↓	↑	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓

**Tableau 15: Effet du plomb sur les paramètres
antioxydantes**

		Phase de la germination					Phase de la croissance					
		CAT	POD	GPOX	GSH	CARO	CAT	POD	GPOX	GSH	CARO	APX
Waha	C1	↓	↑	↓	↓	↓	↑	↑	↑	↓	↓	↑
	C2	↓	↓	↓	↓	↓	↑	↓	↓	↓	↓	↓
	C3	↓	↓	↓	↓	↓	↑	↓	↓	↓	↓	↓
Viton	C1	↑	↑	↑	↑	↓	↑	↑	↑	↑	↓	↓
	C2	↑	↓	↓	↓	↓	↑	↓	↓	↓	↓	↓
	C3	↑	↓	↓	↓	↓	↑	↓	↓	↓	↓	↓
Gta	C1	↓	↑	↓	↑	↓	↑	↑	↑	↓	↓	↓
	C2	↓	↓	↓	↓	↓	↑	↓	↓	↓	↓	↓
	C3	↓	↓	↓	↓	↓	↑	↓	↓	↓	↓	↓

Conclusion Générale

CONCLUSION GENERALE

Notre travail s'inscrit dans une thématique, développée au sein du laboratoire et visant à évaluer l'impact d'une contamination en plomb sur des végétaux important du point de vue économique et alimentaire en Algérie notamment les céréales (Blé dur). Les variétés choisies (Waha, Vitron et Gta) font partie des spéculations végétales les plus cultivées en Algérie ces derniers temps grâce à leur caractéristiques, biologiques, agronomiques et technologiques.

A travers ce travail, nous avons pu recueillir un maximum de données intéressantes concernant la physiologie de plantes de *Triticum durum* soumises à différentes concentrations en plomb et sur certains mécanismes conduisant à sa phytotoxicité, par l'investigation du rôle joué par les espèces réactives de l'oxygène (ERO) à travers l'étude des enzymes du stress oxydant. Ceci, nous a permis d'avoir une connaissance partielle sur l'adaptation et la vulnérabilité de ces espèces étudiées par rapport à la contrainte métallique.

En effet, les résultats obtenus à l'issue de ce travail, montre que:

- le plomb a exercé un effet négatif sur tous les paramètres germinatifs et que la concentration 0.3g/l est une concentration inhibitrice de la croissance des jeunes plantules des variétés de blé dur. Par contre, le traitement avec la concentration 0.15g/l a augmenté la valeur des autres paramètres morphologiques (faculté germinative, cinétique de germination, allongement des coléoptiles, le nombre de racines etc...) et biochimiques (contenu en pigments, sucres, proline et protéines) dans les trois variétés. Signalons par ailleurs, que la biomasse racinaire a été plus sensible au plomb, par rapport à la biomasse aérienne, parce qu'elle constitue les premiers organes au sol en contact avec le polluant, touchés par la contamination ;

- sur l'essai de la croissance les résultats obtenus indiquent que le plomb affecte la croissance et la morphogénèse des plantes, en perturbant de très nombreux mécanismes physiologiques, entraînant la formation de plantes de taille réduite. Sans oublier ses effets néfastes sur la surface foliaire qui réduit avec les fortes doses et par conséquent la diminution du poids spécifique des feuilles. L'inhibition de la division et de l'élongation cellulaire sont les phénomènes les plus souvent reportés pour expliquer ces effets du plomb.

Concernant les variables biochimiques de la plante, nous avons trouvé que, le plomb a perturbé l'activité de synthèse des pigments photorécepteurs. :

-en effet, la concentration 0.3g/l a réduit le contenu en chlorophylle totale chez les trois variétés pendant la phase de la germination et la croissance. En outre, le contenu en chlorophylle totale (a+b) chez la variété Waha est diminué avec les faibles doses de nitrate de plomb. Tandis que, chez les autres variétés (Vitron et Gta) le contenu augmente légèrement durant la germination. Par ailleurs, dans le phénomène de croissance, la réduction du contenu en chlorophylles est

proportionnelle à la concentration utilisée, c'est-à-dire plus la concentration augmente plus la réduction est importante.

-pour les pigments caroténoïdes, les résultats obtenus ont mis en évidence un effet dépressif du plomb sur la synthèse et /ou la libération des caroténoïdes pour les trois variétés étudiées pendant la phase de la germination et de la croissance.

-pour les autres variables biochimiques (contenu en sucres solubles, proline et protéines) on a trouvé une élévation graduelle du contenu de toutes ces variables étudiées. Mis à part, la concentration 0.35g/l qui semble avoir une action inhibitrice de la synthèse et la production des sucres et des protéines chez les trois variétés pendant les deux phases (germination et croissance). En revanche, cette augmentation semble jouer un rôle important dans la détoxification et la protection des constituants cellulaires contre le plomb. Par l'association de complexe chélateur (Proline-Pb) ou rôle osmoprotecteur des sucres, ou encore synthèse de phytochélatines (protéines de défense des organismes contre les agents stressants), rôle de chélation et transport de métaux dans des lieux de stockage (vacuoles) ou neutralisation par des mécanismes chimiques.

Sur le volet, réponses anti oxydatives du système enzymatique, tous les résultats de cette étude pendant la germination et la croissance ont montrée que le plomb a perturbé l'activité enzymatique. Dans les variétés traitées par le plomb, l'activité de ces antioxydants dans un premier temps, ont augmenté pour les faibles concentrations, et même dans les fortes concentrations au niveau des feuilles, mais dans les racines l'activité de catalase a été réduite avec le traitement par les concentrations 0.25 et 0.35 g/l. D'une manière globale, l'activité enzymatique est légèrement stimulée par les faibles concentrations, s'ensuit par la suite, une réduction graduelle pour les concentrations les plus élevées.

Les enzymes étudiées telles que: les peroxydases, les catalases et l'ascorbate peroxydase, le gaïacol peroxydase, générées lors du stress oxydatif causé par la présence de l'ion métallique (Pb) à l'intérieur des cellules, jouent un rôle essentiel dans l'élimination des radicaux libres qui sont toxique pour le métabolisme cellulaire.

Ces données montrent que les trois variétés étudiées présentent une certaine défense vis à vis du plomb par l'intervention des molécules osmorégulatrices et des enzymes antioxydants. Mais à forte concentration de ce métal, les variétés présentent une sensibilité traduit par des modifications physiologiques et enzymatiques durant la germination jusqu'à la croissance de ces génotypes.

Référence Bibliographique

REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUE

A

Aissa A. et Mhiri A. 2000- La fertilisation phospho-potassique des céréales en Tunisie. *Revue de l'INAT*, Vol. 15, n° 2, pp. 7-14.

Al-Ani A., Leblanc M., Raymond P., Pradet A. et Moyose A., 1982- Effet de la pression partielle d'oxygène sur la vitesse de germination des semences à réserves lipidiques et amylacées : rôle du métabolisme fermentaire. *Article .C.R. Acad.Sc. Paris, T. 295 (1982), 271-274.*

Alia Prasad K., Pardha S., 1995- Effect of Zinc on free-radicals and proline in *Brassica juncea* and *Cajanuscajan*. *Phytochem.* 39: 45-47.

Alaoui B., 2004- Referential pour la conduit technique de la culture du blé dur (*Triticum durum*). p38.

Anonyme1., 1981- Larousse agricole. *Edition Larousse*. Publié sous la direction de Jean M Clément. pp171-253.

Anonyme2., 2000- Fiche technique Blé, Blé meunier en agriculture biologique. *Association grande cultures d'aquitaine*. 4p.

Aoun M., 2009-Action du cadmium sur les plants de moutarde indienne *Brassica juncea*. Thèse de Doctorat. Université de Bretagne Occidentale, 135 p.

Asada K., Takahashi M., 1987- Production and scavenging of active oxygen in *photosynthesis*. *Elsevier, Amsterdam*, 227p.

Asada K., 1994- Production and action of active oxygen species in photosynthetic tissues In: Foyer CH, Mullineaux PM (eds) Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defense Systems in Plants, *CRC Press, Boca Raton FL*, pp 77-104.

Asada K., 1999- The water-water cycle in chloroplasts: Scavenging of Active Oxygens and Dissipation of Excess Photons. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50(1): 601-639.

Asada K., 2006- Production and Scavenging of Reactive Oxygen Species in Chloroplasts and Their Functions. *Plant Physiology* 141(2): 391-396.

B

Bahlouli F., Bouzerzour H. et Benmahammed A., 2005- Selection of stable and high yielding cultivar of durum wheat under semi – arid conditions. *Pakistan Journal of Agronomy* 360 –365.

Balestrasse K.B., Gallego S.M., Benavides M.P. et Tomaro M.L., 2005- Polyamines and proline are affected by cadmium stress in nodules and roots of soybean plants. *Plant and Soil* 270: 343-353.

Battinger R., 2002- Les grandes cultures. *Conseil Européen des Jeunes Agriculteurs*. 15p.

Belaïd D., 1986 - Aspects de la céréaliculture Algérienne. *OPU, Alger*, 207p.

Belaïd D., 1987- Etude de la fertilisation azotée et phosphatée d'une variété de blé dur (Hedba3) en conditions de déficit hydrique, *Thèse de magistère. I.N.A.* 108p.

Belaïd D., 1996- Aspect de la céréaliculture, Algérien. *Office des publications universitaires. Alger*. 208p.

Benbelkacem A. et Kellou K., 2000 - Evaluation du progrès génétique chez quelques variétés de blé dur (*Triticum durum* Desf.) cultivées en Algérie. *Actes du 1^{er} Sym. Inter. Sur la filière blé Alger*. (7-9) Février .2000 :122- 123

Berlett B.S. et Stadtman E.R., 1997- Protein oxidation in aging, disease and oxidative stress. *Am. Soc. Biochem. Biol. Mol.* 272: 20313-20316.

Bert V., Macnair M., Laguerie D., Saumitou L., P., 2000- Zinc tolerance and accumulation in metalcolous and non-metalcolous populations of *Arabidopsishalleri* (*Brassicaceae*). *New Phytol.* 146, 225-233.

Bonjean A., Picard E., 1991- Les céréales à paille. Origine-histoire-économie-sélection. Ligugé; Poitiers : *Aubin imprimeur*. 36p.

Bozzini A., 1988- Origin, distribution, and production of durum Wheat in the world. Fabiani G. et C. *lintas. durum: chimistry and technologie*. AACC. P1-16.

Binet, P. Brunel, J., 1999- Physiologie végétale. *Doin*. 933-935/1156.

Briat J. ET Lebrun. M. - 1999- Plant responses to metal toxicity. *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences - Series III - Sciences de la Vie* 322(1): 43-54.

C

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

Chen J., Zhu C., Li L., Sun Z., Pan X.- 2007- Effects of exogenous salicylic acid on growth and H₂O₂-metabolizing enzymes in rice seedlings under lead stress. *Journal of Environmental Sciences* 19, 44-49.

Choudhury S. et Panda S., 2004- Induction of oxidative stress and ultrastructural changes in moss *Taxithelium nepalense* (Schwaegr.) Broth under lead and arsenic phytotoxicity. *Current Science*. 87(3): 342-348.

Clarke J. et Norvell F.- 2002- Concentration of cadmium and other éléments in the grain of near-isogenic durum lines. *Can. J. Plant Sci/ revue canadienne de phytotechnie*. 82p.

Clement G., 1971- les céréales, (Grand court), Coll. Agro. Alimentaire. *Lavoisier*. 78-91p.

Clement G. et Prats J., 1970- les céréales. *Collection d'enseignement agricole*. 2^{ème} Ed. 351p.

Clemens S., 2006- Evolution and function of phytochelatin synthases. *Journal of Plant Physiology* 163, 319-332.

Couvreur F., 1981 - La culture du blé se raisonne. *Cultivar juin*, pp 39-41.

CIC., 2000- Rapport annuel du Conseil International des Céréales "CIC" pour l'année 2000.

Cuny D., Rzepka, Bulteau G., Lakel A, Devred I. & Van haluwyn C. 2006- Quels rôles les plantes peuvent-elles jouer. *Phytoremédiation*. pp 33-35.

D

Demiral T. et Türkan I., 2005- Comparative lipid peroxidation, antioxidant defense systems and proline content in roots of two rice cultivars differing in salt tolerance. *Environ. Exp. Bot.* 53: 247-257.

Dey S.K., Dey, J., Patra S. et Pothal, D. - 2007- Changes in the antioxidative enzyme activities and lipid peroxidation in wheat seedlings exposed to cadmium and lead stress. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 19: 53-60.

Duthil J., 1973- *Eléments d'écologie et d'agronomie, T3, Ed. J.B. Baillière.* 654p.

E

Erroux J., 1974 - *Agronomie méditerranéenne .1. Le milieu méditerranéen et ses problèmes .La culture vivrière en Algérie.* 387p.

F

Feillet P., 2000- Le grain de blé, composition et utilisation. *Edition INRA, paris* : pp 23-25.

Fodor F., Sarvari E., Lang F., Szigeti Z., Cseh E., 1996- Effects of Pb and Cd on cucumber depending on the Fe-complex in the culture solution. *Journal of Plant Physiology* 148: 434-439.

Foy C., Chaney R. et White, 1978- The Physiology of Metal Toxicity in Plants. *Annual Review of Plant Physiology* 29(1): 511-566.

Foyer C. et Noctor G., 2000- Tansley Review No. 112. Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signalling. *New Phytologist* 146(3): 359-388.

G

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.

Gervy R., 1970- Les phosphates et l'agriculture. *Edition DUNOD, Paris.* 298p.

Gopal R. et Rizvi A., 2008- Excess lead alters growth, metabolism and translocation of certain nutrients in radish. *Chemosphere.* 70(9): 1539-1544.

Grignac P.H., 1965- Contribution à l'étude de *Triticum durum* (Desf.) Thèse d'état en Agronomie. Toulouse, 152 p.

H

Hammett FS., 1929- Studies in the biology of metals: the influence of lead on mitosis and cell size in the growing root. *Protoplasma* 5: 535-542.

Hasani P., Yasa N., Vosough S., Mohammadirad A., Dehghan G., Abdollahi M. 2007- *In vivo* antioxidant potential of *Teucrium polium*, as compared to α -tocopherol. *Acta Pharmaceutica.* 57: 123-127. 00166101, 2001.

Henry Y, Beyser J., 2000- Origine des blé dans la science. *H sène* 26: 60-62.

Hebert J., 1975- Techniques nouvelles de production du blé. *Document I.T.C.F.* 16p

Hsu Y.T. et Kao C.H., 2003- Changes in protein and amino acid contents in two cultivars of rice seedlings with different apparent tolerance to cadmium. *Plant Growth Regul.* 40: 147-155.

Hsu Y.T. et Kao C.H., 2007- Cadmium-induced oxidative damage in rice leaves is reduced by polyamines. *Plant Soil.* 291 : 27-37.

Hu J, Shi G., Xu Q., Wang X., Yuan Q. et K Du., 2007- Effects of Pb²⁺ on the active oxygenscavenging enzyme activities and ultrastructure in *Potamogeton crispus* leaves. *Russian Journal of Plant Physiology* 54(3): 414-419.

Huang H., Li T., Tian S., Gupta D., Zhang X. et Yang X., 2008- Role of EDTA in alleviating lead toxicity in accumulator species of *Sedum alfredii*H. *Bioresource Technology In Press, Corrected Proof*. pp404-4110.

J

Jarup L., 2003- Hazarads of heavy metal contamination. *Br Med Bul.* 68(1) :167-182.

Jha A.B. et Dubey R.S., 2004- Carbohydrate metabolism in growingrice seedlings underarsenic toxicity. *Plant Physiol.* 123: 1029-1036.

K

Kampfenkel, K., Montagu V., Inze D., 1995- Effects on iron excess on *Nicotianaplumbaginifolia* plants. *Plant Physiol.* 107: 725-735.

Kastori R., Petrovic M. et Petrovic N., 1992- Effect of excess lead, cadmium, copper and zinc. 53: 99-1001.

Keskas N., 2011- Effet scavenger des radicaux oxygénés et inhibiteur de la xanthine oxydoreductase des extraits de *Cachrys libanotis*. L. Thèse de Master. Université Ferhat Abbas - Sétif Algérie.

Klessig D., Durner J., Noad R., Navarre N., Wendehenne D., Kumar D., Zhou J., Shah J., Zhang S., Kachroo P., Trifa y Y. , Pontier D., Lam E. et Silva H., 2000 - Nitric oxide and salicylic acid signaling in plant defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97(16): 8849-8855.

Kopittke P., Colin A., Kopittke R., Menzies W., 2007- Toxic effects of Pb²⁺ on growth of cowpea (*Vigna unguiculata*). *Environmental Pollution*, in press.

Krupa, Z., Moniak, M., 1998- The stage of leaf maturity implicates the response of the photosynthetic apparatus to cadmium toxicity. *Plant Sci.* 138, 149-156.

Kumar, P.K. et Singh, R.A., 1991- Germination and metabolism in susceptible and tolerantmung bean genotypes under moisture stress. *Indian J. Plant Physiol.*, 34: 267.

Kupper H., Kupper F., Spiller M., 1996- Environmental relevance of heavy metal substituted chlorophylls using the example of water plants. *Journal of Experimental Botany* 47: 259-266.

L

Lambert J.C., 1979- La fertilisation phosphatée. *Revue Cultivar*. N °115, pp96-97.

Laumont p. et Eroux J., 1961 - Inventaire des blés dur rencontrés et cultivés en Algérie. Mémoire de la société d'histoire naturelle de l'Afrique du nord –Alger. *La thypolitho et Jules carbonel réunie*.

Lei Y.B., Korpelainen H., Li C.Y., 2007 - Physiological and biochemical responses to high Mn concentrations in two contrasting *Populus cathayana* populations. *Chemosphere* 68: 686- 694.

Liu P., Huang M., 2003- Kinetic of lead adsorption by iron oxides formed under the influence of citrate. *Geochimica and Cosmochemica Acta.* 67: 1045-1054.

M

Malecka A., Jarmuszkiewicz W., Tomaszewska B., 2001- Antioxidative defense to lead stress in subcellular compartments of pea root cells. *Acta Biochimica Polonica*, 48, 687-698.

Malkowski EK., Galas W., Karez W., Kuperberg JM., 2002- Lead distribution in corn seedlings (*Zea mays* L.) and its effects on growth and the concentration of potassium and calcium. *Plant Growth Regulation.* 37: 69-76.

Martin Prevel P., 1984 - L'analyse végétal dans le contrôle de l'alimentation des plantes tempérées et tropicales. pp 653-667.

Maume L. et Dulac J., 1936- Echantillonnage rationnel de la plante en vue des analyses chimiques comparatives, *C.R.A.cd Agric Franc* 26, pp906-913.

May M, Vernoux T., Leaver C., Montagu M. et Inze D., 1998- Review article. Glutathione homeostasis in plants: implications for environmental sensing and plant development. *Journal of Experimental Botany* 49(321): 649-667.

Mazouz , L., 2006- Etude de la contribution des paramètres phéno morphologiques dans l'adaptation du blé dur (*Triticum durum Dsf.*) dans l'étage bioclimatique semi aride. Thèse de Magister. *Dept Agr, Fac Sci, UHL, Batna, Algérie.*110p.

Mazliak P., 1998- Physiologie végétale ; croissance et développement. *Hermann.* 150p

Mekliche A., 1983 - Contribution à l'établissement de la fertilisation azotée du blé d'hiver dans le haut Chéelif. *Thèse de magistère. I.N.A. Alger .*81p.

Meyer S., Reed C., Bosdeveix R., 2004- Botanique (Biologie et physiologie végétales). *Ed: Maloine.* 56/461.

Monneveux P., 2002- Bilan d'activités du laboratoire sur le thème : amélioration de la tolérance a la sécheresse du blé sur. UER de génétique et amélioration des plantes, *ENSA - INRA Montpellier.*36p.

Moughli L., 2000- Les engrais minéraux caractéristiques et utilisations. N°72 Septembre 2000. 13p.

Miller N., Sampson J., Candeias L., Bramley P. et Rice C. - 1996- Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. *FEBS Letters* 384(3): 240-242.

Mishra A. et Choudhuri M., 1999- Effects of Salicylic Acid on Heavy Metal-Induced Membrane Deterioration Mediated by Lipoxygenase in Rice. *Biologia Plantarum* 42(3): 409-415.

Mishra S, Srivastava S., Tripathi R., Kumar R., Seth C. et Gupta D., 2006b- Lead detoxificationby coontail (*CeratophyllumdemersumL.*) involves induction of phytochelatins andantioxidant system in response to its accumulation. *Chemosphere* 65(6): 1027-1039.

Mishra S., Srivastava S., Tripathi R.D., Govindarajan R., Kuriakose S.V. et Prasad M.N.V., 2006a- Phytochelatin synthesis and response of antioxidants during cadmium stress in *Bacopa monnieri* L. *Plant Physiol. Biochem.* 44 : 25-37.

Mittler R., 2004- Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* 7(9): 405-410.

Morel R, 1986- Les sols cultivés. *Lavoisier. 1^{ère} Edition. Paris.* 34p.

N

Nadjim., 2008- Utilisation de la discrimination isotopique du carbone comme critère de sélection du blé dur (*Triticum durum desf*) en relation avec le bilan hydrique. *Thèse de Magistère. Université de Setif.* 121 p.

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.

Noctor G, Arisi A., Jouanin L., Kunert K., Rennenberg H. et Foyer C. 1998- Review article. Glutathione: biosynthesis, metabolism and relationship to stress tolerance explored in transformed plants. *Journal of Experimental Botany* 49(321): 623-647.

O

Oncel I., Keles Y., Ustun A.S., 2000- Interactive effects of temperature and heavy metal stress on the growth and some biochemical compounds in wheat seedlings. *Environ. Pollut.* 107, 315-320.

P

Pang X, Wang D., Xing X., Peng A., Zhang F. et Li C., 2002- Effect of La³⁺ on the activities of antioxidant enzymes in wheat seedlings under lead stress in solution culture. *Chemosphere* 47(10): 1033-1039.

Pardha Saradhi P., Alia-Arora S. et Prasad K.V.S.K., 1995- Proline accumulate in plants exposed to UV radiation and protects them against UV induced peroxidation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 209 : 1-5.

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.

Patra M., Bhowmick N., Bandopadhyay B., Sharma A., 2004- Comparison of mercury, lead and arsenic with respect to genotoxic effects on plant systems and the development of genetic tolerance. *Environmental and Experimental Botany*, 52: 199-223.

Pena L.B., Pasquini L.A., Tomaro M.L. Et Gallego S.M., 2006- Proteolytic system in sunflower (*Helianthus annuus* L.) leaves under cadmium stress. *Plant Sci.* 171: 531-537.

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.

Prasad M.N.V., 1999- Heavy metal stress in plants: from biomolecules to ecosystems. *Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg*, 462.

Przymusiński R., Rucińska S., Iłska B. et Gwóźdź E., 2007- Organospecific responses of lupin seedlings to lead Localization of hydrogen peroxide and peroxidase activity. *Acta Physiologiae Plantarum* 29(5), 411-416.

Qureshi M, Abdin M., Qadir S. et Iqbal M., 2007- Lead-induced oxidative stress and metabolic alterations in *Cassia angustifolia* Vahl. *Biologia Plantarum* 51(1): 121-128.

R

Rai V.K., Singh G., Thakur P.S. et Banyal S. 1983- Protein and amino-acid relationship during water stress in relation to drought resistance. *Plant Physiol. Biochem.*, (Suppl.), 10: 161.

Reddy A., Kumar S., Jyonthsnakumari G., Thimmanaik S., Sudhakar. 2005-- Lead induced changes in antioxidant metabolism of horsegram (*Macrotyloma uniflorum* (Lam.) Verdc.) and bengalgram (*Cicer arietinum* L.). *Chemosphere* 60: 97-104.

Rooney C., McLaren G., Cresswell J., 1999- Distribution and phytoavailability of lead in a soil contaminated with lead shoot. *Water, Air and Soil Pollution* 116: 535-548.

Rucinska R., Waplak S., Gwozoz E., 1999- Free radical formation and activity of antioxidant enzymes in lupin roots exposed to lead. *Plant Physiol. Biochem.* 37: 187-194.

Rucinska R. and Gwozdz E., 2005- Influence of lead on membrane permeability and lipoxygenase activity in lupine roots. *Biologia Plantarum* 49(4): 617-619.

Ruel T., 2006- Document sur la culture du blé, *Ed: Educagri. 18p*

Ruley A, Sharma N. et Sahi S., 2004- Antioxidant defense in a lead accumulating plant, *Sesbania drummondii*. *Plant Physiology and Biochemistry* 42(11): 899-906.

S

Schat H., Sharma S.S. et Vooijs R., 1997 - Heavy metal induced accumulation of free proline in a metal tolerant and a non tolerant ecotype of *Silene vulgaris*. *Physiol. Plant.* 101: 477- 482.

Schutzendubel A et A Polle 2002- Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *Journal of Experimental Botany* 53(372):1351-1365.

Selmi R. 2000. Fin du mythe de l'autosuffisance alimentaire et place aux avantages comparatifs. *Revue Afrique Agriculture*. N° 280. Pp.30-23.

Semane B., Cuypers A., Smeets K., Van Belleghem F., Horemans N., Schat H. et

Vangronsveld J., 2007- Cadmium responses in *Arabidopsis thaliana* : glutathione metabolism and antioxidative defence system. *Physiol. Plant.* 129 : 519-528.

Seregin I.V, Ivanov V.B., 2001- Physiological aspects of cadmium and lead toxic effects on higher plants. *Russ J Plant Physiol.*, 48: 523-544.

Seregin IV, LK Shpigun and VB Ivanov., 2004- Distribution and Toxic Effects of Cadmium and Lead on Maize Roots. *Russian Journal of Plant Physiology* 51(4): 525-533.

Shah K., Kumar R.G., Verma S. et Dubey R.S., 2001 - Effect of cadmium on lipid peroxidation, superoxide anion generation and activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. *Plant Sci.* 161 : 1135-1144.

Shalygo N.V., Averina N.G., Grimm B., Mock H.P., 1997- Influence of cesium on tetrapyrrole biosynthesis in etiolated and greening barley leaves. *Physiol. Plant.* 99, 160-168.

Sharma S. et Dietz K., 2006- The significance of amino acids and amino-derived molecules in plant responses and adaptation to heavy metal stress. *J. Exp. Bot.* 57: 711-726.

Sharmila P. et Pardha Saradhi P., 2002- Proline accumulation in heavy metal stressed plants: An adaptative strategy. In: *Physiology and Biochemistry of Metal Toxicity and Tolerance in Plants.* Prasad M.N.V. et Strzalka K. (Eds), 179-199.

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.

Siedlecka A. et Krupa Z., 2002- Functions of enzymes in heavy metal treated plants. *In: Physiology and Biochemistry of Metal Toxicity and Tolerance in Plants.* Prasad M.N.V. et Strzalka K. (Eds), *Kluwer Academic Publishers, Netherlands*, pp. 303-324.

Smeets K., Cuypers A., Lambrechts A., Semane B., Hoet P., Van Laere A. et Vangronsveld J., 2005- Induction of oxidative stress and antioxidative mechanisms in *Phaseolus vulgaris* after Cd application. *Plant Physiol. Biochem.* 43 : 437-444.

Soltner., 1988 - Les grandes productions végétales. *Les collections sciences et techniques agricoles, Ed. 16^{ème} éditions* 464P.

Soltner. D., 1990- les grandes productions végétales : céréales, plantes sarclées, prairie. *Coll. Sciences et techniques agricoles. 17^{ème} Ed.*464p.

Srivastava S., Tripathi R.D. et Dwivedi U.N., 2004- Synthesis of phytochelatin and modulation of antioxidants in response to cadmium stress in *Cuscuta reflexa* – an angiospermic parasite. *J. Plant Physiol.* 161 : 665-675.

Stalt J.P., Sneller E.C., Bryngelson T., Bryngelsson T., Lundborg T., Schat H., 2003- Phytochelatin and cadmium accumulation in wheat. *Environnemental and Experimental Botany*, 49: 21- 28.

Stobart, A.K., Griffiths, W.T., Ameen-Bukhari, I., Sherwood, R.P., 1995- The effects of Cd²⁺ on the biosynthesis of chlorophyll in leaves of barley. *Physiol. Plant.* 63, 293-298.

Sun R.L., Zhou Q.X., Sun F.H., Jin C.X., 2007- Antioxidative defense and proline /phytochelatin accumulation in a newly discovered Cd hyperaccumulator *Solanumnigrum*L. *Environ. Exp. Bot.* 60, 468-476.

Surget A., et Barron C., 2005. Histologie du grain de blé, *Industrie des céréales* 145, 4-7.

T

Taulavuori K., Prasad M.N.V., Taulavuori E. et Laine K., 2005- Metal stress consequences on frost hardiness of plants at northern high latitudes : A review and hypothesis. *Environ Pollut.* 135 : 209-220.

Théron A., 1964- Botanique (classe de 2^eM) Ed: *Bordas*.121-141/287.

V

Verma S and Dubey R., 2003- Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. *Plant Science* 164(4): 645-655.

W

Wang X. et Quinn P., 2000- The location and function of vitamin E in membranes. (review). *Mol. Membr. Biol.* 17, 143-156.

Wozny A., Jereczynska E., 1991- The effects of lead on early stages of *Phaseolus vulgaris* L.growth in vitro conditions. *Biologica Plantarum* 33: 32-39.

Y

Yves H., et Buyer J., 2000- L'origine des blés. *Pour les sciences hors série* n° 26. pp60 - 62.

Yingli Y., Yuanyuan Z., Xueling W., Jia Y., Wenrui W., Jin L., Ruxia S., 2010- Comparative antioxidative responses and proline metabolism in two wheat cultivars under short term lead stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74 (2011) 733–740.

Z

Zembala M., Filet M., Kornas A., Miszalski Z., Walas S., Mrowiec H., Hartikainen H., 2009- Effect of selenium on macro and microelement distribution and physiological parameters of rape and wheat seedling exposed to cadmium stress. *Plant Soil*, 329, 457-468.

Zhang G., Fukami M. et Sekimoto H., 2000- Genotypic differences in effects of cadmium on growth and nutrient compositions in wheat. *J. Plant. Nutr.* 23: 1337-1350.

Résumé

Résumé

Le blé fait partie des trois grandes céréales avec le maïs et le riz. La troisième par l'importance de la récolte mondiale et la plus consommée par l'homme. La pollution métallique un des facteurs limitant le rendement de ce aliment.

Ce présent travail a pour but d'évaluer la variabilité de résistance des grains de blé dur *Triticum durum* Desf. Waha, Vitron et Gta soumises à un stress métallique par le nitrate de plomb $Pb(NO_3)_2$ aux concentrations suivantes: 0, 0.15, 0.25 et 0.35g/l. pour cela nous avons entamé l'étude des paramètres, morphologiques, physiologiques biochimiques, et enzymatiques et pendant la phase de germination et la croissance.

Les résultats obtenus montre que d'une manière générale, les variétés attribués sont sensible à ce métal en cas des hautes concentrations, traduit par un effet délétère au niveau des feuilles (surface foliaire, poids spécifique et nombre des feuilles) et au niveau des racines, réduit le contenu en pigments photorécepteurs et les molécules osmo-régulatrices.

L'activité enzymatique ainsi est perturbée et des signaux de stress oxydatif produit par la phytotoxicité du plomb sont constatés. En effet, il est noté une légère augmentation de l'activité enzymatique du système antioxydant (activité de POD, APX, et CAT) aux faibles doses (0.15 et 0.25g/l) chez les trois variétés étudiées, suivie par la suite par une nette diminution.

Mots clés: plomb, blé dur, germination, croissance, stress oxydatif

المخلص

القمح هو جزء من الحبوب الرئيسية الثلاثة مع الذرة و الأرز. وهو الثالث من أهمية المحصول العالمي و الأكثر استهلاكاً من قبل البشر. التلوث بالمعادن واحدة من العوامل التي تحد من أداء الغذاء. تهدف هذه الدراسة إلى تقييم التغيير في المقاومة من حبوب القمح الصلبة *Triticium durum Dest* التي تعرضت لإجهاد المعادن من قبل نترات الرصاص $Pb(NO_3)_2$ في التراكيز التالية 0.15، 0.25، 0 غ/ل . لهذا قمنا بدراسة المعايير ، المورفولوجية، الفيزيولوجية، الكيمياء الحيوية، و الإنزيمية، و ذلك في مرحلة الانتاش و النمو. أظهرت النتائج عموماً أن الأصناف المستعملة حساسة لهذا المعدن عند التراكيز العالية، يترجم بالتضرر على مستوى الأوراق (مساحة الورقة ، الوزن النوعي و عدد الأوراق) و على مستوى الجذور ينقص من محتوى التصبغ من الجزيئات المنظمة للتركيز. تعطل النشاط الإنزيمي و توجد إشارات إجهاد أكسدة التي تنتجها سمية الرصاص. بالفعل هناك زيادة طفيفة في النشاط الإنزيمي في الجهاز ضد التأكسدي (نشاط APX, POD, و CAT) في الجرعات المنخفضة (0.15 و 0.25 غ/ل) في الثلاثة أصناف المدرسة ، ثم يتبع بنقصان في النشاط.

الكلمات المفتاحية : الرصاص ، القمح الصلب، انتاش، نمو، إجهاد أكسدة

Abstract

Wheat is part of the three major cereals with maize and rice, the third by the importance of the global harvest and the most consumed by humans. Metal pollution one of the factors limiting the performance of the food.

This present study aims to evaluate the variability of resistance of hard wheat grains *Triticum durum* Desf. Waha, Vitron et Gta from which it has been subjected to metal stress by nétrat lead $Pb(NO_3)_2$ at the following concentrations: 0, 0.15, 0.25 et 0.35g/l. Why we started the study of morphological parameters, physiological, biochemical and enzymatic , in two phases germination and growth.

The results show that in general are sensitive varieties attributed to the metal when high concentrations, resulting in a deleterious effect in the leaves (leaf area, specific weight, number of leaves) and in the root, reduced pigment content and osmo-regulatory molecules.

The enzymatic activity is disrupted and signals produced by the stress auxidatif phytotoxicité lead are found. indeed there is a slight increase of activity enzymatic antiaoxidant system (POD, APX and CAT activity) in low doses (0.15 and 0.25 g / l) in three variétés studied, followed later by a net decrease.

Key words: Lead, hard wheat, germination, growth, stress auxidatif.

Annexes

Annexe.1

Tableau de variation du contenu en chlorophylle (a) durant la germination

Analyse de variance pour C1

Source	DL	SC	CM	F	P
Concentr	3	75,924	25,308	37,67	0,000
Variété	2	34,328	17,164	25,55	0,000
Interaction	6	35,482	5,914	8,80	0,000
Erreur	24	16,122	0,672		
Total	35	161,856			

Tableau de variation du contenu en chlorophylle (b) durant la germination

Analyse de variance pour C1

Source	DL	SC	CM	F	P
Concentr	3	22,172	7,391	61,38	0,000
Variété	2	6,623	3,312	27,50	0,000
Interaction	6	9,437	1,573	13,06	0,000
Erreur	24	2,890	0,120		
Total	35	41,122			

Tableau de variation du contenu en chlorophylle (a+b) durant la germination

Analyse de variance pour C1

Source	DL	SC	CM	F	P
Concentr	3	173,442	57,814	69,63	0,000
Variété	2	63,332	31,666	38,14	0,000
Interaction	6	55,453	9,242	11,13	0,000
Erreur	24	19,928	0,830		
Total	35	312,155			

Tableau de variation du contenu en Caroténoïdes durant la germination

Analyse de variance pour C1

Source	DL	SC	CM	F	P
Concentr	3	22,863	7,621	51,45	0,000
Variété	2	2,208	1,104	7,45	0,003
Interaction	6	5,418	0,903	6,10	0,001
Erreur	24	3,555	0,148		
Total	35	34,045			

Annexe.2

Tableau de variance de la faculté germinative

Analyse de variance pour C1					
Source	DL	SC	CM	F	P
Concentr	3	32378,8	10792,9	559,86	0,000
Variété	2	851,1	425,5	22,07	0,000
Interaction	6	1142,7	190,5	9,88	0,000
Erreur	24	462,7	19,3		
Total	35	34835,2			

Tableau de variance de la masse aérienne durant la germination

Analyse de variance pour C1					
Source	DL	SC	CM	F	P
Concentr	3	0,0341	0,0114	0,72	0,550
Variété	2	0,0145	0,0073	0,46	0,637
Interaction	6	0,0900	0,0150	0,95	0,479
Erreur	24	0,3792	0,0158		
Total	35	0,5179			

Tableau de variance de la masse souterraine durant la germination

Analyse de variance pour C1					
Source	DL	SC	CM	F	P
Concentr	3	0,093786	0,031262	106,17	0,000
Variété	2	0,004172	0,002086	7,08	0,004
Interaction	6	0,003272	0,000545	1,85	0,131
Erreur	24	0,007067	0,000294		
Total	35	0,108297			

Tableau de variation du contenu en sucres solubles durant la germination

Analyse de variance pour C1					
Source	DL	SC	CM	F	P
Concentr	3	2919,037	973,012	2135,63	0,000
Variété	2	897,729	448,865	985,20	0,000
Interaction	6	3120,430	520,072	1141,49	0,000
Erreur	24	10,935	0,456		
Total	35	6948,131			

Annexe.3

Tableau de variation du contenu en protéines durant la germination

Analyse de variance pour C1					
Source	DL	SC	CM	F	P
Concentr	3	0,0017659	0,0005886	114,31	0,000

Variété	2	0,0012053	0,0006027	117,03	0,000
Interaction	6	0,0007829	0,0001305	25,34	0,000
Erreur	24	0,0001236	0,0000051		
Total	35	0,0038777			

Tableau de variation du contenu en proline durant la germination

Analyse de variance pour C1

Source	DL	SC	CM	F	P
Concentr	3	1967,01	655,67	415,36	0,000
Variété	2	1150,06	575,03	364,28	0,000
Interaction	6	1843,91	307,32	194,68	0,000
Erreur	24	37,89	1,58		
Total	35	4998,86			

Tableau de variation de l'activité du POD durant la germination

Analyse de variance pour C1

Source	DL	SC	CM	F	P
Concentr	3	184,070	61,357	153,02	0,000
Variété	2	62,809	31,405	78,32	0,000
Interaction	6	28,398	4,733	11,80	0,000
Erreur	24	9,623	0,401		
Total	35	284,900			

Tableau de variation de l'activité du CAT durant la germination

Analyse de variance pour C1

Source	DL	SC	CM	F	P
Concentr	3	13,8602	4,6201	47,62	0,000
Variété	2	0,0876	0,0438	0,45	0,642
Interaction	6	9,9129	1,6522	17,03	0,000
Erreur	24	2,3283	0,0970		
Total	35	26,1891			

Annexe.4

Tableau de variation de l'activité du GHS durant la germination

Analyse de variance pour C1

Source	DL	SC	CM	F	P
Concentr	3	3,5571	1,1857	25,63	0,000
variété	2	0,2730	0,1365	2,95	0,072
Interaction	6	0,4594	0,0766	1,65	0,176
Erreur	24	1,1105	0,0463		
Total	35	5,3999			

Tableau de variation de l'activité du GPX durant la germination

Analyse de variance pour C1

Source	DL	SC	CM	F	P
Concentr	3	0,01671	0,00557	2,31	0,102
Variété	2	0,01215	0,00607	2,52	0,101
Interaction	6	0,00873	0,00145	0,60	0,725
Erreur	24	0,05783	0,00241		
Total	35	0,09542			

Annexe.5

Tableau de variation de nombre des feuilles durant la croissance

Analyse de variance pour C1

Source	DL	SC	CM	F	P
Concentr	3	26,972	8,991	19,04	0,000
Variété	2	0,389	0,194	0,41	0,667
Interaction	6	2,944	0,491	1,04	0,425
Erreur	24	11,333	0,472		
Total	35	41,639			

Tableau de variation de poids spécifique des feuilles durant la croissance

Analyse de variance pour C1

Source	DL	SC	CM	F	P
Concentr	3	0,268275	0,089425	303,71	0,000
Variété	2	0,000617	0,000308	1,05	0,366
Interaction	6	0,006117	0,001019	3,46	0,013
Erreur	24	0,007067	0,000294		
Total	35	0,282075			

Tableau de variation de surface foliaire durant la croissance

Analyse de variance pour C1

Source	DL	SC	CM	F	P
Concentr	3	2212,91	737,64	300,49	0,000
Variété	2	3,09	1,55	0,63	0,541
Interaction	6	62,13	10,35	4,22	0,005
Erreur	24	58,92	2,45		
Total	35	2337,05			

Tableau de variation du contenu en chlorophylle (a) durant la croissance

Analyse de variance pour C1

Source	DL	SC	CM	F	P
Concentr	3	308,842	102,947	125,46	0,000
Variété	2	10,281	5,141	6,26	0,006
Interaction	6	27,531	4,588	5,59	0,001

Erreur	24	19,693	0,821
Total	35	366,347	

Annexe.6

Tableau de variation du contenu en chlorophylle (b) durant la croissance

Analyse de variance pour C1

Source	DL	SC	CM	F	P
Concentr	3	296,53	98,84	59,13	0,000
Variété	2	33,55	16,77	10,03	0,001
Interaction	6	26,91	4,48	2,68	0,039
Erreur	24	40,12	1,67		
Total	35	397,11			

Tableau de variation du contenu en chlorophylle (a+b) durant la croissance

Analyse de variance pour C1

Source	DL	SC	CM	F	P
Concentr	3	1043,56	347,85	102,91	0,000
Variété	2	20,46	10,23	3,03	0,067
Interaction	6	69,77	11,63	3,44	0,014
Erreur	24	81,12	3,38		
Total	35	1214,91			

Tableau de variation du contenu en caroténoïdes durant la croissance

Analyse de variance pour C1

Source	DL	SC	CM	F	P
Concentr	3	23,788	7,929	21,54	0,000
Variété	2	1,758	0,879	2,39	0,113
Interaction	6	1,051	0,175	0,48	0,819
Erreur	24	8,833	0,368		
Total	35	35,430			

Tableau de variation du contenu en protéines durant la croissance

Analyse de variance pour C1

Source	DL	SC	CM	F	P
Concentr	3	492,557	164,186	462,58	0,000
Variété	2	616,149	308,074	867,97	0,000
Interaction	6	180,514	30,086	84,76	0,000
Erreur	24	8,518	0,355		
Total	35	1297,737			

Annexe.7

Tableau de variation du contenu en proline durant la croissance

Analyse de variance pour C1

Source	DL	SC	CM	F	P
Concentr	3	989,36	329,79	64,26	0,000
Variété	2	114,73	57,36	11,18	0,000
Interaction	6	1320,46	220,08	42,88	0,000
Erreur	24	123,16	5,13		
Total	35	2547,71			

Tableau de variation du contenu en sucres solubles durant la croissance

Analyse de variance pour C1

Source	DL	SC	CM	F	P
Concentr	3	556,68	185,56	106,03	0,000
Variété	2	2084,04	1042,02	595,40	0,000
Interaction	6	2504,91	417,48	238,55	0,000
Erreur	24	42,00	1,75		
Total	35	5187,63			

Tableau de variation de l'activité du CAT (feuilles) durant la croissance

Analyse de variance pour C1

Source	DL	SC	CM	F	P
Concentr	3	9,180	3,060	3,37	0,035
Variété	2	2,864	1,432	1,58	0,228
Interaction	6	4,065	0,677	0,75	0,619
Erreur	24	21,819	0,909		
Total	35	37,928			

Tableau de variation de l'activité du CAT (racines) durant la croissance

Analyse de variance pour C1

Source	DL	SC	CM	F	P
Concentr	3	14,331	4,777	6,30	0,003
Variété	2	5,218	2,609	3,44	0,049
Interaction	6	4,170	0,695	0,92	0,501
Erreur	24	18,209	0,759		
Total	35	41,929			

Annexe.8

Tableau de variation de l'activité du POD (feuilles) durant la croissance

Analyse de variance pour C1

Source	DL	SC	CM	F	P
Concentr	3	181,449	60,483	61,43	0,000
Variété	2	135,238	67,619	68,68	0,000
Interaction	6	102,327	17,055	17,32	0,000
Erreur	24	23,629	0,985		
Total	35	442,643			

Tableau de variation de l'activité du POD (racines) durant la croissance

Analyse de variance pour C1

Source	DL	SC	CM	F	P
Concentr	3	36,894	12,298	13,08	0,000
Variété	2	34,889	17,444	18,55	0,000
Interaction	6	38,395	6,399	6,81	0,000
Erreur	24	22,569	0,940		
Total	35	132,747			

Tableau de variation de l'activité du APX (feuilles) durant la croissance

Analyse de variance pour C1

Source	DL	SC	CM	F	P
Concentr	3	0,008395	0,002798	5,19	0,007
Variété	2	0,002663	0,001331	2,47	0,106
Interaction	6	0,006508	0,001085	2,01	0,104
Erreur	24	0,012947	0,000539		
Total	35	0,030513			

Tableau de variation de l'activité de l'APX (racines) durant la croissance

Analyse de variance pour C1

Source	DL	SC	CM	F	P
Concentr	3	0,019341	0,006447	39,96	0,000
Variété	2	0,008639	0,004319	26,77	0,000
Interaction	6	0,005422	0,000904	5,60	0,001
Erreur	24	0,003872	0,000161		
Total	35	0,037274			

Annexe.9

Tableau de variation de l'activité du GSH (feuilles) durant la croissance

Analyse de variance pour C1

Source	DL	SC	CM	F	P
Concentr	3	1,7542	0,5847	14,83	0,000
Variété	2	0,1335	0,0667	1,69	0,205
Interaction	6	0,5778	0,0963	2,44	0,055
Erreur	24	0,9461	0,0394		
Total	35	3,4114			

Tableau de variation de l'activité du GPX (feuilles) durant la croissance

Analyse de variance pour C1

Source	DL	SC	CM	F	P
Concentr	3	0,21837	0,07279	28,88	0,000
Variété	2	0,15679	0,07839	31,11	0,000
Interaction	6	0,13350	0,02225	8,83	0,000
Erreur	24	0,06048	0,00252		
Total	35	0,56914			

Effect of Lead Toxicity on Germination and Enzymatic Activity of Durum Wheat *Triticum durum* Desf.

Immene Nedjah¹, Mokhtar Boudelaa¹, Mounia Benkaddour¹, Soraya Slimani¹ and Ali Ladjama²
1. Laboratory of Plant Biology and Environment, Badji Mokhtar University, Annaba 23000, Algeria

2. Laboratory of Biochemistry and Applied Microbiology, Badji Mokhtar University, Annaba 23000, Algeria

Received: February 21, 2012 / Published: June 20, 2013.

Abstract: The aim of this work is to identify the effect of lead on germinal parameters and the antioxidant enzyme activities (lipase, peroxidase and catalase) in durum wheat *Triticum durum* Desf. cv (waha, vitron and gta) exposed to the concentrations of 0, 0.15, 0.25 and 0.3 g/L of Pb (NO₃)₂ during germination process. The obtained results showed that lead reduced the germination, root and aerial biomass. The concentration of 0.3 g/L inhibited completely the germination of the three varieties. It also slowed lipase activity, the degradation of lipids of the seed's reserves and disrupted the metabolism of peroxidase and catalase. Concerning the behavior of the three varieties studied, it appears that the Vitron is the best predisposed variety to stand against lead stress by its strong antioxidant defense system.

Key words: Germination, durum wheat, peroxidase, catalase, lipase.

1. Introduction □

Lead is one of most metals used by man, especially in agriculture and industry [1, 2], that justifies its strong presence in the environment. It is found in the soil [3-5], in the atmosphere [6, 7] as well as in water [8, 9]. It is a metal that almost presents anywhere and everywhere provoking fauna and flora toxicity. It is considered among the most dangerous heavy metals for plants. The threshold for lead toxicity to plants varies from 3 mg/L to 20 mg/L depending on the species [10]. Thus, all plant physiological mechanisms are affected. Firstly, the phenomenon of germination is inhibited even at small levels, especially for seeds that have permeable envelopes such as pea *Pisum sativum*. By contrast, seeds isolated by hard seed coats relatively impermeable as the kernel *Populaire amandula*, only the high levels induce a slower germination or full inhibition of this phenomenon [11, 12]. Lead also slows root elongation and specifically,

Corresponding author: Mokhtar Boudelaa, Ph.D., research fields: plant biology, environmental and agricultural science, abiotic stress. E-mail: m.boudel@gmail.com. primary roots that are more sensitive than lateral roots [13]. Also, it reduces the number of hairs, resulting from a metabolic disorder and causes cell membrane plasticity [14, 15]. At the cellular level, lead provokes oxidative stress which leads to excessive formation of reactive oxygen species and causes direct damage to biological molecules such as the oxidation of DNA,

proteins, lipids, carbohydrates and the inhibition of enzyme activity [16-20].

The objective of this study was to evaluate the variability of resistance of three varieties of durum wheat *Triticum durum* Desf. grown in Algeria to Pb pollution, by examining its effects on germinal parameters and enzymatic activities during the germination process.

2. Materials and Methods

2.1 Biological Material and Experimental Equipments

Three varieties of durum wheat, *Triticum durum* Desf.cv (Waha, Vitron and Gta) were the subject of the present work. They are chosen for their high use in the Algerian agriculture, and also thanks to their degree of

resistance to adverse environmental conditions. The germination test was conducted in a completely randomized experimental design, with three replications and four treatments: C0, C1, C2 and C3.

Seeds previously disinfected and washed were placed on blotting paper lining the Petri dishes.

Treatment

with concentrations previously prepared (0, 0.15, 0.25 and 0.3 g/L) were made from lead nitrate salt $Pb(NO_3)_2$.

Seeds were soaked at a rate of 25 mL of solution every 48 h. The germination test which took place in the

laboratory was characterized by favorable conditions (temperature of 23 °C, humidity of 30% and photoperiod light/dark of 16/08 h). Germination was evaluated every 24 h and for an accurate and complete

vision of the Pb ions (Pb^{2+}) effect on the germination physiology. The study investigated the yield of both

aerial and root biomass for the germinal parameters, on one hand, and the activity of lipase, peroxidase and

catalase on the other hand.

2.2 Experimental Parameters

2.2.1 The Germination Capacity

Is the maximum percentage of sprouted grains on the total number of grains that were supposed to germinate.

It is expressed as a percentage (%) using the following formula:

$$FG = \frac{NG}{NGG} \times 100\% \quad (1)$$

NG: number of germinated seeds;

NGG: number of seeds put to germinate.

2.2.2 Lipase Activity

Lipase activity was performed by the method of Luskanov and Ivanova [21], which is a titrimetric method of extracting the enzyme from seeds treated with different concentrations of lead and make it react

with a fatty acid (olive oil) for some time, before titration with NaOH (0.1 N) solution. For this purpose,

1 g of crushed seeds was added to 10 mL buffer solution (Na_2HPO_4 , $C_6H_8O_7$) (pH = 8) in two Erlenmeyer. In the first container, olive oil was added to the buffer solution of ether and alcohol at 90°C. In

the presence of phenolphthalein, the control test was titrated immediately. In the second container, the

buffer solution was added to olive oil and left for a reaction time of 30 min, and then the whole was titrated

in the same way. The lipase activity was determined by the following equation:

$$Al = \frac{(A - E) \times F \times 5}{C} \quad (2)$$

Al: lipase activity in (µg/g) of product;
A: volume of NaOH (0.1 N) needed to titrate the experimental test (mL);
B: volume of NaOH (0.1 N) needed to titrate the blank test (mL);
C: Produces what is isolated lipase (g).

2.2.3 Peroxidase Activity

The peroxidase activity was determined using the spectrophotometric method [22]. The principle is the

use of hydrogen peroxide to form a colored product in the presence of guaiacol. After a reaction time, the

enzyme activity is determined by reading the absorbance at 470 nm over a period of 300 s. The activity is calculated using the following formula:

$$POX = \frac{4 \frac{\Delta A}{\Delta t} VR \times VD \times VE}{\epsilon \times PE_2 \times PE_1 \times MF} \quad (3)$$

VR: reaction mixture;
VD: volume of dilution;
 ϵ : extinction coefficient of guaiacol;
E: thickness of the tube;
PE2: volume of the diluted extract;
PE1: volume of the crude extract used in the dilution;
MF: fresh mass of material (g).

2.2.4 Catalase Activity

The catalase activity was determined by titration using potassium permanganate (KMnO₄) which neutralizes hydrogen peroxide (H₂O₂) generated by the chemical reaction [23]. The activity of catalase is

expressed in µKat/g of fresh material (FM) using the following formula:

$$CAT = \frac{n(Vt - V)VE}{t} PE \times MF \quad (4)$$

n: number of moles of H₂O₂ oxidized by 1 mL of KMnO₄;
Vt: average volume of potassium permanganate for the determination of the witnesses (mL);
V: average volume of potassium permanganate for the determination of enzyme extracts (mL);
VE: volume of the crude enzyme extract;
PE: volume of enzyme extract which is introduced into the reaction measured;
t: reaction time (300 s);
FM: fresh mass of material in grams: 0.5 g.

2.3 Statistical Analysis

All results of this study are processed by the student *t*-test at the threshold $\alpha = 0.05$, $\alpha = 0.01$ and $\alpha = 0.001$ [24].

3. Results and Discussion

3.1 Germinal Parameters

The obtained results (Fig. 1) show that seeds of the test were viable. Indeed, the control groups of three

varieties have good germination capacity. However, lead was found to have significant inhibitory effects on

germination capacity of all treated seeds (Table 1). In general, the effect of lead was inversely proportional to

its concentration in solutions. Thus, the higher concentration provoked the lower germination rate.

Note also that the concentration of 0.3 g/L caused the blockage of germination process in the three varieties studied.

For biomass and belowground (Table 2), the results of the effect of lead were similar to those of germinal parameters. The content of 0.3 g/L resulted in a significant reduction in weight of the leaves of the Waha variety. The same concentration caused a complete cessation of root growth in the three varieties.

3.2 Lipase Activity

The activity of lipase was slightly stimulated by low

Table 1 Statistical results of the studied parameters.

Variables	Comparison	F _{obs}	P
Germination capacity	Between varieties	61.85	***
	Between doses	1,596.33	***
	Between (varieties × doses)	24.90	***
Weight of the leaves	Between varieties	94.88	***
	Between doses	151.25	***
	Between (varieties × doses)	7.92	**
Root weight	Between varieties	78.14	***
	Between doses	647.38	***
	Between (varieties × doses)	9.952	**
Lipase activity	Between varieties	2.83	NS
	Between doses	84.47	***
	Between (varieties × doses)	9.44	**
Catalase activity	Between varieties	13.36	***
	Between doses	226.16	***
	Between (varieties × doses)	92.67	***

*** $P < 0.001$: very highly significant; ** $P < 0.01$: highly significant; * $P < 0.05$: significant; NS: non significant.

Table 2 Effect of lead nitrate on the weight of dry matter leaves (DML) and dry matter roots (DMR) (mean value \pm SD, $n = 3$).

Variety	Conc. of lead (g/L)	DML	DMR
Waha	C ₀	0.19 \pm 0.007	0.13 \pm 0.02
	C ₁	0.17 \pm 0.01	0.05 \pm 0.02
	C ₂	0.14 \pm 0.01	0.02 \pm 0.01
	C ₃	0.07 \pm 0.02	-
Vitron	C ₀	0.25 \pm 0.05	0.14 \pm 0.007
	C ₁	0.21 \pm 0.007	0.07 \pm 0.01
	C ₂	0.18 \pm 0.008	0.05 \pm 0.01
	C ₃	0.15 \pm 0.01	-
Gta	C ₀	0.2 \pm 0.007	0.1 \pm 0.03
	C ₁	0.16 \pm 0.01	0.02 \pm 0.006
	C ₂	0.14 \pm 0.007	-
	C ₃	0.12 \pm 0.01	-

lead concentrations, accompanied with a gradual reduction when treated with the highest concentration (Fig. 2). Statistical analysis by *t*-test showed that this parameter was a very highly significant for the variety

Waha and Gta, and highly significant for the Vitron variety.

3.3 Peroxidase Activity

The results of Fig.3 showed that the peroxidase activity presented highly significant differences between the three varieties studied ($P < 0.001$) (Table 1).

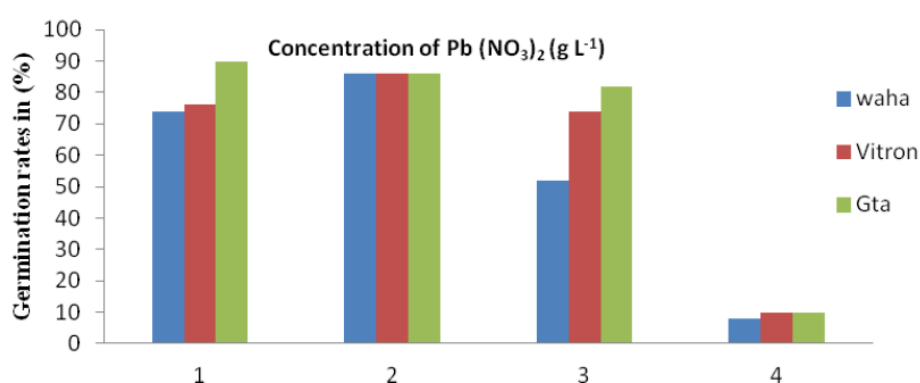


Fig. 1 Effect of lead nitrate on the germination (1: C₀, 2: C₁, 3: C₂, 4: C₃).

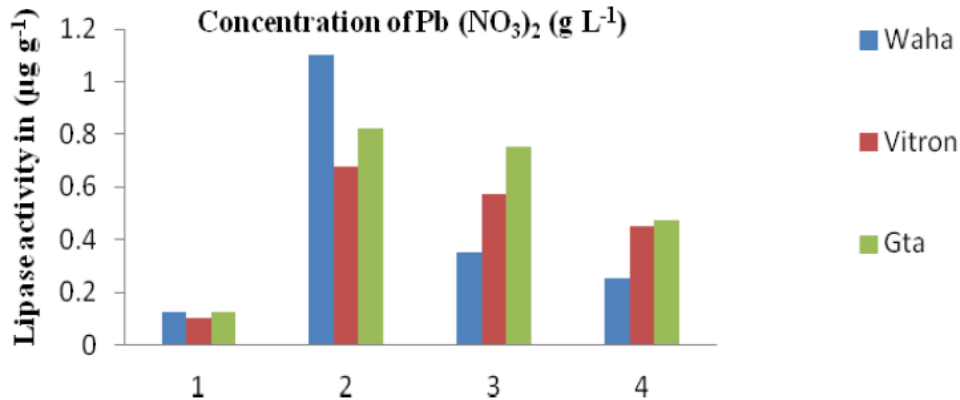


Fig. 2 The influence of lead nitrate on the lipase activity of the studied varieties.

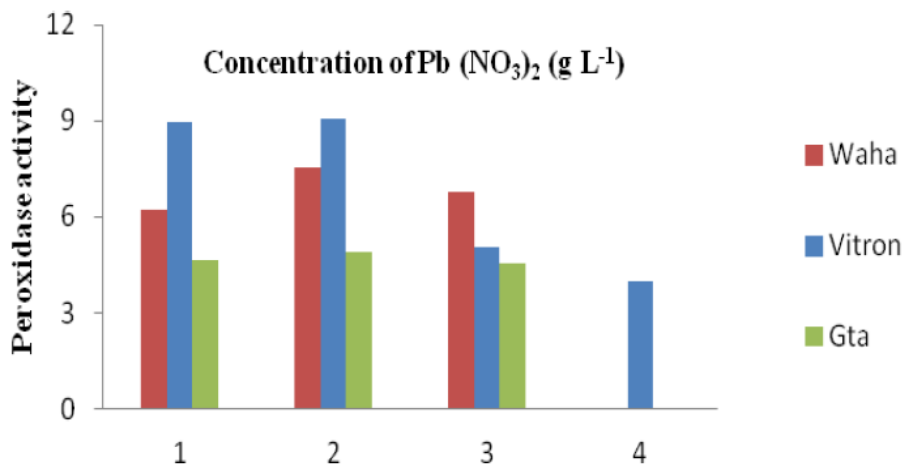


Fig. 3 Effect of lead nitrate on the peroxidase activity in µKat/g of FM.

Seed treatment by the lowest dose of lead (0.15 g/L) caused a slight increase in peroxidase activity. By contrast, high concentrations (0.25 g/L and 0.3 g/L) induced a decrease in enzyme activity with values of 6.8 µKat/g of fresh matter (FM) for the waha variety, 5.03 µKat/g, 4.0 µKat/g of FM for the vitron variety and 4.5 µKat/g of FM and zero activity for the Gta variety.

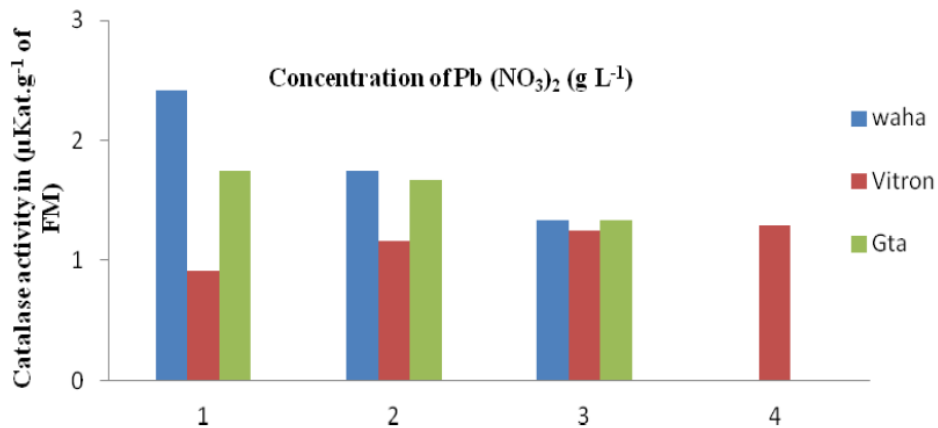


Fig. 4 Effect of lead nitrate on the catalase activity of the studied varieties.

3.4 Catalase Activity

The effect of lead on catalase showed very highly significant differences for the three varieties (Table 1).

The Fig. 4 showed that high concentrations of Pb(NO₃)₂ inhibited the catalase activity of the variety

Waha and Gta (0.0 μKat/g of FM, respectively for the dose of 0.3 g/L). However, the high dose has stimulated the activity of catalase in the Vitron variety.

Germination or late embryogenesis is the first phase of plant development [25], in which the seed gets back

to work after a period of dormancy [26, 27]. During germination, the embryo increases in size through the

use of energy from the oxidation of reserves under the influence of various hydrolases, and gradually emerges

the envelopes that surround it and the output of the coleoptile and rootlets. In this phase, the seed needs

favorable external and internal conditions for normal development.

The obtained results of this work demonstrate that lead has had a negative effect on all germ parameters.

Previous studies [28], had the same findings. Indeed, it was found that lead induced seed germination

inhibition of corn, beans [11] and the bean [29]. The roots were more sensitive to heavy metals, because

they are the first organs affected by contamination, followed by the leaves [30]. For the realization of this

important phase in the life of plants (germination), seeds need the energy from the degradation of its reserves under the action of hydrolases, as in the case of lipase (enzyme degrading triglycerides into fatty

acids and supplying ATP) [31, 32]. These triglycerides are stocked in intracellular structures called oleosomes

[33, 34]. Seed treatment with high concentrations of lead, reduces and inhibits the activity of these enzymes.

This inhibition is the result of oxidative stress caused by the penetration of lead ions (Pb²⁺) [35]. Such stress

comes from the imbalance between reactive oxygen species and antioxidants [18, 36, 37].

Peroxidases and

catalases are two classes of enzymes that facilitate the formation and elimination of hydrogen peroxide which

is toxic to cell metabolism ($2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$).

In the seeds treated with low lead concentrations, the activity of these antioxidants at first appeared to

increase [38, 39]. In contrary, the effect of lead high doses has resulted in a reduction or even inhibition of

the enzymatic activities of Waha and Gta varieties.

4. Conclusions

In conclusion, the treatment of grain by lead reduced significantly germinal parameters and disrupted the

enzyme activities of cell metabolism. Indeed, lead ions have slowed the lipase activity, especially with the high

concentration. In terms of antioxidant response, it was noted that the Vitron variety was less sensitive to lead

and seems to respond to stress better than the other two varieties of Waha and Gta.

References

- [1] J.F. Philippon, Assessment of Children's Exposure to Lead from Industrial Sources: The Case of the Factory Octel Paimboeuf, NPHS, 2000, p. 111.
- [2] C. Jin, Q. Zhou, J. Fan, Effects of chlorimuron-ethyl and cadmium on biomass growth and cadmium accumulation of wheat in the phaeozem area, Northeast China, Bull, Environ Cont. Toxicol. 84 (2010) 400.
- [3] B.J. Alloway, Heavy Metals in Soil, Blackie Academic and Professional, 1995, p. 368.
- [4] V. Laperche, M. d'ictor, B. Clozel, P. Baranger, Methodological guide lead applied to the management of sites and polluted soils, BRGM, French Republic, 2004, p. 138.
- [5] C. Abi, Speciation of three trace elements mercury, lead and cadmium in marine sediments in coastal areas-analytical chemistry specialty, Agro. Paris. Tech., 2008, p. 313.
- [6] N. NDoye, Studies of variations of selenium in Senegalese children exposed to lead from automobiles, Variation in urban areas (Dakar) and rural (Khombole), Ph.D. Thesis, Specialty Pharmacy, University Cheikh Anta Diop, Dakar, 2002, p. 61.
- [7] I. Ilyin, O. Travnikov, W. Aas, H. Uggerud, Heavy Metals: Transboundary Pollution of the Environment, EMEP, Technical Report, 2003.
- [8] H.W. Mielke, P.L. Reagan, Soil is an important pathway of lead exposure, Environ. Health Perspect 106 (1) (1998) 217-229.
- [9] M. Afri, L. Sahli, S. Mehannaoui, Organic and metal pollution of the wadis and their sediments in the Constantine region, Algeria, in Symposium-Tunisia-AA.MHA.ARET, 2009.
- [10] B. Quanouki, Application agriculture of treated wastewater and sludge from a treatment station, Euro. Journal Scien. Research 4 (2009) 602-619.
- [11] M. Wixzbicka, J. Obidzinska, The effect of lead on seed imbibitions and germination in different plant species, Plant Science 2 (1998) 155-171.
- [12] I. Seregin, B. Ivanov, Physiological aspects of cadmium and lead toxic effects on higher plants, Russian Journal of Plant Physiology 4 (2000) 523-544.
- [13] N. Obrouxheva, E. Bystrova, O.A. Ivanov, I.V. Seregin, Root growth expenses to lead in young maize seedlings, Plant and Soil 200 (1998) 55-61.
- [14] M. Prasad, Heavy Metal Stress in Plants from Biomolecules to Ecosystems, Springer Verlag, Berlin. Heidelberg, 1999, p. 462.
- [15] M. Zembala, M. Filek, S. Walas, H. Mrowiec, A. Kornas, Z. Miszalski, et al., Effect of selenium on macro and microelement distribution and physiological parameters of rape and wheat seedlings exposed to cadmium stress, Plant and Soil 329 (2009) 457-468.
- [16] A. Caro, S. Puntarulo, Effect of *in vivo* iron supplementation on oxygen radical production by soybean root, Biochimica et Biophysica Acta, General Subjects 12 (1996) 245-251.
- [17] A. Giguere, Accumulation and subcellular distribution of metals (Cd, Cu, Zn and Ni) in two aquatic organisms in

- natural environments: Relationship with oxidative stress, Ph.D. Thesis, Quebec University, INRS, Water, Earth and Environment, 2003, p. 266.
- [18] M. Qureshi, M. Abdin, S. Quadin, M. Iqbal, Lead-induced oxidative stress and metabolic alterations in *Cassia angustifolia* vahl, *Biologia Plantarum* 1 (2007) 121-128.
- [19] Y.M. Chao, S. Zhang, L. Tian, X. Lu, Differential general of hydrogen peroxide upon exposure to zinc and Cd in the hyper accumulating plant species (*Sedum alfredii* Hance), *J. of Zhejiang Univ. Scien.* 9 (2008) 243-249.
- [20] Y. Markovska, N. Gorinova, M. Nedkovska, K. Miteva, Cadmium induced oxidative damage and antioxidant responses in *Brassica juncea* plants, *Biologia Plantarum* 1 (2009) 154.
- [21] N. Luskanov, T. Ivanova, Handbook of Practical Biochemistry, I.S.T.A, Plovdiv, Bulgaria, 1994.
- [22] M. Baaziz, N. Qucif, K. Bendiab, A. Aouad, Plant peroxidases, theoretical aspects and practical applications, International Congress of Biochemistry, Agadir, 2006, pp. 17-21.
- [23] C. Gabriela, C. Dumitru, M. Costica, E. Cironea, The study of the activity of some enzymes of oxidative stress in muscle tissue has different cyprinid culture, *Genetica Moleculara Biology TOM* 5 (2005) 7-10.
- [24] P. Dagnelie, Theoretical and applied statistics, Boeck, 2006, p. 734.
- [25] Y. Pies, M.N. Bordonneau, M. Henry, C. Pies, The Plant World (Organization, Physiology and Genomics), Wiley Paris, 2005, p. 384.
- [26] A. Theron, Botany, 2nd ed., Bordas, 1964, p. 287.
- [27] S. Meyer, C. Reed, R. Bosdeveix, Botany (Biology and Plant Physiology), Maloine, 2004, p. 461.
- [28] I. Seregin, A. Kozhevnikova, Physiological role of nickel and its toxic effects on higher plants, *Russian Journal of Plant Physiology* 2 (2005) 257-277.
- [29] B. Pourrut, G. Perchet, J. Silvestre, M. Cecchi, M. Guisresse, E. Pinelli, Potential role of NADPH-oxidase in early steps of lead-induced oxidative burst in *Vicia faba* roots, *Journal of Plant Physiology* 165 (6) (2008) 571-579.
- [30] S. Pawlak, E.A. Firyck, E.K. Rymer, J. Deckert, Cu, Zn-superoxide dismutase is differently regulated by cadmium and lead in roots of soybean seedlings, *Acta Physiol. Plant* 3 (2009) 741-747.
- [31] P. Adlercreutz, T. Gitlesen, I. Ncube, J. Read, Veronia lipase: A plant lipase with strong fatty acid selectivity, *Methods Enzymol* 284 (1997) 220-231.
- [32] K.D. Mukherjee, Triacylglycerol lipase from rape (*Brassica napus*) suitable for biotechnological purposes, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 26 (1990) 1-10.
- [33] F. Beisson, Oil-bodies as substrates for lipolytic enzymes, *Biochim. Biophys. Acta* 1531 (2001) 47-58.
- [34] P. Fickers, J. Destain, P. Thonart, Lipases are atypical hydrolases, main features and applications, *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 2 (2008) 119-130.
- [35] D. Galaris, A. Evangelou, The role of oxidative stress in mechanisms of metal-induced carcinogenesis, *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 42 (1) (2002) 93-103.
- [36] R. Kehrer, Free radicals mediators of tissue injury and disease, *Crit. Rev. Toxicol.*, 1993, p. 48.

- [37] F. Ramel, C. Sulmon, F. Hurtado, L. Taconnat, M. Martin-Magniette, J. Renou, et al., Genome-wide interacting effects of sucrose and herbicide mediated stress in *Arabidopsis thaliana*: Novel insights into atrazine toxicity and sucrose-induced tolerance, *BMC Genomic* 8 (2007) 450.
- [38] R. Mittler, M. Vanderawvera, F. Breusergem, Reactive oxygen network of plants, *Trends in Plant Science* 9 (2004) 490-498.
- [39] R. Chaaya, Role of oxidative stress induced by monoamine oxidase in renal fibrosis, Ph.D. Thesis, University of Toulouse, 2010, p. 200.