



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

جامعة باجي مختار - عنابة

UNIVERSITE BADJI MOKHTAR - ANNABA

FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

THESE EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE DOCTORAT EN SCIENCES

Spécialité: BIOLOGIE VEGETALE

Intitulé

**Evaluation de la toxicité de deux métaux lourds
(Cadmium et Zinc) sur le métabolisme énergétique
(Respiratoire et Photosynthétique)
d'une plante aquatique « *Elodea canadensis* »**

Presentée par

M^{elle} ZOUAINIA Sabrina

Membres de Jury:

Dr. BERREBBAH Houria	Prof	Université de Annaba	Président
Dr. DJEBAR Med Reda	Prof	Université de Annaba	Directeur
Dr. CHAGRA Ali	MCA	Université de Annaba	Examineur
Dr. ALIOUA Amel	Prof	Université d'Oran	Examineur
Dr. BOUCHELAGUEM Sabrina	MCA	Université de Taref	Examineur
Dr. KACHI Slimane	Prof	Université de Guelma	Examineur

Année universitaire: 2016/2017

Remerciements

Mes profonds remerciements vont à tous les membres de cet honorable jury qui ont bien accepté d'évaluer mon travail.

*J'adresse ma gratitude à **Madame BERREBBAH Houria** Professeur à l'Université de Badji Mokhtar Annaba pour avoir accepté de présider le jury de ma thèse, pour son soutien et ses conseils précieux.*

*Je tiens à remercier mon directeur de thèse **Monsieur DJEBAR Mohamed Réda** d'avoir bien assuré la direction de cette thèse, je le remercie très sincèrement pour sa gentillesse, sa patience et ses précieux conseils.*

*Je remercie **Madame ALIOUA Amel**, Professeur à l'Université Mohamed Boudiaf d'Oran qui a fait l'honneur de juger et d'examiner ce travail.*

*Je tiens également à remercier **Madame BOUCHELAGHEM Sabrina** Maître de conférences à l'Université d'EL TARF, pour avoir pris sur son temps et accepter d'examiner ce travail et participer à ce jury.*

*Je remercie **Monsieur CHAGRA Ali** Maître de conférences à l'Université de Badji Mokhtar Annaba, pour avoir accepté d'examiner ce travail et participer à ce jury.*

*Mes plus vifs remerciements à **Monsieur KACHI Slimane** Professeur à l'Université de Guelma, pour sa disponibilité et pour faire partie de ce jury, je lui exprime toute ma gratitude d'avoir accepté d'examiner ce travail.*

*Je tiens à remercier chaleureusement **Madame SBARTAI Hana** Maître de conférences à l'Université de Badji Mokhtar Annaba, pour son aide et ses conseils précieux.*

Je remercie ma mère et mon frère pour leur soutien et leurs encouragements durant toutes ces années de thèse, qu'ils trouvent ici le témoignage de toute ma gratitude.

A mes deux petites princesses Sirine et Lina qui sont les plus chères à mes yeux.

Je remercie vivement mes collègues et amis du laboratoire de Toxicologie Cellulaire (Amina, Chiraz, Lyes, Housseem, Tayeb, Linda, Asma, Myriam, Fella ...etc), qu'ils trouvent ici l'expression de ma profonde amitié.

Enfin, un grand remerciement à mes amis Amina et Lyes qui m'ont beaucoup soutenu et aidé à réaliser ce travail de thèse avec leur amour, humour, que de très bons moments, je leur dis merci d'avoir été là à cet instant précis car ils m'ont apporté beaucoup de belles choses.

Résumé

Notre travail vise à évaluer l'impact de deux xénobiotiques cadmium et zinc sur une plante aquatique « *Elodea canadensis* ». Nous nous sommes intéressés à évaluer la toxicité de ces xénobiotiques sur les aspects biométriques, biochimiques, enzymatiques, et le métabolisme énergétique (respiration et photosynthèse).

A cet effet, des plantes d'élodée « *Elodea canadensis* » repiquées dans une solution nutritive subissent un traitement par des concentrations croissantes de chlorure de cadmium et de zinc (10,20, 40. 80 et 160 μ M) séparément pendant 07 et 14 jours.

Les résultats obtenus montrent que la croissance pondérale est affectée par la présence des deux polluants (Cd et Zn).

Parallèlement, on observe une augmentation du taux des protéines ainsi que de la quantité de proline pour les deux traitements ; l'activité enzymatique CAT présente des fluctuations assez importantes pour les deux xénobiotiques où on remarque une induction pour les faibles concentrations (10 μ M et 20 μ M) et une inhibition aux concentrations élevées (40 μ M, 80 μ M et 160 μ M) après 7 et 14 jours d'application. Une inhibition totale du taux de GSH pour les plantes traitées avec le cadmium durant 7 et 14 jours, contrairement aux plantes traitées avec le zinc, on a enregistré une augmentation de ce taux (GSH) après 7 jours de traitement et une inhibition totale de cette dernière après 14 jours de traitement.

On a noté aussi, une augmentation des activités enzymatiques APX, GST avec les faibles concentrations du cadmium et zinc et une diminution de ces activités avec les plus fortes doses. Enfin concernant les paramètres métaboliques, à savoir la respiration et la photosynthèse, il apparaît clairement qu'elles sont très affectées en présence du Cd et Zn.

Mots-clés: Cd, Zn, Croissance pondérale, Chlorophylles, Proline, Stress oxydant, *Elodea canadensis*, Respiration, Photosynthèse.

Abstract

Our work aims to assess the impact of two xenobiotics cadmium and zinc on an aquatic plant "Elodea canadensis". We are interested in evaluating the toxicity of these xenobiotics on the biometric, biochemical, enzymatic aspects and the energy metabolism (respiration and photosynthesis).

For this purpose, plants of elodea "Elodea canadensis" transplanted in a nutrient solution are treated with increasing concentrations of cadmium chloride and zinc chloride (10, 20, 40, 80 and 160 μM) separately for 7 and 14 days.

The results obtained show that weight growth is affected by the presence of the two pollutants (Cd and Zn).

At the same time an increase in the level of proteins as well as the amount of proline for both treatments ; the CAT enzyme activity exhibits quite significant fluctuations for the two xenobiotics where induction is observed at low concentrations (10 μM and 20 μM) and an inhibition at high concentrations (40 μM , 80 μM and 160 μM) after 7 and 14 days of application. Total inhibition of GSH level for plants treated with cadmium for 7 and 14 days, unlike plants treated with zinc, an increase in this rate (GSH) was observed after 7 days of treatment and total inhibition of the latter after 14 days of treatment.

There was also an increase in APX, GST enzymatic activities with low concentrations of cadmium and zinc and a decrease in these activities with the highest concentrations. Finally, regarding the metabolic parameters, namely respiration and photosynthesis, it is clear that they are highly affected in the presence of Cd and Zn.

Keywords: Cd, Zn, Weight growth, Chlorophylls, Proline, Oxidative stress, Elodea canadensis, Respiration, Photosynthesis.

ملخص

يهدف هذا العمل إلى تقييم أثر كل من الكاديوم والزنك على النباتات المائية «*Elodea canadensis*». ونحن مهتمون في تقييم سمية الملوثات على الجوانب الحيوية، والكيمياء الحيوية، الأنزيمية، و التمثيل الطاقوي (التنفس والتركيب الضوئي). لهذا الغرض نباتات الحشائش المائية «*Elodea canadensis*» زرعت في المحلول المغذي وتخضع للعلاج مع تركيزات كلوريد الكاديوم والزنك ($10.20.60.80.160 \mu\text{M}$) بشكل منفصل استمرت لمدة 07 و 14 يوما. وتظهر النتائج أن الزيادة في وزن النباتات يتأثر بوجود كلا من الملوثات (الكاديوم والزنك). وفي الوقت نفسه، هناك زيادة في مستويات البروتين فضلا عن كمية البرولين لكل من التركيزات.

اما فيما يخص نشاط انزيم CAT تظهر النتائج تحولات كبيرة تتمثل في ارتفاع نشاطه مع التركيزات المنخفضة ($10.20\mu\text{M}$) و تثبيط النشاط مع التركيزات المرتفعة ($40.60.120\mu\text{M}$) و ذلك بوجود كلا من الملوثين بعد 7 و 14 يوما، تثبيط كامل على مستوى معدلات GSH بالنسبة للنباتات المعالجة بالمعدن الملوث كاديوم Cd بعد 7 و 14 يوما على عكس النباتات المعالجة بمعدن الزنك Zn هناك زيادة في هذه النسبة بعد 7 أيام من العلاج و تثبيط إجمالي بعد 14 يوم من العلاج.

وأشير أيضا إلى زيادة الأنشطة الإنزيمية APX, GST مع تركيزات منخفضة من الكاديوم والزنك، وانخفاض هذه الأنشطة مع أعلى التركيزات. أخيرا على معايير التمثيل الطاقوي ، ألا وهي التنفس والتمثيل الضوئي، فمن الواضح أنها تتأثر جدا في وجود الكاديوم والزنك.

الكلمات المفتاحية : Cd, Zn, الوزن, اليخضور, البرولين, الاكسدة الحيوية , *Elodea canadensis* , التنفس, التركيب الضوئي .

Liste des figures

Figure	Titres	Pages
1	Schéma illustrant la mobilité des métaux lourds	5
2	Principaux effets du cadmium sur la physiologie des plantes et réponses des plantes au cadmium	13
3	Mécanismes des lésions biochimiques induites par le stress oxydant.	17
4	Les différents types de phytoremédiation	22
5	<i>Elodea Canadensis</i>	25
6	Effet du traitement par le Cd sur la croissance pondérale d' <i>Elodea canadensis</i> après 7et 14 jours de traitement	36
7	Effet du traitement par le Cd sur les variations du taux de protéines totales chez <i>Elodea canadensis</i> après 7et 14 jours	37
8	Effet du traitement par le Cd sur les variations du taux de proline chez <i>Elodea canadensis</i> après 7et 14 jours	38
9	Effet du traitement par le Cd sur les variations du taux de GSH chez <i>Elodea canadensis</i> après 7et 14 jours	39
10	Effet du traitement par le Cd sur les variations l'activité GST chez <i>Elodea canadensis</i> après 7et 14 jours	40
11	Effet du traitement par le Cd sur les variations de l'activité catalase chez <i>Elodea canadensis</i> après 7et 14 jours	41
12	Effet du traitement par le Cd sur les variations de l'activité APX chez <i>Elodea canadensis</i> après 7et 14 jours	42
13	Effet du traitement par le Cd sur les variations du taux de la chlorophylle (a) chez <i>Elodea canadensis</i> après 7et 14 jours	43
14	Effet du traitement par le Cd sur les variations du taux de la chlorophylle (b) chez <i>Elodea canadensis</i> après 7et 14 jours	43
15	Effet du traitement par le Cd sur les variations du taux de la chlorophylle (a+b) chez <i>Elodea canadensis</i> après 7et 14 jours	44
16	Effet du traitement par le Cd sur les variations du métabolisme respiratoire chez <i>Elodea canadensis</i> après 7 jours	45
17	Effet du traitement par le Cd sur les variations du métabolisme respiratoire chez <i>Elodea canadensis</i> après 14 jours	46
18	Effet du traitement par le Cd sur les variations de la photosynthèse chez <i>Elodea canadensis</i> après 7 jours	47

19	Effet du traitement par le Cd sur les variations de la photosynthèse chez <i>Elodea canadensis</i> après 14 jours	47
20	Effet du traitement par le Zn sur la croissance pondérale d' <i>Elodea canadensis</i> après 7 et 14 jours	49
21	Effet du traitement par le Zn sur les variations du taux de protéines totales chez <i>Elodea canadensis</i> après 7 et 14 jours	50
22	Effet du traitement par le Zn sur les variations du taux de proline chez <i>Elodea canadensis</i> après 7 et 14 jours	51
23	Effet du traitement par le Zn sur les variations du taux de GSH chez <i>Elodea canadensis</i> après 7 et 14 jours	52
24	Effet du traitement par le Zn sur les variations du taux de GST chez <i>Elodea canadensis</i> après 7 et 14 jours	53
25	Effet du traitement par le Zn sur les variations de l'activité catalase chez <i>Elodea canadensis</i> après 7 et 14 jours	54
26	Effet du traitement par le Zn sur les variations l'activité APX chez <i>Elodea canadensis</i> après 7 et 14 jours	55
27	Effet du traitement par le Zn sur les variations du taux de la chlorophylle (a) chez <i>Elodea canadensis</i> après 7 et 14 jours	56
28	Effet du traitement par le Zn sur les variations du taux de la chlorophylle (b) chez <i>Elodea canadensis</i> après 7 et 14 jours	56
29	Effet du traitement par le Zn sur les variations du taux de la chlorophylle (a+b) chez <i>Elodea canadensis</i> après 7 et 14 jours	57
30	Effet du traitement par le Zn sur les variations du métabolisme respiratoire chez <i>Elodea canadensis</i> après 7 jours	58
31	Effet du traitement par le Zn sur les variations du métabolisme respiratoire chez <i>Elodea canadensis</i> après 14 jours	59
32	Effet du traitement par le Zn sur les variations de la photosynthèse chez <i>Elodea canadensis</i> après 7 jours	60
33	Effet du traitement par le Zn sur les variations de la photosynthèse chez <i>Elodea canadensis</i> après 14 jours	60

Liste des tableaux

Tableau	Titre	pages
1	Concentrations moyennes de quelques ETM dans les sols et les plantes en mg/kg	4
2	Classification de l'élodée de canada	26

LISTE DES ABREVIATIONS

ASC: Acide Ascorbique
APX: Ascorbate peroxydase
CAT: Catalase
CTE : Chaîne de transport d'électrons
ERO: Espèce Reactive de l' Oxygène
FNR : Ferrédoxine NADP Réductase
GSH: Glutathion réduit
GSSG: Glutathion disulfure
GST : Glutathion S transférase
MDA : Malonedialdéhyde
H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène
GPX : Glutathion Peroxydase
SOD : Superoxyde Dismutase
HAP : Hydrocarbures polyaromatiques
Cd : Cadmium
Zn : Zinc
ETM : Eléments traces métalliques
CEC : capacité d'échange de cation
Eh : Potentiel redox
LMW : Low Molecular Weight
HMW : High Molecular Weight
PCS: Synthèse des phytochélatines
BSA: Albumine Sérum Bovine

Table des matières

Liste des Tableaux	
Liste des Figures	
Liste des Abréviations	
Résumé	
Abstract	
ملخص	
Préambule	1

CHAPITRE I : Introduction Générale

1. Métaux lourds : Généralités	3
1.1. Mobilité et biodisponibilité des métaux	4
1.1.1. La teneur en argile	5
1.1.2. Le pH	6
1.1.3. Le potentiel redox (Eh)	6
1.2. Toxicité et tolérance des plantes aux métaux lourds	7
1.2.1. Toxicité	7
1.2.2. Tolérance	8
1.3. Comportement des métaux lourds dans la plante	8
1.3.1. Absorption racinaire	9
1.3.2. Translocation	9

1.3.3. Accumulation	10
2. Métaux lourds : Cas du Cadmium et Zinc	10
2.1. Cadmium	10
2.1.1. Effets du cadmium sur la physiologie des plantes	11
2.2. Zinc	13
2.2.1. Chélation du zinc dans la cellule	14
3. Le stress oxydant	14
3.1. Les systèmes de défenses antioxydants	16
3.1.1. Systèmes enzymatiques	17
3.1.2. Systèmes non enzymatiques	18
3.2. Implication des mitochondries dans le stress oxydatif des ROS	18
4. La phytoremédiation	19
4.1. Principe de la technique de phytoremédiation	19
4.2. Mécanismes de phytoremédiation	19
4.3. Le potentiel épuratoire des plantes aquatiques	21
5. Le stress chez les végétaux aquatiques	22
6. Objectif du travail	23

CHAPITRE II: Matériel et Méthodes

1. Matériel expérimental	25
1.1. Matériel biologique	25
1.1.1. Classification	26
1.1.2. Description	26
1.1.3. Répartition	28

1.1.4. Reproduction	28
1.1.4.1. Reproduction sexuée	28
1.1.4.2. Reproduction asexuée	29
1.1.5. Caractéristique spatiales	29
1.1.6. Impacts négatifs des élodées	30
1.2. Matériel expérimental chimique	31
2. Conduite de l'essai et traitements	31
3. Paramètres mesurés	31
3.1. La croissance pondérale	31
3.2. Dosage des protéines totales	31
3.3. Dosage des chlorophylles	32
3.4. Dosage de la proline	32
3.5. Dosages des biomarqueurs	33
3.5.1. Dosages enzymatiques	33
3.5.1.1. Préparation de l'extrait enzymatique	33
3.5.1.2. Dosage de l'activité Glutathion S-Transférase (GST)	34
3.5.2. Dosages non enzymatiques	34
3.5.2.1. Le Glutathion (GSH)	34
3.5.2.2. Dosage de l'activité Ascorbate-peroxydases (APX)	34
3.5.2.3. Dosage de l'activité catalase (CAT)	35
3.6. Etude du métabolisme photosynthétique	35
3.7. Etude du métabolisme respiratoire	35
3.8. Analyse statistique	35

CHAPITRE III: Résultats et Discussion

1. Évolution de la croissance pondérale chez « <i>Elodea canadensis</i> » traitée par le cadmium	36
2. Evolution du taux des protéines totales chez « <i>Elodea canadensis</i> » suite au traitement par le cadmium	37
3. Evolution du taux de la proline chez « <i>Elodea canadensis</i> » traité par le cadmium.....	3
4. Dosage de la GSH chez <i>Elodea canadensis</i> traitée par le cadmium	39
5. Dosage de la GST chez <i>Elodea canadensis</i> traitée par le cadmium	40
6. Effet du cadmium sur l'activité catalase	41
7. Effet du cadmium sur l'activité ascorbate peroxydase (APX)	42
8. Effet du cadmium sur la teneur en chlorophylle (a, b et a+b)	43
9. Effet du cadmium sur le métabolisme respiratoire	44
10. Effet du cadmium sur le métabolisme photosynthétique	46
11. Évolution de la croissance pondérale chez <i>Elodea canadensis</i> traitée par le Zinc	47
12. Evolution du taux de protéines totales chez <i>Elodea canadensis</i> suite au traitement par le Zinc	48
13. Evolution du taux de la proline chez <i>Elodea canadensis</i> traité par le Zinc	49
14. Dosage de la GSH chez <i>Elodea canadensis</i> traitée par le zinc	50

15. Effet du zinc sur l'activité GST chez <i>Elodea canadensis</i> traitées par le zinc ...	51
16. Effet du Zinc sur l'activité catalase	52
17. Effet du Zinc sur l'activité ascorbate peroxydase (APX)	53
18. Effet du zinc sur la teneur en chlorophylle (a, b et a+b)	54
19. Effet du zinc sur le métabolisme respiratoire	55
20. Effet du zinc sur le métabolisme photosynthétique	57
Discussion	62
CHAPITRE IV : Conclusion et Perspectives	75
CHAPITRE V : Références bibliographiques	79

Préambule :

La pollution de l'environnement par les substances toxiques telles que les métaux lourds, les composés organochlorés (PCB, pesticides chlorés) et les hydrocarbures polycycliques aromatiques (HAP), est un problème qui touche tous les pays du monde. Les effets de la pollution sur les écosystèmes et sur la santé humaine peuvent parfois se faire sentir très loin de la source de pollution (Johnson, 2008). Les métaux lourds sont présents dans le milieu marin de façon naturelle et certains sont même essentiels au bon fonctionnement de nombreux processus biologiques.

Cependant, de trop grandes concentrations de ces métaux, principalement dits non-essentiels, peuvent s'avérer toxiques pour les organismes aquatiques (Daby, 2006). Les activités anthropiques sont autant de sources qui contribuent à l'augmentation des concentrations de métaux lourds dans le milieu marin et surtout en zone côtière (Kaiser, 2004). En effet, les concentrations corporelles en contaminants peuvent être utilisées pour évaluer leur absorption par les organismes vivants et l'augmentation de la concentration d'un polluant depuis l'environnement vers l'organisme (bioaccumulation) où certains tissus vont avoir un rôle prépondérant, en séquestrant de façon préférentielle le polluant. Les métaux lourds s'accumulent dans les organismes et tout au long de la chaîne alimentaire à des concentrations causant de profonds bouleversements dans la diversité et la structure des communautés biologiques (Boening, 1999). C'est pourquoi, l'évaluation des quantités de métaux lourds présents dans les écosystèmes et dans les organismes est une préoccupation majeure des chercheurs en écotoxicologie (Huang *et al.*, 2007).

Toutefois, l'étude de la bioaccumulation des métaux lourds au niveau des organismes exposés constitue un moyen important pour l'évaluation de la pollution métallique (Lagadic *et al.*, 1997). L'accumulation des métaux chez les organismes est souvent un meilleur indicateur de la toxicité de ces composés par rapport à la détermination de leur concentration dans le milieu même, car les variations de leur biodisponibilité sont obligatoirement prises en compte (Connell *et al.*, 1999 ; Borgmann, 2000).

Avec l'essor industriel, agricole et urbain des pays développés, les polluants issus des activités anthropiques exercent une pression croissante sur l'environnement, et notamment sur les écosystèmes marins (Smolders *et al.*, 2003 ; Rao *et al.*, 2007 ; D'adamo *et al.*, 2008).

Les contaminants rejetés dans l'environnement finissent par se retrouver plus ou moins rapidement dans les milieux aquatiques, en particulier estuariens et côtiers, où ils peuvent avoir des effets à court et à long terme (Burton, 1992). Ils altèrent les communautés et affectent les organismes qui les composent (Boening, 1999; Viaroli *et al.*, 2005; Warwick, 2005).

Les écosystèmes aquatiques représentent d'importants réservoirs de polluants qui se répartissent au niveau des différents compartiments (eau, substrat et organismes) (Aarab, 2004). Les substances toxiques peuvent exercer leurs effets négatifs même à de très faibles concentrations et présenter souvent une grande variabilité à se concentrer, ce qui complique l'évaluation des quantités rejetées et leurs impacts sur les écosystèmes. Pour ces raisons, un grand nombre d'intervenants du milieu marin (scientifiques, gestionnaires, agences gouvernementales) s'intéressent au développement de différents moyens permettant de mesurer les effets de la pollution urbaine, industrielle et agricole sur les écosystèmes marins (Burger, 2006).

1. Métaux lourds : Généralités

Le terme « métaux lourds » désigne les éléments métalliques naturels, métaux ou dans certains cas métalloïdes (environ 65 éléments), caractérisés par une forte masse volumique supérieure à 5 g/cm³ (Adriano, 2001).

Chez les végétaux, certains métaux lourds sont indispensables aux processus physiologiques majeurs, en particulier à la respiration, la photosynthèse ou l'assimilation des macronutriments (Cu, Zn, Ni, Fe, Co) (Kabata-Pendias et Pendias, 2001).

Par définition, les éléments traces sont « les éléments minéraux constituant de la croûte terrestre dont la concentration pour chacun d'entre eux est inférieure à 0,1% » tels que le chrome, le nickel, le zinc, le cuivre, le plomb ou le cadmium. A l'inverse, les éléments dits majeurs interviennent pour 99,4% dans le total des éléments chimiques sur Terre et regroupent, entre autres, le fer et le manganèse (Viard, 2004).

Après cette première classification, il est nécessaire de distinguer :

- Les oligo-éléments ou Métaux Essentiels, indispensables au fonctionnement des organismes biologiques, tels que le cuivre, le fer, le manganèse, le nickel, le zinc et le chrome. Toutefois, présents à des concentrations excessives, ils deviennent toxiques pour les organismes.
- Les éléments à caractère non indispensable, également toxiques quand leurs concentrations dépassent certains seuils tels que : le cadmium, l'arsenic et le mercure (Viard, 2004).

Les éléments traces métalliques (ETM) sont présents à différents niveaux de la croûte terrestre. Les concentrations moyennes d'ETM rencontrées dans les sols se trouvent dans une gamme allant de moins de 0,01 à plus de 1 500 mg par kg de sol mais peuvent dépasser 50 à 70 g dans les sols métallifères (Alloway, 1995 reporté par Gardea-Torresdey *et al.*, 2005).

Ces quantités sont variables selon le type de métal comme indiqué dans le tableau 01. Il en résulte des concentrations variables dans les plantes qualifiées de sensibles.

Tableau 01 : Concentrations moyennes de quelques ETM dans les sols et les plantes en mg / kg (Gardea-Torresdey *et al.*, 2005).

Métal	Concentration dans les sols non métallifères	Concentration dans les sols métallifères	Concentration dans les plantes (sols non métallifères)
Cadmium	0,01 – 2	10 – 320	0,1 – 3
Chrome	5 – 1500	50 – 8450	0,2 – 5
Cuivre	2 – 250	52 – 50900	5 – 25
Mercure	0,01 – 0,5	100 – 400	0,1 – 9,5
Nickel	2 – 750	20 – 11250	1 – 10
Plomb	2 – 300	3850 – 49900	0,1 – 5
Zinc	1 – 900	110 – 70450	2 – 400

Les éléments métalliques dans les sols ont deux origines. La première, naturelle, est constituée de l'héritage de la composition chimique initiale, qui a par la suite été plus ou moins modifiée, suite à l'altération de la roche mère. En effet, un sol formé sur une roche riche en un élément donné sera obligatoirement riche en cet élément. Les éléments métalliques issus de cet héritage constituent le fond pédogéochimique, qui correspond aux teneurs en éléments, résultant de phénomènes géologiques et pédogénétiques (différenciation d'horizons) en l'absence de toutes contaminations liées à l'activité humaine (Baize, 1997).

La seconde source de présence d'ETM dans l'environnement est d'origine humaine. L'activité humaine est la cause majeure de la présence d'ETM dont les concentrations dans l'environnement se sont considérablement accrues au cours des 200 dernières années (Roth *et al.*, 2006).

1.1. Mobilité et biodisponibilité des métaux

La toxicité d'un métal dépend de sa spéciation (forme chimique) autant que des facteurs environnementaux (Babich, 1980). Dans le sol, les métaux lourds peuvent exister sous forme d'ion libre ou sous forme liée à des particules de sol.

Cependant, un métal n'est toxique pour les organismes vivants que s'il est sous forme libre ; il est alors biodisponible. Comme tout élément chargé positivement, les cations métalliques peuvent interagir dans le sol avec toute particule organique ou minérale chargée négativement. De l'équilibre entre les formes libres et fixées de l'ion va dépendre sa biodisponibilité, directement liée à sa toxicité. Enfin, la biodisponibilité (Figure 01) des métaux lourds varie en fonction de plusieurs facteurs du sol.

Parmi lesquels, la capacité d'échange de cation (CEC), le pH, le potentiel redox (Eh), la teneur en phosphate disponible, la teneur en matière organique et les activités biologiques

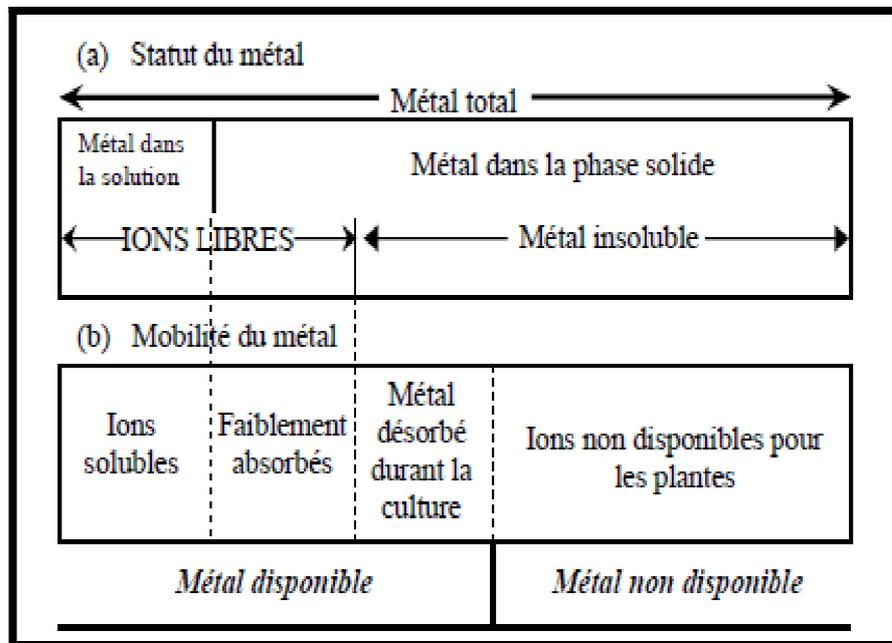


Figure 01 : Schéma illustrant la mobilité des métaux lourds (Shallari, 1997)

1.1.1. La teneur en argile

Les argiles, de par leurs propriétés physico-chimiques, jouent un rôle très important dans la disponibilité des métaux lourds. Li et Li (2000) ont montré que les métaux lourds peuvent être absorbés et immobilisés par les minéraux argileux ou également être complexés par la matière organique du sol en formant alors un complexe organométallique (Lamy, 2002). En effet, la charge électronégative des argiles les rend

aptes à contracter des liaisons électrostatiques avec toute entité chargée positivement, comme les cations métalliques.

Ces liaisons sont réversibles et les cations fixés sont échangeables : ils peuvent être remplacés par d'autres cations présents dans la phase aqueuse du sol. Cette capacité d'échange de cations (CEC) exprimée en milliéquivalents pour 100 g est une caractéristique importante de chaque argile qui conditionne grandement la biodisponibilité d'un métal dans le sol.

1.1.2. Le pH

Le pH est un autre facteur important influençant la solubilité et la spéciation du métal et donc sa toxicité (Babich et Stotzky, 1977a et b). Quand le pH diminue d'une unité, la concentration des cations métalliques libres augmente d'environ un facteur 2 dans la solution de sol et par conséquent améliore la phytoextraction (Christensen, 1984 ; Sanders, 1983 ; Sanders et *al.*, 1986). Les organismes et les microorganismes eux-mêmes peuvent influencer la disponibilité des métaux lourds dans leur environnement proche par acidification locale lors d'une réaction métabolique ou par la production de composés complexant les métaux lourds (Giller et *al.*, 1998).

1.1.3. Le potentiel redox (Eh)

Le potentiel redox (Eh) permet de caractériser les échanges d'électrons entre les espèces chimiques. Ainsi, les faibles valeurs d'Eh favorisent la dissolution des hydroxydes et entraînent une augmentation de la concentration des métaux associés avec des composants (Chaignon, 2001). De plus, la modification du degré d'oxydation des ligands ou des éléments se liant avec le métal influence indirectement la solubilité des métaux lourds. Par exemple, en conditions réductrices, les sulfates sont réduits en sulfure qui piègent volontiers les éléments métalliques tels que Pb, Cd, Zn (Deneux-Mustin et *al.*, 2003).

Bien que l'influence des conditions oxydo réductrices du sol semble très importante au regard de la mobilité des éléments métalliques, il n'en demeure pas moins que ce facteur apparaît souvent comme secondaire par rapport au pH. En effet, pour un sol

donné l'Eh varie en fonction inverse du pH, il augmente quand le pH diminue (Deneux-Mustin *et al.*, 2003).

1.2. Toxicité et tolérance des plantes aux métaux lourds

1.2.1. Toxicité

Les symptômes de toxicité associés aux métaux lourds sont peu différents de ceux produits par différents types de stress. Le premier effet des métaux lourds introduits dans la rhizosphère va se traduire par une interaction avec les autres composants ioniques du sol (Cseh, 2002). Les métaux peuvent alors précipiter avec des ligands anioniques ou entrer en compétition avec d'autres cations pour des sites de liaison de la paroi pecto-cellulosique des cellules racinaires.

Dû au fait que la paroi présente une considérable capacité d'échange des cations, le premier effet des métaux lourds sera l'inhibition ou la stimulation de l'absorption des cations, causant des changements significatifs du métabolisme (par exemple un stress dû à la déficience en fer) (Cseh, 2002).

L'effet le plus habituel et le moins spécifique des métaux lourds consiste en une réduction de la croissance des différentes parties de la plante. Selon l'importance du stress, les feuilles peuvent présenter une chlorose due à la fois à une perte de chlorophylle, à une relative augmentation des caroténoïdes et à une déficience en fer (Romanowska, 2002). Dans les cas les plus sévères, une apparition de tâches nécrotiques est observée (Fodor, 2002).

Ces effets apparents résultent en fait d'une altération de processus vitaux tels que le transport et le métabolisme. Ainsi, une diminution de la conductivité hydraulique racinaire associée à la fermeture des stomates entraîne une réduction de la transpiration (Poschenrieder *et al.*, 1989 ; Barcelo et Poschenrieder, 1990 ; Haag-Kerwer *et al.*, 1999) ; il en découle une réduction de la fourniture en éléments minéraux dont les nitrates et, de ce fait, une perturbation du métabolisme azoté des feuilles (Gouia *et al.*, 2000 ; Klobus *et al.*, 2002).

Les métaux induisent également un abaissement de la photosynthèse qui résulte soit d'un effet direct sur le transport des électrons et les enzymes du cycle de Calvin (en particulier de la Rubisco) soit d'un effet indirect, en raison d'une diminution de la teneur en chlorophylle (Stobart *et al.*, 1985 ; Van Assche et Clijsters, 1986 ; Chatterjee et Chatterjee, 2000 ; Mysliwa-Kurdziel et Strzalka, 2002 ; Romanowska, 2002).

1.2.2. Tolérance

Un nombre restreint de plantes se révèlent capables de se développer sur des sols fortement contaminés par les métaux lourds. C'est en 1885 que le botaniste allemand Baumann observa que certaines espèces accumulaient ainsi dans leurs feuilles des quantités extraordinairement élevées de zinc. Ces espèces rencontrées sur des sols naturellement riches en éléments métalliques ont été utilisées comme indicateurs lors de prospections minières. A ce jour, 397 espèces accumulatrices de métaux divers ont ainsi été répertoriées (Salt *et al.*, 1998).

La tolérance aux métaux peut être assurée par plusieurs mécanismes différents, à savoir par une chélation ou précipitation avec des ligands à haute affinité, localisés sur la paroi cellulaire ou à l'intérieur du cytoplasme (formation de complexes avec des peptides, des acides organiques ou des ions inorganiques), par séquestration du métal dans la vacuole des cellules foliaires ou des trichomes, ou par exclusion ou excrétion active du métal (Lindberg et Greger, 2002).

1.3. Comportement des métaux lourds dans la plante

Parmi l'ensemble des métaux lourds, une vingtaine d'entre eux sont indispensables aux processus physiologiques majeurs, en particulier la respiration, la photosynthèse ou l'assimilation des macronutriments (azote, soufre...) (Kabata-Pendias et Pendias, 2001). En outre, certains éléments traces peuvent se présenter sous différents états d'oxydation (Cu^{2+} , Cu^+). Ils jouent ainsi un rôle d'accepteurs ou de donneurs d'électrons, très important dans les multiples systèmes enzymatiques mettant en jeu des réactions d'oxydoréduction (Chaignon, 2001).

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

1.3.1. Absorption racinaire

La voie principale d'absorption des métaux se fait par simple diffusion au travers de l'apoplaste du cortex racinaire et de l'endoderme (voie apoplastique). Le transport des éléments métalliques à travers la paroi cellulaire se fait passivement (non métabolique et donc dans le sens du gradient de concentration) par les pores du réseau de la cellulose, de l'hémicellulose et des glycoprotéines (Briat et Lebrun, 1999). Puis au niveau de l'endoderme, le transport peut devenir actif au niveau de la membrane plasmique des cellules de la bande de Caspary (voie symplastique), autorisant cette fois un transfert contre le gradient de concentration, tel que le zinc et le cuivre qui sont absorbés activement par une protéine de transport sélective, nécessitant de l'énergie (Kabata-Pendias et Pendias, 2001).

Cependant, les mécanismes exacts de l'absorption sont encore mal connus, en particulier pour certains éléments comme le Cu (Greger, 1999 ; Chaignon, 2001), et différents selon l'espèce métallique.

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

1.3.2. Translocation

Après l'absorption des éléments métalliques, le transport dans le xylème de la plante vers les parties aériennes est appelé «translocation». Ceci peut nécessiter ou non la prise en charge des éléments par des agents complexant, tels que les acides organiques, les

acides aminés et divers peptides, le fer est pris en charge par le citrate; le zinc peut être transporté par un complexe anionique (Alloway, 1995); alors que le cadmium est transporté sous forme libre (Greger, 1999).

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

1.3.3. Accumulation

Ainsi, plus de 400 espèces hyper accumulatrices sont recensées, dont plus de 300 pour le nickel et seulement une pour le cadmium. A part une possible résistance à la sécheresse et aux herbivores (Boyd, 1998), il est encore impossible d'attribuer ce phénomène à un avantage sélectif quelconque. Dans la cellule, les métaux ayant pénétré dans le cytoplasme sont pris en charge par diverses molécules afin de les stocker pour éviter tout dommage cellulaire.

2. Métaux lourds : Cas du Cadmium et du Zinc

2.1. Cadmium

Le cadmium est un élément métallique non-biodégradable et cumulatif pouvant altérer divers niveaux trophiques en milieu aquatique (Sorensen, 1991). Cependant, il est hautement réactif engendrant la formation des Espèces Réactives de l'Oxygène (ERO) conduisant au développement d'un stress oxydatif (Siedlecka et Krupa, 2002).

Le cadmium est un élément non essentiel à l'organisme (Lane et Morel, 2000); naturellement présent dans l'environnement sous forme de traces (Fassett, 1974 ; Rosenthal et Sperling, 1974). C'est un élément très toxique (Buhler, 1972). Il présente des caractéristiques chimiques proches de celles du calcium, facilitant ainsi sa pénétration dans les organismes vivants (Borchardt, 1985).

En revanche, ses propriétés physiques et chimiques, proches de celles du zinc et du calcium, lui permettent de traverser les barrières biologiques et de s'accumuler dans les tissus (Zorrig, 2009). Le cadmium n'est pas très abondant dans la croûte terrestre. Les processus naturels d'érosion et d'altération de la roche mère, ainsi que le transport par les fleuves et dans l'air des particules contribuent au cycle naturel du cadmium.

Les activités anthropiques contribuent depuis la moitié du 20^{ème} siècle à augmenter les teneurs en Cd dans les sols, et les principales sources de contamination sont les pratiques agricoles (utilisation excessive des produits phytosanitaires qui peuvent contenir plusieurs métaux toxiques comme Cu, Cd, Zn et Pb et donc contribuent à la contamination des terres agricoles (He *et al.*, 2005a).

En Algérie, le cadmium est très répandu dans les phosphates naturels qui contiennent plus de 13 mg /Kg (Van Kauwenbergh, 1997 ; BejiSassi *et al.*, 1999). Outre leur richesse en matière organique pouvant constituer un apport intéressant en éléments essentiels (N, P et K) pour les sols, les boues d'épuration et les composts des déchets urbains et industriels renferment du cadmium à des niveaux parfois élevés. L'utilisation de ces engrais insuffisamment purs en agriculture est une des causes de la pollution des sols par le cadmium (McBride, 2004).

2.1.1. Effets du cadmium sur la physiologie des plantes

Chez les plantes, le cadmium n'a aucune fonction biologique connue (Pokorny *et al.*, 2004). Le cadmium induit une accumulation de composés phénoliques insolubles, comme la lignine dans les vaisseaux de xylème réduisant ainsi le transport ascendant de l'eau et des éléments nutritifs (Chaoui et El Ferjani, 2004). La fermeture stomatique est due essentiellement aux variations du potentiel de turgescence dans les cellules de garde. Elle se déclenche suite à une accumulation des ions Ca^{2+} dans le cytosol des cellules de garde (MacRobbie et Kurup, 2007). Le cadmium provoque également une réduction de la transpiration ainsi qu'une augmentation de la résistance stomatique accompagnée d'un accroissement de la teneur en acide abscissique (ABA) (Sharma *et al.*, 2002 ; Fediuc *et al.*, 2005).

Étant chimiquement semblables aux ions Ca^{2+} , les ions Cd^{2+} gagnent les cellules de garde par les canaux de Ca^{2+} tension-dépendants et, une fois dans le cytosol, ils imitent leur activité (Perfus-Barbeoch *et al.*, 2002) (Figure 02).

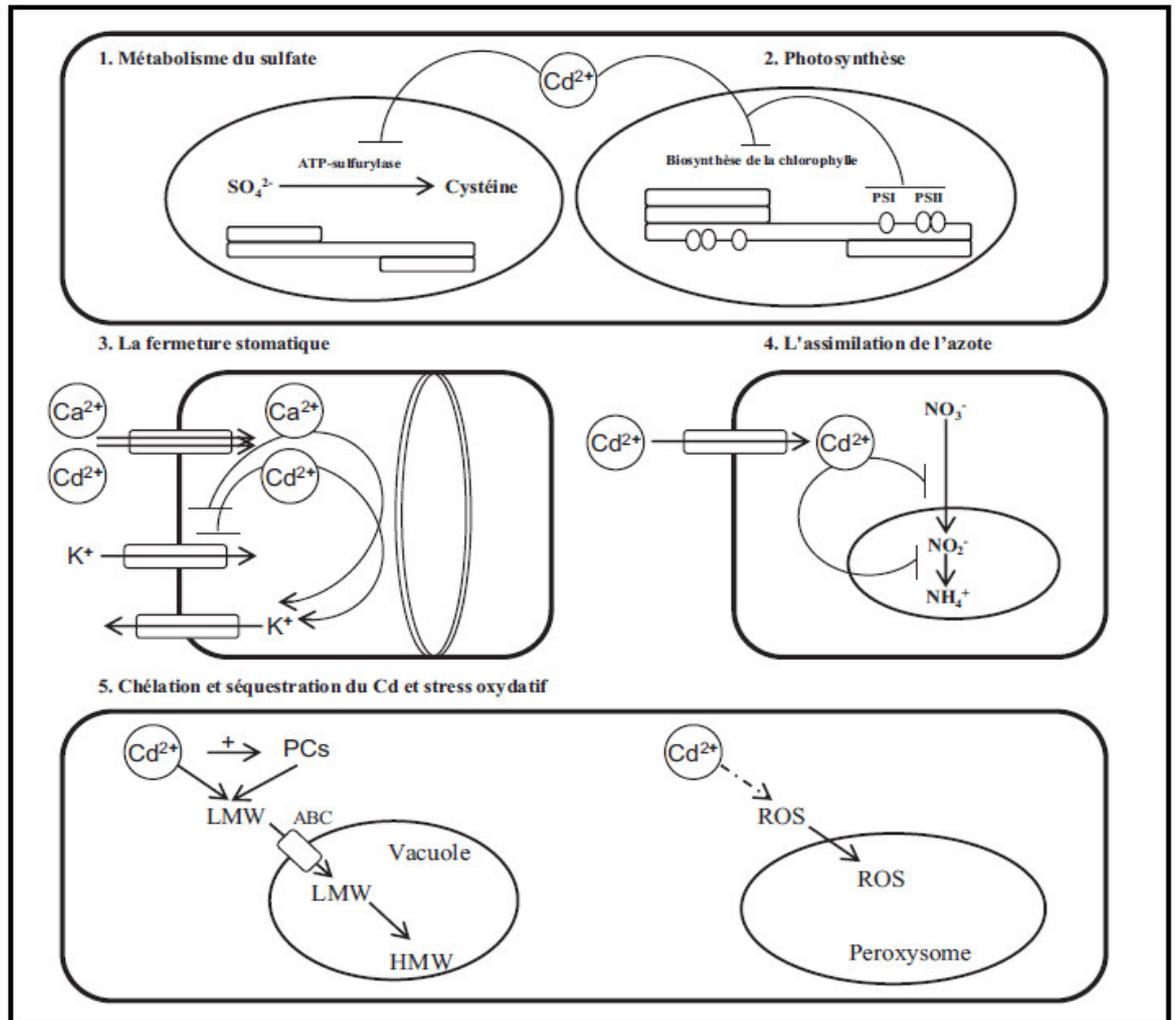


Figure 02 : Principaux effets du cadmium sur la physiologie des plantes et réponses des plantes au cadmium, (DalCorso *et al.*, 2008).

Après accumulation dans la cellule, le Cd inhibe le métabolisme du sulfate (1) la photosynthèse et la biosynthèse de chlorophylle (2). Étant chimiquement semblables au Ca^{2+} , les ions Cd^{2+} gagnent les cellules de garde et activent l'ouverture des canaux potassiques. L'entrée des ions potassium provoque la perte de la turgescence des cellules de garde ce qui déclenche la fermeture stomatique (3). Le Cd inhibe l'activité des enzymes racinaires impliquées dans l'assimilation de l'azote: par exemple la nitrate

réductase et la nitrite réductase (4). (5) Une fois dans le cytosol, le Cd stimule la synthèse des phytochélatines (PCs).

Le cadmium forme avec les phytochélatines des complexes de faible masse moléculaire (Low Molecular Weight (LMW)). Ces complexes entrent dans la vacuole par l'intermédiaire d'un transporteur tonoplastique du type ABC et s'agrègent les uns aux autres pour former des complexes de masse moléculaire élevée (High Molecular Weight (HMW)). A droite, le Cd induit la production de radicaux libres qui sont des formes très réactives de l'oxygène (ROS : Reactive Oxygen Species) qui seront désintoxiquées dans les peroxysomes.

PSI: photosystème I, PSII: photosystème II, ROS: formes réactives de l'oxygène.

2.2. Zinc

Le zinc est un élément chimique, de symbole Zn et de numéro atomique 30. Le zinc est un métal, moyennement réactif, qui se combine avec l'oxygène et d'autres non-métaux, et qui réagit avec des acides dilués en dégageant de l'hydrogène (Mahan, 1987). L'état d'oxydation unique du zinc est +2 (appelé ion zincique), ainsi la géochimie du zinc est relativement peu complexe et l'on note un comportement chalcophile assez marqué par une association fréquente avec le soufre (S, Mahan, 1987).

Les sources naturelles de zinc dans l'environnement sont l'altération de roches (56%), le volcanisme (22%) et la végétation (Lantzy et Mc Kenzie, 1979 ; Phelan *et al.*, 1982 ; Horowitz, 1985). Cependant, Nriagu (1991 ; 1996) a calculé que ces sources naturelles ne représentent qu'environ 7% des émissions totales de cet élément dans l'environnement, étant donné que la production et le traitement de minerai et les activités industrielles représenteraient 75% et 18% respectivement, des émissions du Zn dans le milieu naturel.

Les apports anthropogénique résultent de trois groupes d'activités: les sources Minières et industrielles (traitement du minerai, galvanisation, matières plastiques...), les épandages agricoles (ajout dans les aliments pour animaux, surtout des porcs) et les

autres activités telles que le trafic routier, l'érosion des toitures zinguées, l'usure des pneumatiques et les poussières d'incinération (INERIS, 2000).

Le zinc possède deux états de valence : Zn(0) et Zn(II) (Cotton, 1962). Son état d'oxydation courant est +2, donnant un cation de taille comparable à celle de Mg²⁺. Le zinc possède cinq isotopes stables (Holden, 1994).

2.2.1. Chélation du zinc dans la cellule

Si l'absorption du zinc est assez bien décrite dans les plantes, peu de données sont en revanche disponibles concernant son stockage dans les cellules. Or, un mécanisme récurrent de détoxification des métaux lourds au sein de la cellule (aussi bien chez les plantes que dans d'autres organismes) repose sur la fixation du métal à un ligand (chélation) puis éventuellement à la neutralisation de ce complexe par compartimentation (séquestration) grâce à un transporteur spécifique (Briat and Lebrun, 1999).

Quatre types de ligands de cations métalliques sont connus chez les plantes : les métallothionéines, les phytochélatines, les acides aminés et organiques (Rauser, 1999; Clemens, 2001).

Bien que les phytochélatine jouent un rôle majeur dans la détoxification du cadmium (Cobbett, 2000; Cobbett et Goldsbrough, 2002), il n'a pas été montré à ce jour qu'elles interviennent dans la détoxification du zinc.

3. Le stress oxydant

Le stress oxydant se définit comme étant un déséquilibre de la balance entre les systèmes oxydants et les capacités anti-oxydantes de l'organisme en faveur des premiers, ce qui conduit à des dommages cellulaires irréversibles (Pincemail *et al.*, 1999).

Les facteurs de stress d'origine environnementale peuvent induire des changements au niveau génétique, biochimique et physiologique chez les espèces exposées. Pour se protéger contre le stress oxydant, elles possèdent plusieurs systèmes de défenses. Les premières barrières sont mises en place au niveau de l'organisme entier et constituent des protections physiques contre la pénétration des xénobiotiques. Si ces défenses s'avèrent inefficaces, d'autres systèmes se mettent en place, comme le système antioxydant, pour protéger les organes et les cellules contre les attaques d'Espèces Réactives de l'Oxygène (ERO) générées à la suite d'un stress oxydant (Bigot, 2009).

La production des radicaux libres de l'oxygène est physiologique et nécessaire à de nombreux métabolismes. Seul leur excès devient néfaste d'autant que s'y ajoutent-les radicaux libres d'origine exogène liés à l'environnement (rayonnement UV, ozone...) (Cossu *et al.*, 1997a). Les radicaux libres en particulier les radicaux hydroxyyles, entraînent alors la peroxydation des acides gras polyinsaturés (Gutteridge et Halliwell, 1990) provoquant une désorganisation membranaire pouvant aboutir à la lyse cellulaire.

Les hydroperoxydes lipidiques formés sont dégradés principalement en malonedialdéhyde (MDA) (Chaudhary *et al.*, 1996) et 4-hydroxynonéal (4-HNE) (Chen et Chung, 1996), qui réagissent de manière covalente avec les protéines et les inactivent.

L'étendue des dommages dépend de l'équilibre entre la production de radicaux libres et l'efficacité des mécanismes de détoxification. Ces dommages amorcent une cascade de réactions qui peuvent être à l'origine de dysfonctionnements à des niveaux d'organisation biologique supérieurs (Cajaraville *et al.*, 2003) (Figure 03).

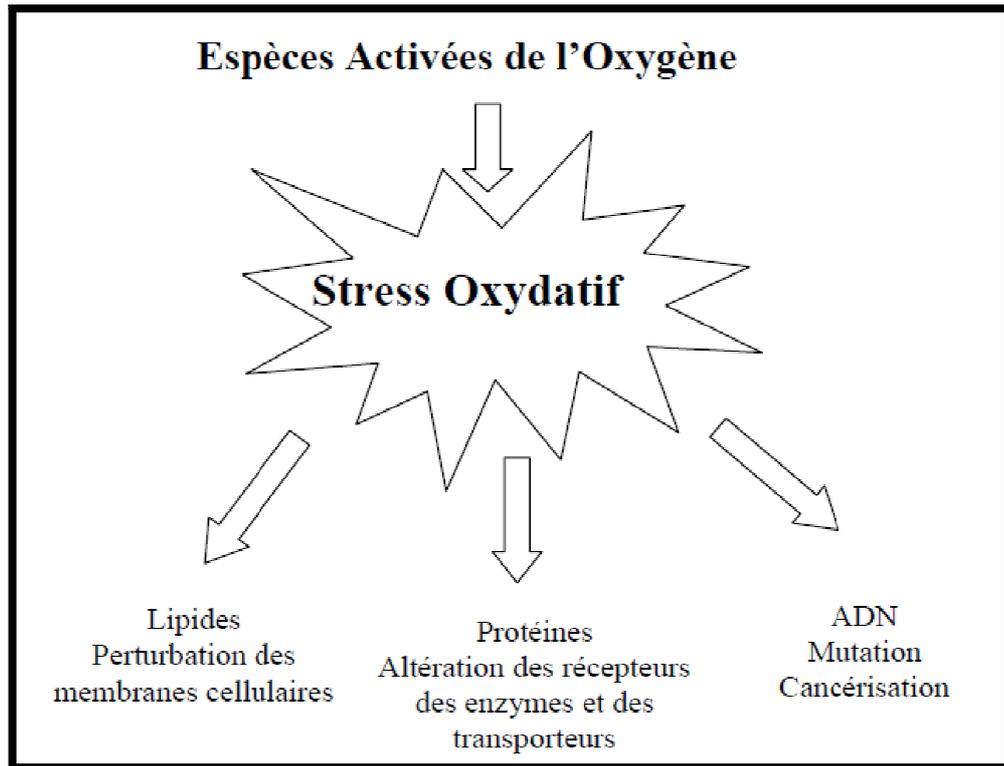


Figure 03 : Mécanismes des lésions biochimiques induites par le stress oxydant. (Sergent *et al* ; 2000)

3.1. Les systèmes de défenses antioxydants

Les systèmes de défense contre le stress oxydatif ont un rôle central dans la détoxification des xénobiotiques ayant pénétrés dans la cellule. Les antioxydants primaires, qui sont pour la plupart des enzymes, vont limiter la production des Espèces Réactives de l'Oxygène (ERO) et les antioxydants secondaires, qui peuvent être des substances lipo- ou hydrosolubles, vont piéger les ERO sous une forme peu réactive (Zielinski et Portner, 2000).

L'augmentation de la production de ERO peut induire ou inhiber l'activité et la synthèse de ces composés antioxydants dont l'étude donne une indication sensible de la présence de contaminants générateurs d'un tel stress en milieu contrôlé et naturel (McFarland *et al.*, 1999 ; Lopes *et al.*, 2001). Il est donc important de bien comprendre d'une part les événements conduisant à un stress oxydant et d'autre part de définir les paramètres les plus discriminants comme biomarqueurs impliqués dans la réponse à ce stress pour fournir un diagnostic plus réaliste de l'impact de la pollution sur les organismes qui peuplent les écosystèmes.

Un biomarqueur peut être défini comme "un paramètre moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique ou comportemental dont les changements, observables et/ou mesurables, révèlent l'exposition présente ou passée d'un individu à au moins une substance chimique à caractère « toxique » (Lagadic *et al.*, 1997). Les expérimentations en conditions contrôlées ont largement démontré que les biomarqueurs peuvent être utilisés pour évaluer l'exposition des individus à des xénobiotiques et, dans certains cas, les effets de ceux-ci sur les structures et fonctions vitales de l'organisme (Huggett *et al.*, 1992).

Ces bases expérimentales ont permis d'envisager l'utilisation des biomarqueurs dans le milieu naturel, notamment dans le cadre des programmes de surveillance de la qualité de l'environnement (McCarthy et Shugart, 1990; Peakall, 1992).

Chez les êtres vivants, les systèmes antioxydants contribuent à éliminer le stress causé par les ERO. Les enzymes impliquées dans ces mécanismes de protection sont les suivantes :

3.1.1. Systèmes enzymatiques

- Super Oxyde Dismutase (SOD) qui assure la première ligne de défense contre le stress oxydant (McCord et Fridovich, 1969; Nordberg et Arnér, 2001).
- La Catalase (CAT) qui catalyse la transformation du peroxyde d'hydrogène en eau et oxygène moléculaire (Arora *et al.*, 2002).
- La Glutathion Peroxydase (GPX) qui constitue l'un des plus importants systèmes enzymatiques de protection par son pouvoir de détoxifier le peroxyde d'hydrogène, et aussi les hydroperoxydes résultants de l'oxydation du cholestrol ou des acides gras en couplant la réduction de l'hydroperoxyde avec l'oxydation d'un substrat réducteur comme le glutathion. L'activité de ces enzymes est très dépendante de l'apport nutritionnel en sélénium (Favier, 2003).
- La Glutathion-S-Transférase (GST) fait partie d'une famille d'enzymes multifonctionnelles essentiellement cytosoliques, qui jouent un rôle important dans la détoxification de composés électrophiles. Elles sont aussi impliquées dans des opérations diverses de transports et de biosynthèses intracellulaires (George et Buchanan, 1990).

3.1.2. Systèmes non-enzymatiques

- Le glutathion, tri peptide dont les propriétés réductrices et nucléophiles jouent un rôle majeur dans la protection et la détoxification qui résulte principalement de sa fonction de cosubstrat des GPX et de la GSH-S Transférase (Januel, 2003). Mais il fait aussi l'objet d'interactions synergiques avec d'autres composants du système de protection antioxydant tel que la vitamine C, la vitamine E et les Superoxydes Dismutases.

- Les Malonedialdéhydes (MDA) agents alkylants puissants capables de réagir avec les macromolécules biologiques. Ce sont des produits terminaux de la dégradation des lipides dont la teneur est en relation étroite avec la dégradation de la membrane cellulaire. Ce paramètre constitue un indicateur précoce d'une agression toxique et par conséquent il peut être utilisé comme biomarqueur du stress oxydatif (Giguère *et al.*, 2003; Funes *et al.*, 2005).

Ainsi, les dommages oxydatifs résultent du déséquilibre entre la production d'ERO et leur élimination par les organismes. Les ERO peuvent ainsi causer des dommages permanents ou transitoires aux protéines, lipides et acides nucléiques.

En réponse à ces dommages, divers composés qualifiés d'antioxydants sont synthétisés au niveau cellulaire ; ces molécules sont utilisées comme biomarqueurs de stress oxydant. Dans les écosystèmes aquatiques, la source majeure d'ERO, provient de molécules organiques (HAP) libérées par des huiles et carburants (fuel...) (Roy *et al.*, 1994).

3.2. Implication des mitochondries dans le stress oxydatif des ROS

En plus de son rôle capital dans la synthèse d'ATP, la chaîne respiratoire mitochondriale est une source puissante d'ERO et de ce fait elle est impliquée dans la genèse de la plupart des pathologies humaines et animales. Il est estimé que dans les

conditions normales 1-4% de l'oxygène consommé est incomplètement réduit en superoxyde (Morin *et al.*, 2004, Andreyev *et al.*, 2005).

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

4. La phytoremédiation

4.1. Principe de la technique de phytoremédiation

Connue sous le nom de phytoremédiation «phyto» = plante et «remedium» = rétablissement de l'équilibre, remédiation, la phytoremédiation est définie comme l'utilisation de plantes pour extraire ou transformer les polluants organiques et aussi inorganiques (plus particulièrement les métaux lourds) (Salt *et al.*, 1998).

La phytoremédiation est une technologie émergente qui utilise les plantes ou les microorganismes de la rhizosphère pour extraire, transformer ou stocker les polluants contenus dans les sols, les sédiments, les eaux souterraines ou de surface et même l'atmosphère (Susarla *et al.*, 2002).

4.2. Mécanismes de phytoremédiation

Les aspects technologiques d'efficacité, de coût du traitement et les aspects économiques sont abordés. Plus précisément, les types de stratégies de phytoremédiation, particulièrement utilisés dans la dépollution des métaux lourds sont décrits ci-dessous et illustrés dans la Figure 04 :

- ✓ **Phytostimulation** : Les plantes sécrètent des exsudats racinaires qui peuvent être utilisés par les communautés microbiennes et promouvoir leur

développement et leurs activités. Cette stimulation microbienne dans la rhizosphère modifie la bioaccumulation, oxydation/réduction biologique et biométhylation des métaux lourds (McGrath, 1998).

- ✓ **Phytostabilisation** : Utilisation des plantes pour réduire la biodisponibilité des polluants par les écoulements (latéraux ou en profondeur) ou immobiliser les composés polluants en les liants chimiquement par précipitation, stabilisation, absorption ou piégeage de ceux-ci par la plante. Cette technique permet d'éviter la dispersion des polluants dans les eaux de surface et souterraines (Cunningham *et al.*, 1995).

- ✓ **Phytoextraction** : Utilisation de plantes qui absorbent les métaux lourds dans les sols par les racines, puis transfèrent et accumulent ceux-ci dans leurs parties récoltables (feuilles, tiges et racines). Les métaux lourds vont se complexer avec des acides organiques ou des acides aminés synthétisés par la plante. Les métaux lourds sont ensuite récupérés en incinérant ou compostant la biomasse de plante (McGrath, 1998).

- ✓ **Phytovolatilisation** : Utilisation de plantes qui absorbent des contaminants organiques et autres produits toxiques, transformant ceux-ci en éléments volatiles peu ou pas toxiques et les relâchant dans l'atmosphère via leurs feuilles (McGrath, 1998).

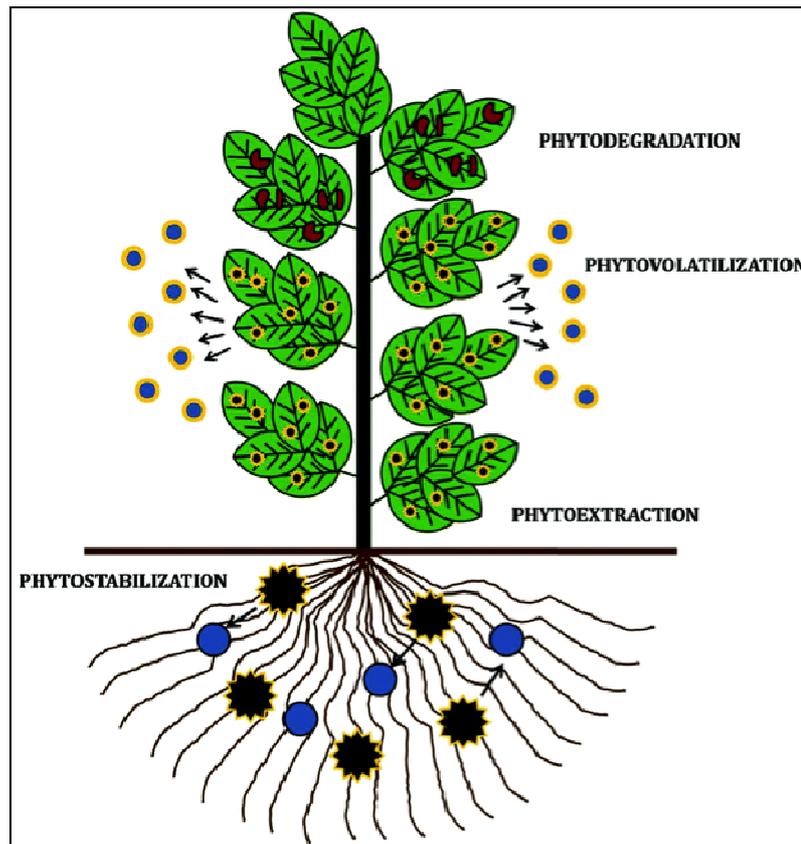


Figure 04 : Les différents types de phytoremédiation (Rusty D *et al.*, 2014)

Au cours de l'évolution, les plantes ont développé des mécanismes complexes pour absorber les substances organiques ou minérales du sol, de l'eau et de l'air à travers leurs racines et leurs feuilles, lesquelles sont ensuite transportées dans d'autres parties de la plante pour être utilisées, transformées, dégradées ou stockées (Cunningham *et al.*, 1996; Polessp, 2005).

4.3. Le potentiel épuratoire des plantes aquatiques

La capacité des plantes à diminuer la turbidité, la pollution par les matières organiques et les éléments nutritifs de 50 à plus de 80 % est maintenant bien reconnue (Ran *et al.*, 2004). Elles ont également une forte capacité de prélèvement des métaux avec des rendements élevés : le plomb (76 %), le nickel (82 %), le fer (79 %), le zinc (98 %), le manganèse (95 %), le chrome (97 %), le mercure et le cuivre (90 %) (Axtell *et al.*, 2003; Maury-Brachet *et al.*, 1990; Miretzky *et al.*, 2004).

Les végétaux aquatiques ont montré leur efficacité dans l'élimination de polluants organiques comme les phénols, les composés organochlorés et organophosphorés, les chlorobenzènes, et même les pesticides (Dhir *et al.*, 2009).

Concernant ces derniers, les rendements d'épuration à l'aide de plantes aquatiques sont variables, de 20 à 95 %, selon les propriétés physico-chimiques des molécules et le type de plantes (Rice *et al.*, 1997 ; Gao *et al.*, 2000 ; Mitsou *et al.*, 2006 ; Tront et Saunders, 2006 ; De Carvalho *et al.*, 2007 ; Cai *et al.*, 2007).

5. Le stress chez les végétaux aquatiques

Le stress peut être défini comme l'ensemble des réactions non spécifiques (Physiologiques, métaboliques, comportementales) à un agent physique et/ou chimique agressif, il peut provenir de manière directe ou indirecte des pollutions organiques ou métalliques répétées notamment les pollutions chroniques (Claudine, 2003).

En effet, le stress engendre généralement des effets non détectables morphologiquement ainsi que des effets visibles :

- Les premiers effets correspondent à des réponses biochimiques, telles que l'induction d'enzymes de métabolisation ou des réponses physiologiques comme des altérations de la photosynthèse, de la respiration, des transports d'ions ou de métabolites. Ils peuvent être détectables très tôt, on parle alors de réponses précoces.
- Les effets visibles, tels que des changements de coloration, des lésions cellulaires résultant d'un ensemble de perturbations métaboliques sont considérés comme des réponses secondaires à plus ou moins long terme (Claudine, 2003).

6. Objectif du travail

Un polluant qui entre dans un écosystème va se distribuer et s'accumuler préférentiellement dans un des trois compartiments environnementaux. Le polluant va ensuite pouvoir être en contact et éventuellement disponible pour les organismes et donc bio accumulé. A partir de cette exposition, un enchaînement de réponses sera observable à tous les niveaux de l'organisation biologique.

Les métaux sont omniprésents dans les eaux de surface, toutefois leurs concentrations sont en général très faibles ce qui explique leur dénomination de « métaux traces » ou « Éléments traces métalliques » ETM.

L'*Elodea canadensis* constitue un excellent modèle expérimental alternatif à toutes les caractéristiques suivantes (Chaudhry et al., 2002) :

- Hypertolérante aux concentrations en polluants
- Hyperaccumulatrice
- Un système foliaire et racinaire développé
- Activité photosynthétique intense
- Un transport et un stockage à taux élevé
- Mécanismes internes de métabolisation des polluants

Notre travail de recherche a pour objectif d'évaluer la toxicité et l'impact des deux xénobiotiques « le cadmium et le zinc » sur l'évolution et le métabolisme respiratoire et photosynthétique de « *Elodea canadensis* ».

Notre travail est structuré en 3 chapitres:

- Le premier chapitre est une synthèse bibliographique présentant, les métaux lourds (Cadmium et Zinc) leurs effets sur les plantes et les outils d'évaluation écotoxicologique en particulier les biomarqueurs.

- Le deuxième chapitre concerne le matériel et les méthodes d'études utilisées pour la réalisation de ce travail (présentation du matériel biologique et chimique utilisé pour cette étude) et les paramètres mesurés.
- Le troisième chapitre englobe les différents résultats obtenus et leur discussion.
- Enfin, nous terminerons ce travail par une conclusion générale et des perspectives.

Nos expérimentations se sont déroulées au laboratoire de Toxicologie Cellulaire de l'Université de Annaba pendant une période de 07 et 14 jours.

1. Matériel expérimental

1.1. Matériel biologique

Le matériel biologique utilisé dans notre étude est constituée par un végétal : l'élodée du Canada ou "*Elodea canadensis*". Les élodées appartiennent au genre de plantes aquatiques Dicotylédones de la famille des Hydrocharidacées originaires d'Amérique du Nord. Elles sont largement utilisées pour garnir les aquariums. Au cours de la deuxième moitié du XIXème siècle, l'élodée du Canada a rapidement colonisé les réseaux hydrographiques d'une grande partie de l'Europe, elle était considérée comme la principale « peste aquatique », voire comme un « fléau pour les cours d'eau ».

Au cours du XXème siècle, cette plante s'est intégrée aux « phytocénoses aquatiques » (Tiphaine Saint –Maxent, 2002).



Figure 05 : *Elodea Canadensis* (LTC. UBMA)

1.1.1. Classification

Tableau 02 : Classification de l'élodée de canada (Michaux, 1803).

<u>Règne</u>	<u>Plantae</u>	Plante
Embranchement	<i>Magnoliophyta</i>	Angiospermes
Classe	<i>Liliopsida</i>	Monocotylédones
Sous-classe	<i>Alismatidae</i>	Alismatidées
Ordre	<i>Hydrocharitales</i>	Hydrocharitales
Famille	<i>Hydrocharitaceae</i>	Hydrocharitacées
Genre	<i>Elodea</i>	Elodée
Espèce	<i>canadensis</i>	Du canada

1.1.2. Description

1.1.2.1. Morphologie externe : Les élodées sont des macrophytes vivaces à tiges ramifiées, pouvant atteindre 1 mètre de longueur (Tiphaine Saint –Maxent, 2002).

- **Les feuilles :** Elles sont sessiles vertes sombres, verticillées par 3-4 (plus rarement par 2), leur largeur est majoritairement supérieure à 1,75 mm et leur longueur comprise entre 6 et 15mm. Les feuilles supérieures et moyennes sont rigides et non arquées. Le limbe est ovale à linéaire oblong et muni de bords droits décorés de chaque côté de 21 à 30 dents (Pieret et Delbart, 2007).

- **Les fleurs :** Elles sont unisexuées, composées d'un calice à trois sépales légèrement violacés et d'une corolle à 3 pétales légèrement violacés (symétrie radiaire). Ces pétales ont une longueur inférieure à 5 mm. Les fleurs femelles sont solitaires dans une spathe. Les fleurs mâles, rares voire inexistantes en Europe, sont groupées dans une spathe et possèdent 3 (-6-9-...) étamines. La période de floraison se situe entre les mois de juin et d'août (Pieret et Delbart, 2007).
- **La tige :** La Tige est fortement ramifiée, est facilement cassante (Pieret et Delbart, 2007).
- **Les fruits :** Elles sont sous forme de capsules issues de 2 à 15 carpelles soudés entre eux, présentant généralement 6 loges et produisant 1 à 5 graines (Pieret et Delbart, 2007).
- **Les Racines :** Elles se présentent sous forme d'Amas de racines adventives fibreuses partant de la jonction des feuilles. Leur apex est blanchâtre à verdâtre (Pieret et Delbart, 2007).

1.1.3. Répartition

Les élodées sont des plantes répandues dans toutes les zones tempérées d'Amérique du Nord. Elles se sont largement naturalisées en Europe, en Afrique, en Asie, et en Australasie (Toussaint, 2005).

Les sédiments limoneux et les eaux riches en éléments nutritifs favorisent la croissance des élodées dans les lacs fertiles. Toutefois, ces plantes sont capables de s'adapter à diverses conditions écologiques, des eaux profondes aux étangs peu profonds, et à différents types de sédiments.

On observe ces plantes dans les eaux stagnantes, méso-eutrophes à eutrophes des étangs, mares, canaux, fossés et rivières, elles sont assez répandues dans la plupart des plaines alluviales et maritimes (Toussaint, 2005).

Les élodées se rencontrent dans des milieux de faible profondeur (inférieure à 1 m) (Tiphaine Saint –Maxent, 2002) ; et peuvent prospérer dans des eaux calmes ou à courant faibles, chaudes, riches en éléments nutritifs dont la profondeur n'excède pas 6 à 8m (lacs et étangs) (Kowarik, 2003 et Muller, 2004).

1.1.4. Reproduction

Il s'agit de plantes dioïques, à sexes séparés. Deux modes de reproduction peuvent être décrits :

1.1.4.1. Reproduction sexuée : La reproduction sexuée des élodées est quasiment inexistante. En effet, seuls des pieds femelles sont présents. « *Elodea canadensis* » fleurit rarement, de juin à août, et ses fleurs femelles sont petites, de 2,5 à 7 mm de diamètre, produites sous l'eau et venant affleuré en surface au sommet de très longs pédicelles. Les pétales sont blanchâtres, blancs verdâtres ou lilas (Tiphaine Saint –Maxent, 2002).

1.1.4.2. Reproduction asexuée (végétative) : La reproduction végétative chez les élodées est prédominante, ces plantes se reproduisent essentiellement de manière végétative par fragmentation et bouturage des tiges grâce au développement de racines adventives (Tiphaine Saint –Maxent, 2002).

Elles produisent en outre des hibernacles, bourgeons spécialisés, permettant d'assurer la survie de la plante en hiver et en même temps sa multiplication (Toussaint, 2005). Ainsi pour l'élodée du Canada, il y a formation de bourgeons dormants qui sont les bourgeons apicaux. Pendant l'automne, les extrémités des tiges latérales cessent de s'allonger et portent des feuilles vertes foncées, densément groupées, qui contiennent plus d'amidon que les feuilles normales, et possèdent une cuticule plus épaisse.

Ces bourgeons peuvent être libérés par désagrégation de l'axe parent et plonger dans le substrat, ou rester fixés durant l'hiver. Si l'hiver est doux, il se développe tôt dans la saison, sinon ils resteront dormants jusqu'au printemps où ils formeront un nouveau plant (Tiphaine Saint –Maxent, 2002). A l'automne, des fragments de tiges feuillées se détachent des plantes mères, et entraînés par le courant vont s'enraciner plus loin et font naître de nouveaux plants.

La voie végétative est le mode de reproduction le plus important de ces plantes, la reproduction par graine ne jouant qu'un rôle mineur.

1.1.5. Caractéristiques spéciales des élodées

Les élodées possèdent des caractéristiques très importantes ce qui l'offre un intérêt remarquable, mise à part leur caractère invasif, on cite :

- Elles peuvent résister à la mauvaise saison et se comporter comme des plantes vivaces dans les climats plus doux.
- Les élodées sont un élément important des écosystèmes lacustres en Amérique du Nord, fournissant un habitat à de nombreux invertébrés aquatiques et un couvert (abri) pour des jeunes poissons et autres Amphibiens.
- La faune aquatique, particulièrement les canards, mais aussi les castors et les rats musqués en font leur nourriture.
- Les herbiers d'élodées favorisent la reproduction et le développement des insectes et/ou des poissons en servant soit de support aux œufs, soit de garde-manger, soit d'abri pour les plus petits (Prévost, 2001).
- Les élodées sont un matériel d'étude apprécié en physiologie végétale pour leur simplicité, les cellules des feuilles sont connues pour les mouvements de cyclose (courants cytoplasmiques intracellulaires) observables sur le vif, ainsi que leur facilité d'observation au microscope.
- Elles sont très utiles pour traiter l'eau, et dépolluer l'eau des bassins.
- Les élodées ont un certain intérêt économique en tant que plantes d'aquarium.
- C'était une plante médicinale pour les Iroquois.

1.1.6. Impacts négatifs des élodées

Les élodées suite à leurs importantes capacités de reproduction végétative forment rapidement des populations très denses sur plusieurs mètres de profondeur (Pieret et Delbart, 2009). Ces massifs induisent une altération rapide du milieu aquatique aussi bien physico-chimique que biotique (Toussaint, 2005).

Ainsi, l'interception des rayons lumineux incidents à la surface de l'eau est fortement réduite (Pieret et Delbart, 2009).

- La présence de l'espèce induit rapidement un monospécifisme du milieu (Pieret et Delbart, 2009).
- La densité des populations formées bloque aussi la diffusion de l'oxygène de l'air causant des conditions anaérobiques du milieu, préjudiciables pour la macrofaune et la microfaune aquatiques (Pieret et Delbart, 2009).
- Elle provoque également une accélération de la sédimentation des matières organiques et donc l'eutrophisation. Un envasement des milieux peut ensuite être observé (Pieret et Delbart, 2009).
- Les élodées peuvent causer une réduction de l'écoulement de l'eau, ainsi que la réduction de la valeur récréative des plans d'eau (Pieret et Delbart, 2009).
- Les proliférations de populations mono-spécifiques des différentes espèces d'élodées peuvent entraîner des dysfonctionnements des milieux aquatiques, telles les anoxies périodiques (Tiphaine Saint –Maxent, 2002).
- Les herbiers d'élodées peuvent également être une gêne physique pour la pêche : les hameçons et les fils s'emmêlant dans les tiges de plantes. Cependant aucune référence ne signale ce type de problèmes (Tiphaine Saint –Maxent, 2002).

1.2. Matériel chimique

Les produits chimiques utilisés dans notre étude sont: Le chlorure de Cadmium (CdCl_2) et le Zinc (Zn). Cinq concentrations ont été choisies à savoir : $10\mu\text{M}$, $20\mu\text{M}$, $40\mu\text{M}$, $80\mu\text{M}$ et $160\mu\text{M}$. (les tests sont répétés trois fois et les résultats obtenus sont exprimés par la moyenne).

2. Conduite de l'essai et traitements

Après plusieurs rinçages à l'eau distillée, les plants d'élodée (*Elodea canadensis*) sont pesés, puis leur croissance est suivie dans des milieux de culture dans des béciers contenant 300 ml de solution nutritive de base (eau minérale « youkou », $\text{pH} = 7,4$) composée de : $67.32 \text{ mg/l Ca}^{+2}$, $10.08 \text{ mg/l Mg}^{+2}$, 4.82 mg/l K^+ , $11.96 \text{ mg/l Na}^{+2}$, $27.36 \text{ mg/l So}_4^{-2}$, 20.82 mg/l Cl^- , $216.07 \text{ mg/l HCO}^{-3}$, 2.5 mg/l NO_3 , 00 mg/l NO^{-2} , 2.33 mg/l Si_2 . Le CdCl_2 et le Zinc sont additionnés directement dans les béciers.

3. Paramètres mesurés

3.1. La croissance pondérale : Ce paramètre est mesuré à l'aide d'une balance de précision. Cette mesure a lieu à T_0 = avant application du traitement), à 7 jours et 14 jours de traitement.

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

3.3. Dosage des chlorophylles : L'extraction des chlorophylles est effectuée selon la méthode de Holden (1975), qui consiste en une macération du végétal dans de l'acétone. Le traitement des échantillons se fait comme suit : on pèse 1g des feuilles du végétal coupé en petits morceaux et broyées dans un mortier avec 20ml d'acétone à 80% et environ 100mg de bicarbonate de calcium (CaCO_3). Après le broyage total, la solution est ensuite filtrée et mise dans des boîtes noires afin d'éviter l'oxydation des chlorophylles par la lumière. La lecture se fait aux deux longueurs d'onde 645nm et 663nm, après étalonnage.

3.4. Dosage de la proline : La technique de mesure de la proline utilisée est celle de Troll et Lindsley (1955), modifiée par Dreier et *al.*, (1974). Pour chaque échantillon, prélever 100 mg de matière végétale fraîche, pesée juste après leur prélèvement, introduite ensuite dans des tubes à essai propres auxquels sont ajoutés 2ml de méthanol 40%. L'ensemble est porté à 85°C dans un bain marie pendant une heure. Après refroidissement on prélève 1ml de la solution, auquel on ajoute 1ml d'acide acétique (CH_3COOH) et 1ml de mélange contenant (120 ml d'eau distillée + 300 ml d'acide acétique + 80 ml d'acide orthophosphorique) et 25 mg de ninhydrine. Les solutions sont portées à ébullition pendant 30 mn, elles virent au rouge ; après refroidissement, on ajoute 5 ml de toluène, et on procède à une agitation, deux phases se séparent : une phase inférieure sans proline et une phase supérieure qui contient la proline. Cette phase est ensuite récupérée et déshydratée par l'adjonction de Na_2SO_4 . On procède enfin à la détermination des densités optiques des échantillons à la longueur d'onde 528 nm, après étalonnage par mélange (acide acétique, eau distillée, acide orthophosphorique et ninhydrine).

3.5. Dosage des Biomarqueurs

3.5.1. Dosages Enzymatiques

3.5.1.1. Préparation de l'extrait enzymatique : La méthode utilisée afin d'obtenir l'extrait enzymatique des plants d'élodée est celle de Loggini et *al.*, (1999). L'extrait sera utilisé pour la mesure de l'activité du Glutathion transférase (GST). Après 7 et 14 jours de traitement, les feuilles (500mg) sont récupérées de leurs milieux de culture, puis broyées dans un mortier à froid avec 4 ml de tampon phosphate à 0.1 M et pH=7,5. L'homogénat obtenu est ensuite filtré à l'aide d'une toile et récupéré dans des tubes Ependorfs avant de procéder à une centrifugation à froid à 12000 g/min pendant 20min (Centrifugeuse Sigma 3-16K). Le surnageant sera utilisé comme extrait pour la détermination des différentes activités enzymatiques. La formule suivante est utilisée dans la quantification des différentes activités enzymatiques entre autres l'activité GST, APX et CAT (Servais, 2004).

$$\text{Act} = \frac{\Delta A \cdot V_t}{\epsilon \cdot \Delta T \cdot L \cdot V_e \cdot P}$$

Act: Activité enzymatique en nmole/min/mg de protéines

ϵ : Coefficient d'extinction linéique molaire (M)

ΔA : Différence moyenne de l'Absorbance

V_t : Volume total du mélange réactionnel (ml)

V_e : Volume de l'extrait enzymatique(ml)

L : Largeur de la cuve de mesure (cm)

P : Teneur en protéine (mg)

T : Temps de lecture (min)

3.5.1.2. Dosage de l'activité Glutathion S-Transférase (GST)

Le dosage de la glutathion S-transférase est réalisé par la méthode de (Habig et *al.*, 1974), les échantillons sont homogénéisés dans un tampon phosphate à pH 6,5 et à 100mM et centrifugés à 9000g pendant 30 min. La méthode consiste à faire réagir les GST_S sur un mélange CDNB (20mM)-GSH (100mM), la variation de la densité optique due à l'apparition du complexe CDNB-GSH est mesurée toutes les 15 secondes pendant 2 minutes à 340nm. Les concentrations de la GST sont exprimées en nmole /min/ mg de protéines. Le Blanc est composé de 850 µl de tampon phosphate additionné de 50 µl de CDNB et de 100 µl de GSH.

3.5.2. Dosages non Enzymatiques

3.5.2.1. Le Glutathion (GSH)

L'extrait enzymatique (800µl) est homogénéisé dans une solution d'E.D.T.A à 0,02M et subit une déprotéinisation par 200 µl d'acide sulfo-salicylique 0,25%. Après centrifugation à 1000 g/min pendant 5 minutes, le surnageant est utilisé pour le dosage spectrophotométrique avec le réactif DTNB à 0,01M à 412nm. Les concentrations du GSH sont dosées par la méthode de (Weckbecker et Cory, 1988) et exprimées en µM/mg de protéines.

3.5.2.2. Dosage de l'activité Ascorbate-peroxydases (APX)

Le dosage spectrophotométrique de l'activité ascorbate-peroxydase est réalisé suivant le protocole adopté par Nakano et Azada (1987). Le mélange réactionnel contient : 100µl d'extrait enzymatique, 0,5 Mm d'ascorbate, 50 Mm du Tampon phosphate (pH= 7,2) et 50µl de H₂O₂ (300mM). L'étalonnage de l'appareil se fait en l'absence de l'extrait enzymatique.

La lecture est effectuée à 290 nm (spectrophotomètre GeneSys 8) pendant 1min et ce pour un coefficient d'extinction linéique molaire ($\epsilon = 2,8\text{mM}^{-1}.\text{cm}^{-1}$), l'activité APX est exprimée en nmol/min/mg de protéines.

3.5.2.3. Dosage de l'activité Catalase (CAT)

Le dosage spectrophotométrique de l'activité catalase (CAT) est réalisé suivant la méthode de Cakmak et Horst, (1991). La décroissance de l'absorbance est enregistrée pendant trois minutes (spectrophotomètre Jenway 6300) pour une longueur d'onde de 240nm et un coefficient d'extinction linéique molaire ($\epsilon = 39,4 \text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$). Pour un volume final de 3ml, le mélange réactionnel contient : 100 μl de l'extrait enzymatique brut, 50 μl de peroxyde d'hydrogène H_2O_2 à 0,3% et 2,85ml de tampon phosphate (50mM, pH= 7,2). L'étalonnage de l'appareil se fait en l'absence de l'extrait enzymatique. La réaction est déclenchée par l'addition d'eau oxygénée. L'activité catalase est exprimée en nmol/min/mg de protéines.

3.6. Etude du métabolisme photosynthétique

L'activité photosynthétique des feuilles isolées est mesurée par l'électrode à oxygène comme pour l'intensité respiratoire où l'échantillon (feuilles) est placé en condition d'obscurité (chapeau de l'électrode).

3.7. Etude du métabolisme respiratoire

Le métabolisme respiratoire est évalué par la mesure de l'intensité respiratoire (IR) des Plantes d'élodée. L'intensité respiratoire est suivie à l'aide d'une électrode à oxygène de Clarck couplée à un ordinateur. La concentration initiale en oxygène du milieu d'électrode en équilibre avec l'atmosphère est de 240 μmoles (Djebar et Djebar, 2000).

3.8. Analyse statistique

L'analyse statistique des données est effectuée par le test T de student qui sert à comparer entre deux échantillons (Témoin et traité). Ce test est réalisé à l'aide d'un logiciel d'analyse des données Minitab (version 14.0) (Dagnelie, 1999).

Résultats

1. Évolution de la croissance pondérale chez *Elodea canadensis* traitée par le cadmium

La figure 06 illustre l'évolution de la croissance pondérale d'*Elodea Canadensis* suite au traitement par des concentrations croissantes de cadmium.

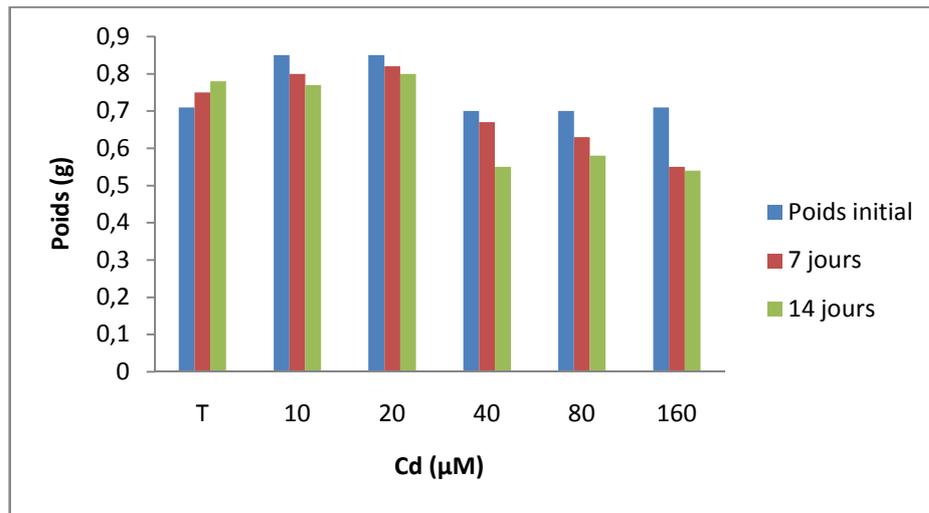


Figure 06: Effet du traitement par le Cadmium sur la croissance pondérale d'*Elodea Canadensis* après 7 et 14 jours de traitement

On constate chez les échantillons témoins, une augmentation remarquable dans le poids des plants d'*Elodea canadensis* ; par contre chez les échantillons traités avec le cadmium (10 et 20 μM), on observe une légère diminution du poids de ces derniers pour la période de 7 à 14 jours, cette diminution est d'environ (5%) chez les traités par (10 et 20 μM). La diminution de cette croissance pondérale reste assez remarquable pour les échantillons traités avec de fortes concentrations de cadmium chez les traités avec 40 μM et (7%) chez les traités avec 80 μM et de l'ordre de (23%) chez les traités avec 160 μM .

2. Evolution du taux des protéines totales chez *Elodea canadensis* suite au traitement par le cadmium

La figure 07 illustre l'effet du cadmium sur les variations des protéines totales chez « *Elodea canadensis* » après traitements de 7 et 14 jours.

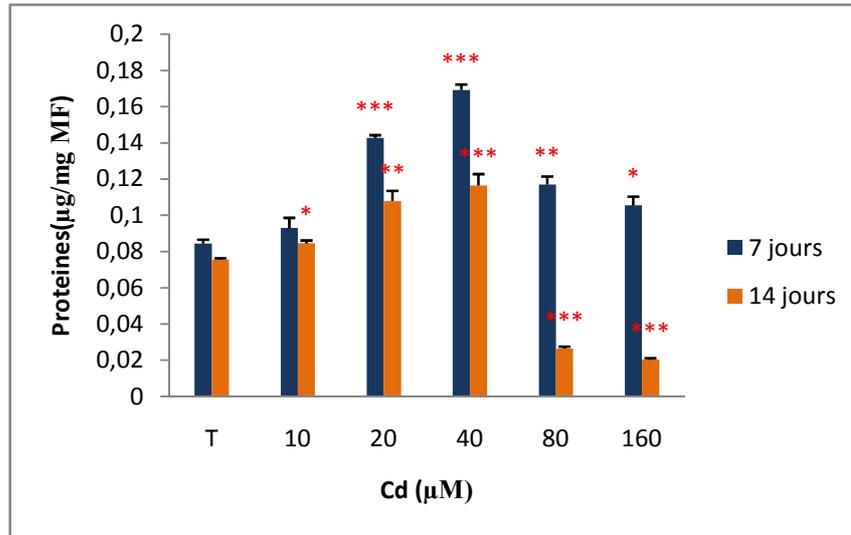


Figure 07: Effet du traitement par le cadmium sur les variations du taux de protéines totales chez *Elodea canadensis* après 7 et 14 jours de traitement.

On constate durant la période de 7 jours qu'il y a une augmentation considérable maximum du taux des protéines totales à 40µM puis nous notons une diminution aux fortes concentrations.

Après 14 jours de traitement, on remarque un effet beaucoup plus important à partir de 40µM avec des baisses de (90%) pour 80 et 160 µM mais l'aspect évolutif est le même de 0 à 40 µM.

3. Evolution du taux de la proline chez *Elodea canadensis* traité par le cadmium

La figure 08 illustre l'effet du cadmium sur la synthèse de la proline dans les plantes d'*Elodea canadensis* après traitement de 7 et 14 jours.

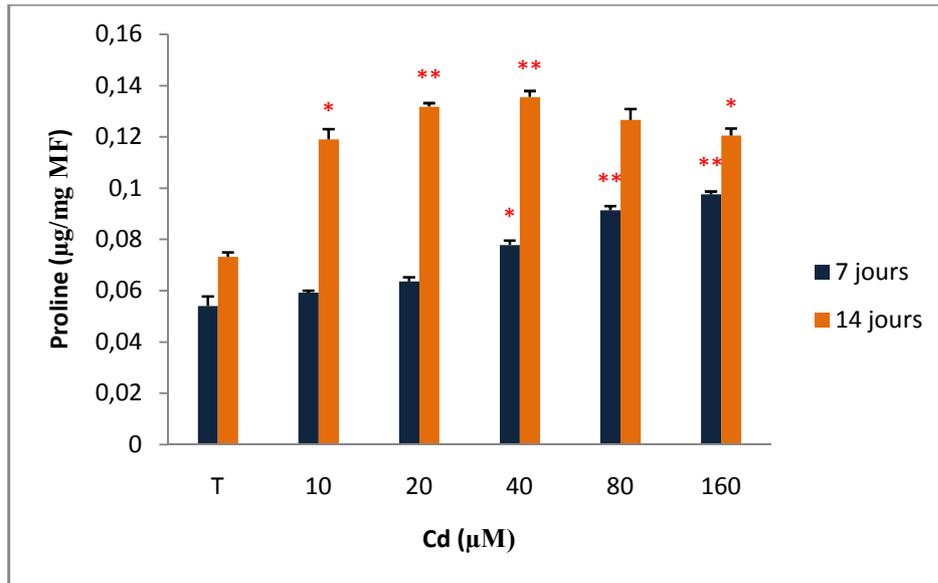


Figure 08: Effet du traitement par le cadmium sur les variations du taux de proline chez *Elodea canadensis* après 7 et 14 jours de traitement.

Selon nos résultats, nous observons après un traitement de 7 jours de cadmium, une augmentation très hautement significative des concentrations de proline dans les plantes « *Elodea canadensis* » de 0 à 160 µM.

Après traitement de 14 jours, Nous notons une augmentation dès 10 µM puis stable à 160 µM.

4. Dosage de la GSH chez *Elodea canadensis* traitée par le cadmium

La figure 09 représente la variation de la quantité du GSH en fonction des différentes concentrations de cadmium dans un intervalle de temps (7 à 14 jours).

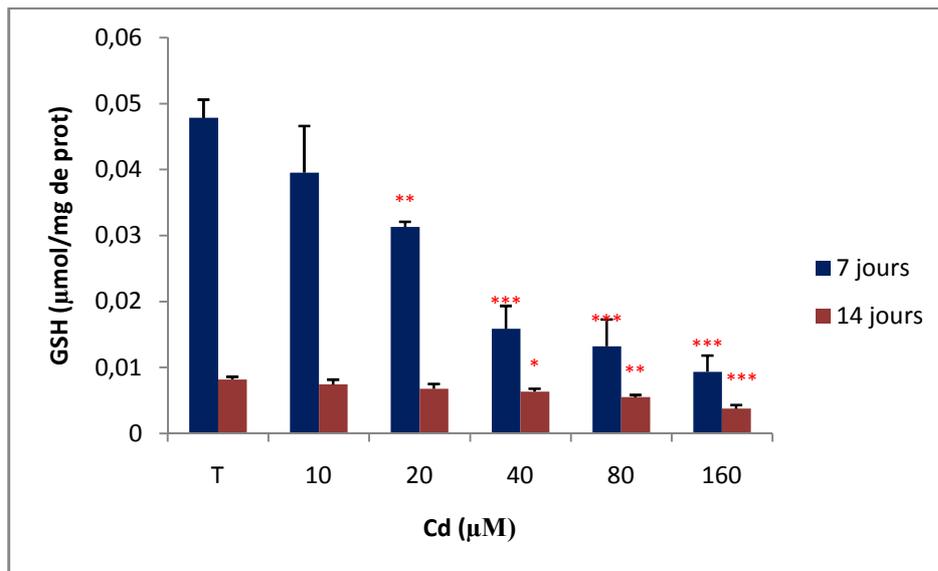


Figure 09: Effet du traitement par le cadmium sur les variations du taux de GSH chez *Elodea canadensis* après 7 et 14 jours de traitement.

Nous constatons, après une exposition au cadmium (7 jours de traitement), une diminution remarquable (30%) du taux de GSH de 0 à 160 µM.

Après 14 jours de traitement, des niveaux très bas du taux de la GSH dès 0 à 160 µM.

On peut conclure que la quantité de GSH subit une croissance régressive en fonction des différentes concentrations de cadmium par rapport au témoin à 7 et 14 jours du traitement.

5. Dosage de la GST chez *Elodea canadensis* traitée par le cadmium

Les données obtenues après dosage de l'activité spécifique GST exprimées en nmoles/min/ μ g de protéines chez "*Elodea canadensis*" sont regroupées dans la figure 10.

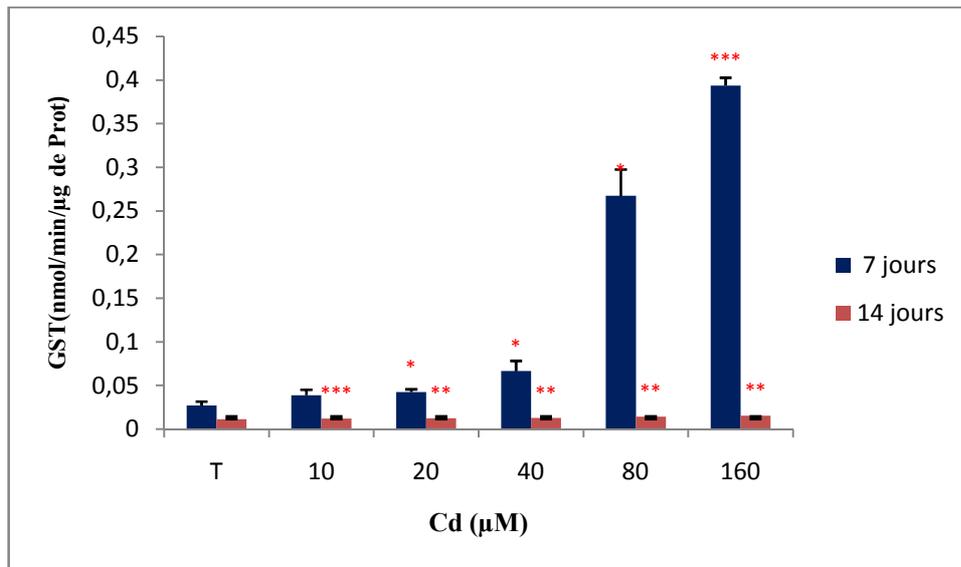


Figure 10: Effet du traitement par le cadmium sur les variations de l'activité GST chez *Elodea canadensis* après 7 et 14 jours de traitement.

D'après la figure 10, après 7 jours de traitement, on remarque que l'activité GST augmente à partir de 80 μ M et maximal à 160 μ M environ de (90%) par rapport au témoin.

Après 14 jours de traitement de cadmium, des niveaux très bas de l'activité GST de 0 à 160 μ M ont été remarqués chez les plants d'élodée.

6. Effet du cadmium sur l'activité catalase

Les résultats obtenus de l'activité CAT en fonction des différentes concentrations de cadmium après traitement de 7 et 14 jours sont représentés sur la figure 11.

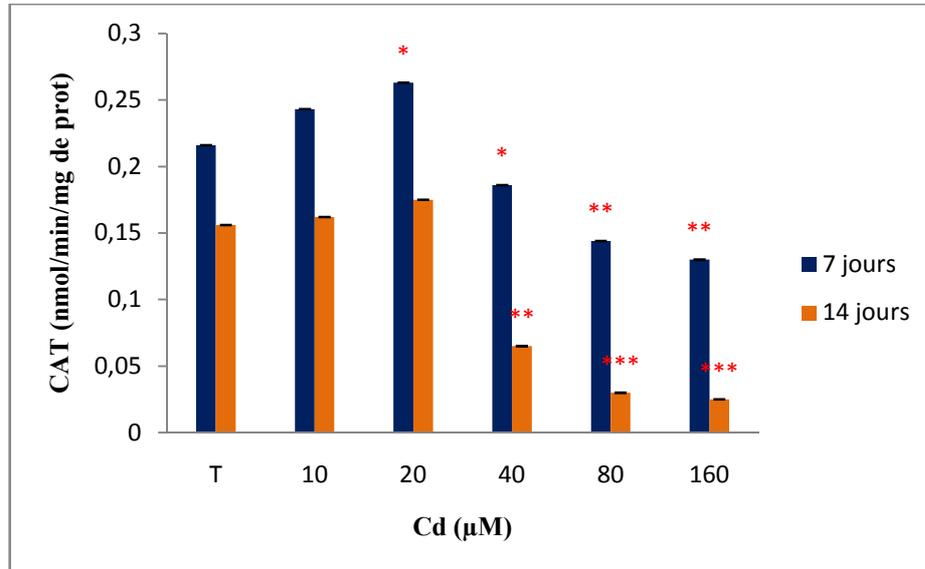


Figure 11 : Effet du traitement par le cadmium sur les variations de l'activité catalase chez *Eloдея canadensis* après 7 et 14 jours de traitement.

Les résultats du suivi de l'activité catalase, enregistré dans la figure 11 après 7 jours de traitement révèlent que cette dernière augmente chez les concentrations de 0 à 20 µM puis diminue chez les plus fortes concentrations 160 µM d'environ (66%).

Après 14 jours de traitement de cadmium, l'activité catalase diminue au niveau plus bas avec les concentrations les plus fortes 80 et 160 µM.

7. Effet du cadmium sur l'activité ascorbate peroxydase (APX)

La figure (12) met en évidence l'effet du cadmium sur l'activité ascorbate peroxydase dans les plantes d'*Elodea canadensis*.

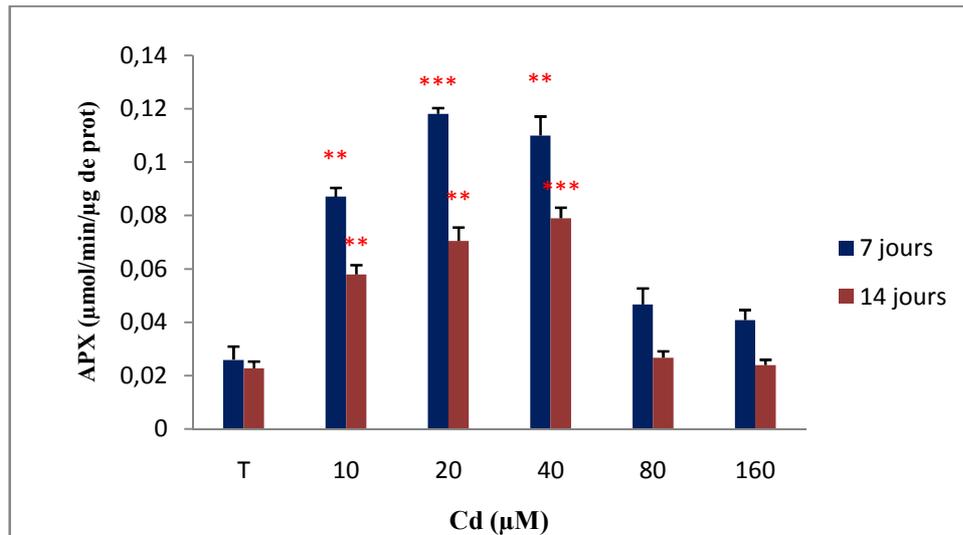


Figure 12: Effet du traitement par le cadmium sur les variations de l'activité APX chez *Elodea canadensis* après 7 et 14 jours de traitement.

Sur la figure 12, après 7 jours de traitement de cadmium, on constate une augmentation maximum à 20 µM puis une diminution chez les plus fortes concentrations.

Aussi une augmentation maximale de cette activité (APX) à 40 µM après 14 jours de traitement puis une diminution pour les plus fortes concentrations de cadmium (80 et 160 µM).

8. Effet du cadmium sur la teneur en chlorophylle (a, b et a+b)

Les effets du cadmium sur la teneur en chlorophylle (a, b, a+b) en fonction de différentes concentrations de cadmium après 7 et 14 jours de traitement sont représentés dans les figures (13, 14 et 15).

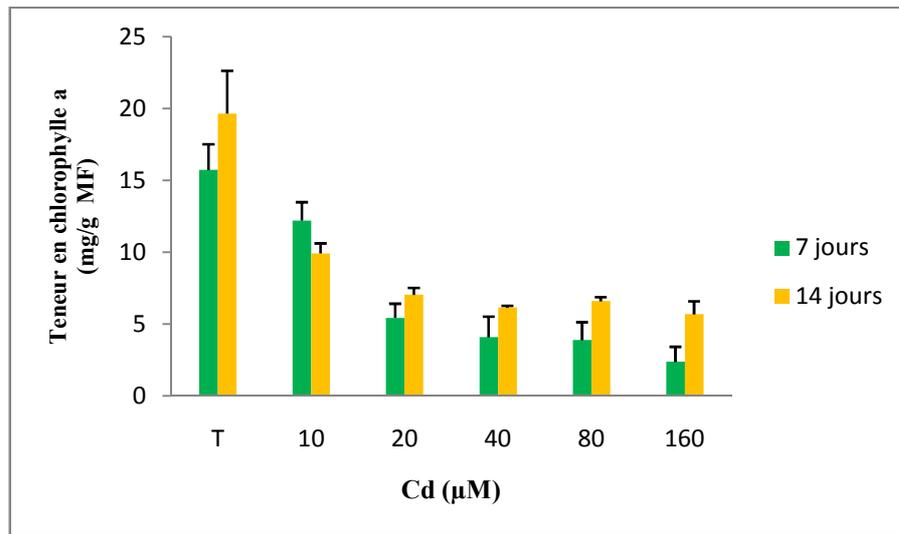


Figure 13: Effet du traitement par le cadmium sur les variations du taux de la chlorophylle (a) chez *Elodea canadensis* après 7 et 14 jours de traitement.

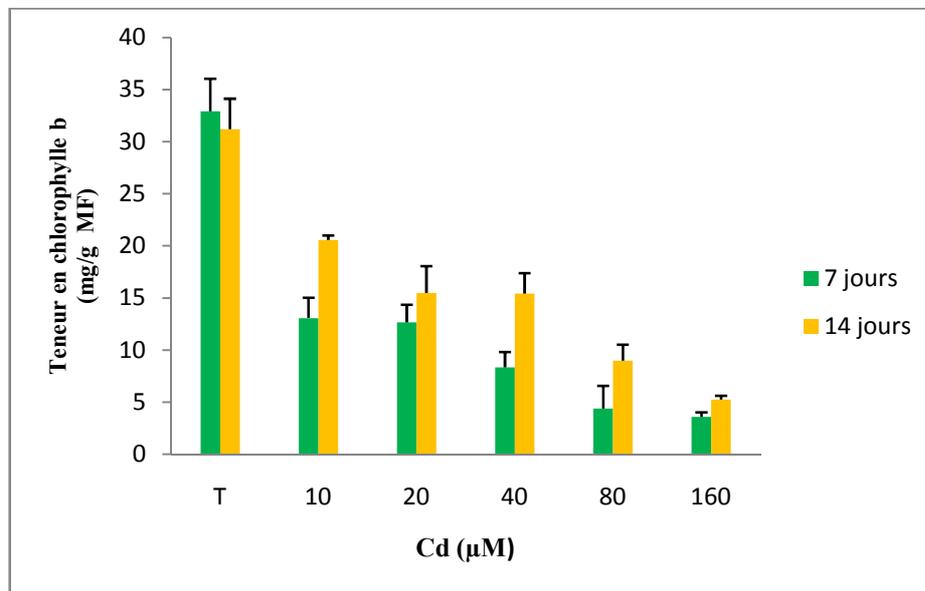


Figure 14 : Effet du traitement par le cadmium sur les variations du taux de la chlorophylle (b) chez *Elodea canadensis* après 7 et 14 jours de traitement.

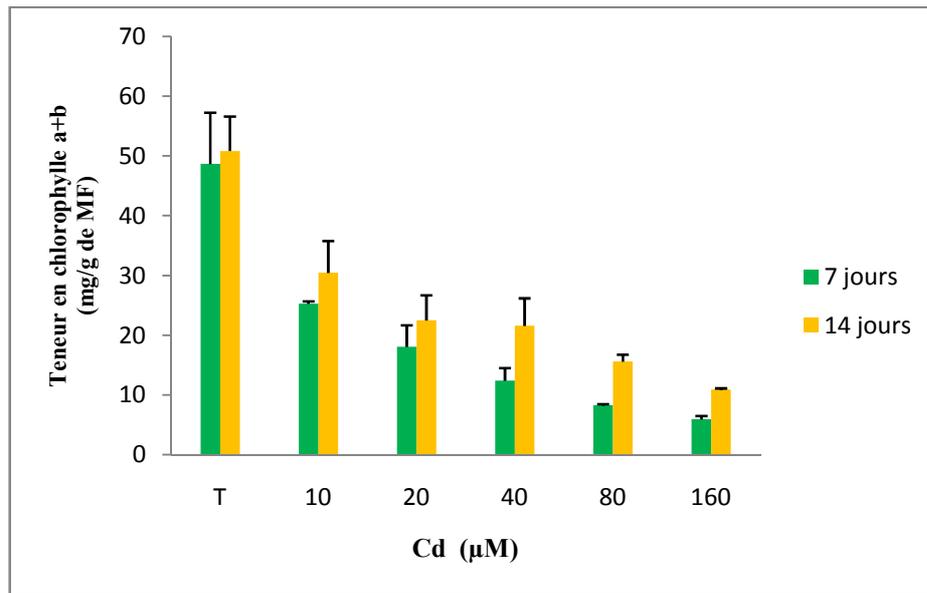


Figure 15: Effet du traitement par le cadmium sur les variations du taux de la chlorophylle (a+b) chez *Elodea Canadensis* après 7 et 14 jours de traitement.

Sur la figure 13, on constate que le taux de la chlorophylle (a) a tendance à diminuer durant le traitement 7 et 14 jours à partir de la concentration 20 µM d'environ (50%).

Le traitement par le cadmium provoque une baisse progressive du taux de chlorophylle b qui atteint plus de 240% à la plus forte concentration (figure 14).

D'après la figure 15, on remarque une diminution de la teneur en chlorophylle (a+b). La présence du cadmium affecte le taux de chlorophylle en fonction des concentrations de ce métal et du temps, une baisse importante du taux de chlorophylle a+b observée à 160µM. L'addition du cadmium a réduit la synthèse des chlorophylles (a, b, a+b) chez tous les plants traités.

9. Effet du cadmium sur le métabolisme respiratoire

L'évolution du métabolisme respiratoire de la plante aquatique *Elodea canadensis* après 7 et 14 jours de traitement par le cadmium est présentée dans la figure (16 et 17).

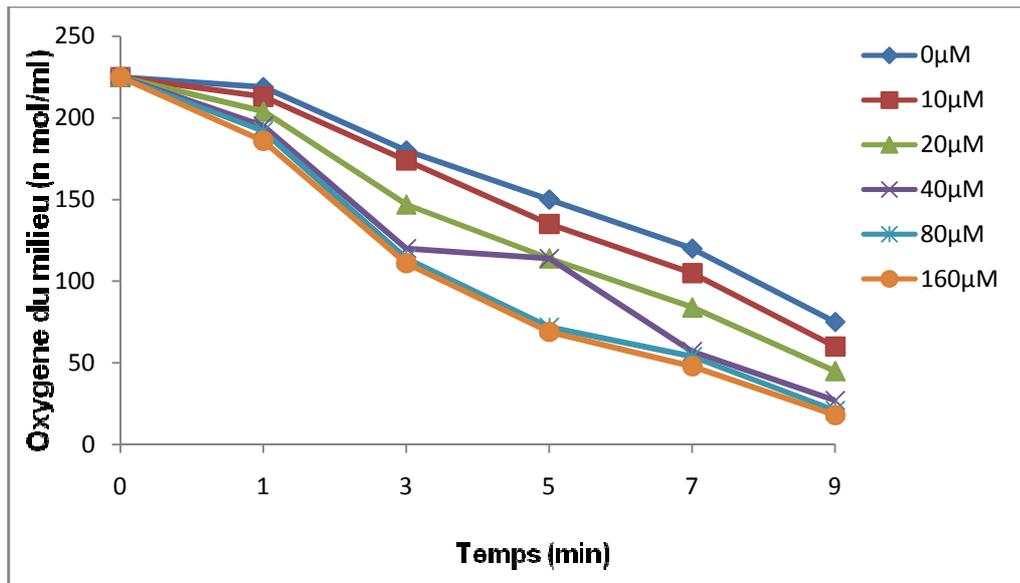


Figure 16: Effet du traitement par le cadmium sur les variations du métabolisme respiratoire chez *Elodea canadensis* après 7 jours de traitement.

On constate que les échantillons témoins présentent une respiration tout à fait normale avec une consommation d'O₂ proportionnelle au temps de mesure. Chez les échantillons traités, on remarque une augmentation dans la consommation d'O₂.

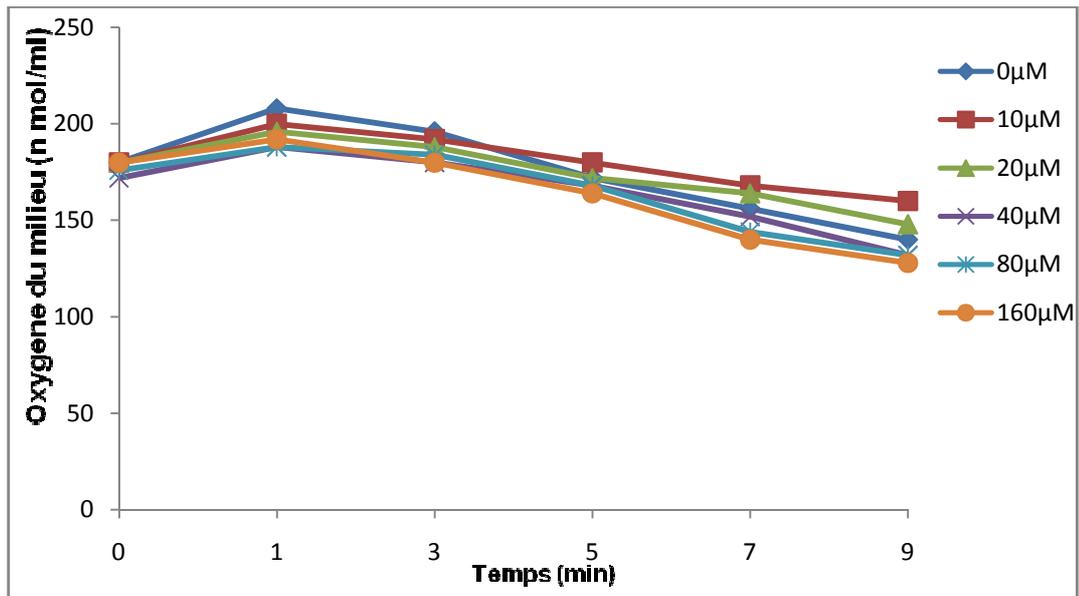


Figure 17: Effet du traitement par le cadmium sur les variations du métabolisme respiratoire chez *Elodea canadensis* après 14 jours de traitement.

La figure (17), illustre les effets du Cadmium sur le métabolisme respiratoire de la plante aquatique *Elodea canadensis*, après 14 jours de traitement, cette figure indique une perturbation dans la respiration des feuilles traitées par rapport au témoin, cette perturbation se traduit par une augmentation du taux du métabolisme respiratoire chez les feuilles traitées par les deux premières concentrations 10µM et 20µM par rapport au témoin, et une diminution de la respiration chez les plants traitées par les fortes concentrations de cadmium (40, 80 et 160µM).

10. Effet du cadmium sur le métabolisme photosynthétique

Les figures 18 et 19 illustrent l'effet du cadmium sur le métabolisme photosynthétique après 7 et 14 jours de traitement où on remarque une libération d'O₂ dans le milieu pour les plants traités à différentes concentrations de cadmium.

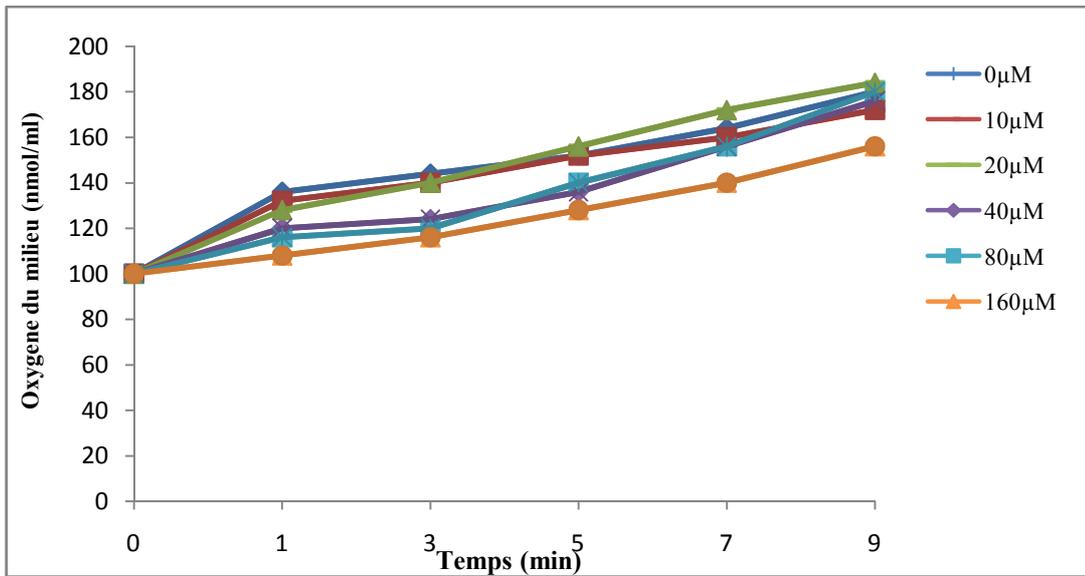


Figure 18: Effet du traitement par le cadmium sur les variations de la photosynthèse chez *Elodea canadensis* après 7 jours de traitement.

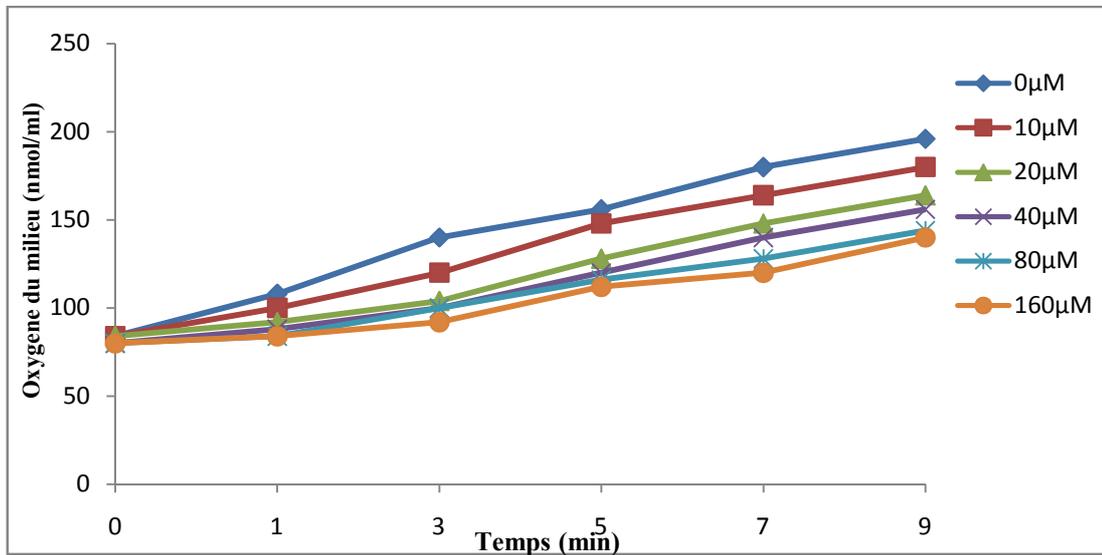


Figure 19: Effet du traitement par le cadmium sur les variations de la photosynthèse chez *Elodea canadensis* après 14 jours de traitement.

La figure 18, montre l'effet du cadmium sur les variations de la photosynthèse chez la plante « *Elodea canadensis* » après 7 jours de traitement ; on note qu'il y a une forte consommation d'oxygène à 10 et 20 μM .

Après 14 jours de traitement, une faible consommation d'oxygène pour toutes les concentrations.

11. Évolution de la croissance pondérale chez *Elodea canadensis* traitée par le Zinc

La figure 20 illustre l'évolution de la croissance pondérale d'*Elodea Canadensis* suite au traitement par des concentrations croissantes du zinc.

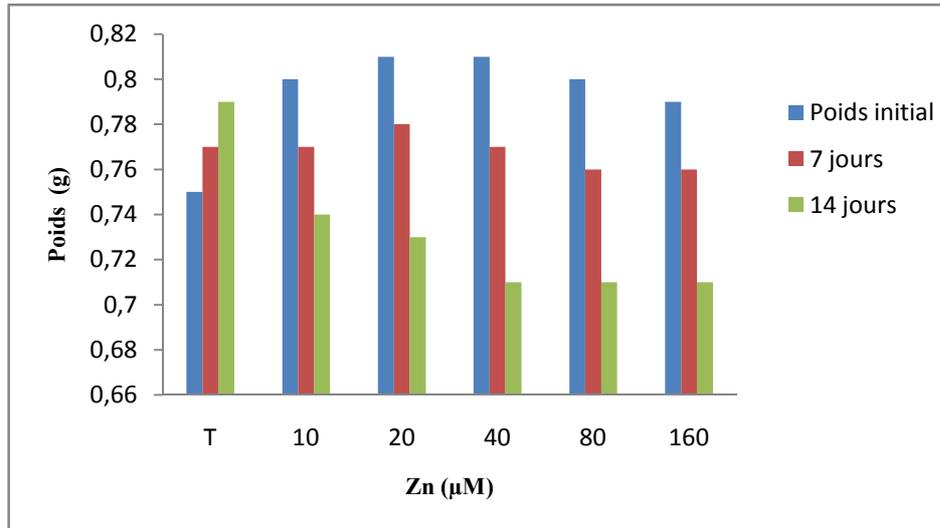


Figure 20: Effet du traitement par le Zinc sur la croissance pondérale d'*Elodea canadensis* après 7 et 14 jours de traitement.

D'après la figure 20, on note qu'il y a une augmentation et évolution du poids max à 0 µM (Témoin), après 7 jours de traitement au zinc, on remarque que le poids des plantes traitées à (10 et 20 µM) diminue de (15%) ; une diminution dans le poids également est notée pour les traités à (40, 80 et 160 µM) d'ordre de (25%) par rapport aux poids initial.

Après 14 jours de traitement au zinc, on a constaté une forte inhibition du poids chez tous les plants traités qui reste constante à (40, 80 et 160 µM), ce qui prouve que le zinc à un effet plus au moins important sur l'évolution de cette plante.

12. Evolution du taux de protéines totales chez *Elodea canadensis* suite au traitement par le Zinc

La figure 21 illustre l'effet du zinc sur les variations des protéines totales chez « *Elodea canadensis* » après traitements de 7 et 14 jours.

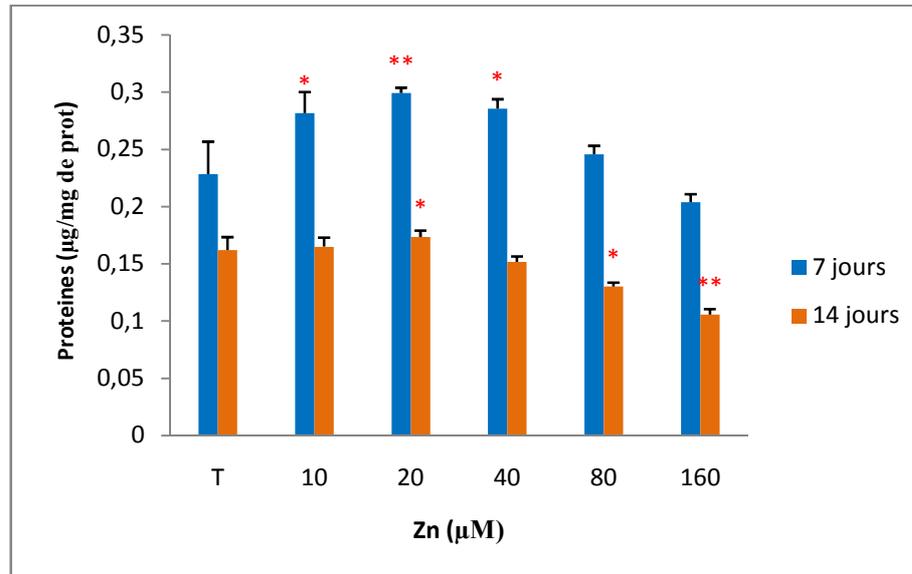


Figure 21: Effet du traitement par le Zinc sur les variations du taux de protéines totales chez *Elodea canadensis* après 7 et 14 jours de traitement.

On constate une augmentation du taux des protéines totales aux faibles concentrations (10 et 20μM) suivie d'une diminution aux fortes concentrations (40, 80 et 160μM) chez *Elodea canadensis* comparativement aux plantes témoins après 7 jours de traitement.

Le taux de protéine tend à diminuer après 14 jours de traitement au zinc d'une façon stable pour les échantillons de concentrations (témoin, 10 et 20μM) et diminue progressivement aux fortes doses de zinc environ (20%) par rapport aux témoins.

13. Evolution du taux de la proline chez *Elodea canadensis* traité par le Zinc

La figure 22 présente les différentes variations du taux de la proline chez *Elodea canadensis* après traitement de 7 et 14 jours.

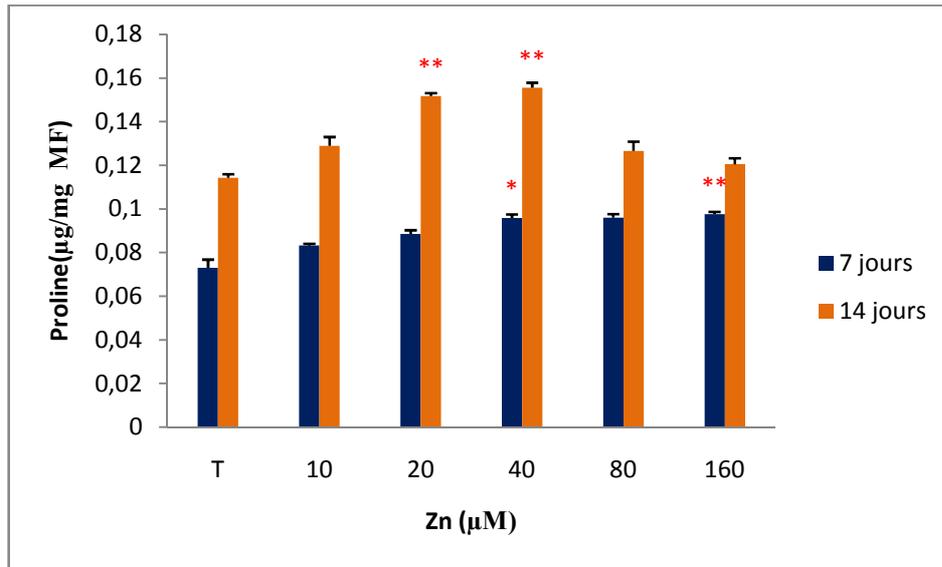


Figure 22: Effet du traitement par le Zinc sur les variations du taux de proline chez *Elodea canadensis* après 7 et 14 jours de traitement.

Selon la figure 22, nous remarquons qu'après un traitement de 7 jours, il y a une augmentation du taux de proline par rapport au témoin. Cette augmentation est d'environ (10 %).

Nous notons aussi, une augmentation très remarquable du taux de proline après traitement de 14 jours chez les plantes traitées avec de faibles doses de zinc (10, 20 et 40 µM) qui tend à diminuer d'environ (25 %) chez les plantes traitées avec de fortes concentrations (80 et 160 µM).

14. Dosage de la GSH chez *Elodea canadensis* traitée par le zinc

La figure 23 représente la variation de la quantité du GSH en fonction des différentes concentrations de cadmium dans un intervalle de temps (7 à 14 jours).

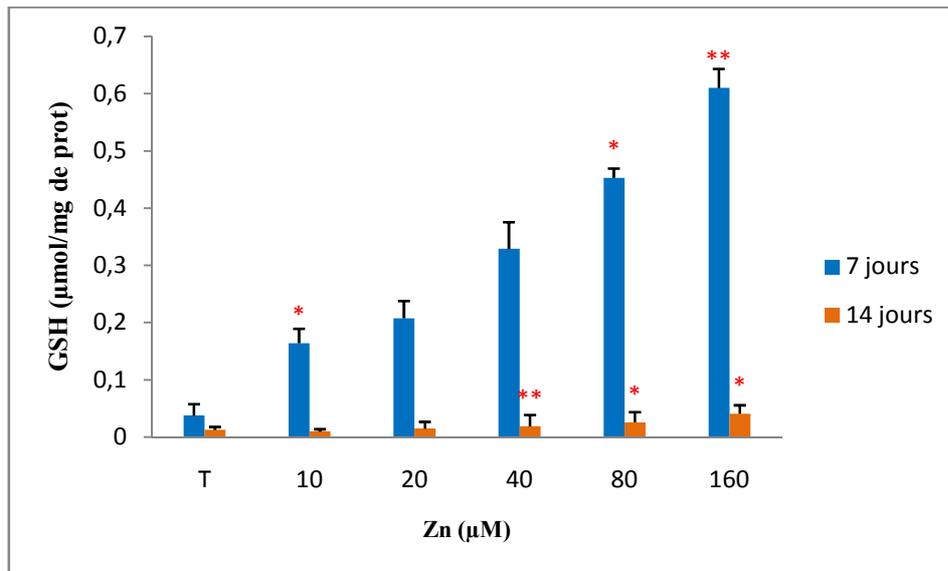


Figure 23: Effet du traitement par le zinc sur les variations du taux de GSH chez *Elodea canadensis* après 7 et 14 jours de traitement.

Après 7 jours de traitement au zinc, nous constatons une augmentation évolutif du taux de la GSH max à 160 µM. Le taux de GSH est très bas après 14 jours de traitement au zinc.

15. Effet du zinc sur l'activité GST chez *Elodea canadensis* traitées par le zinc

La figure 24 illustre les données obtenues après dosage de l'activité spécifique GST exprimées en nmoles/min/ μ g de protéines chez *Elodea canadensis*.

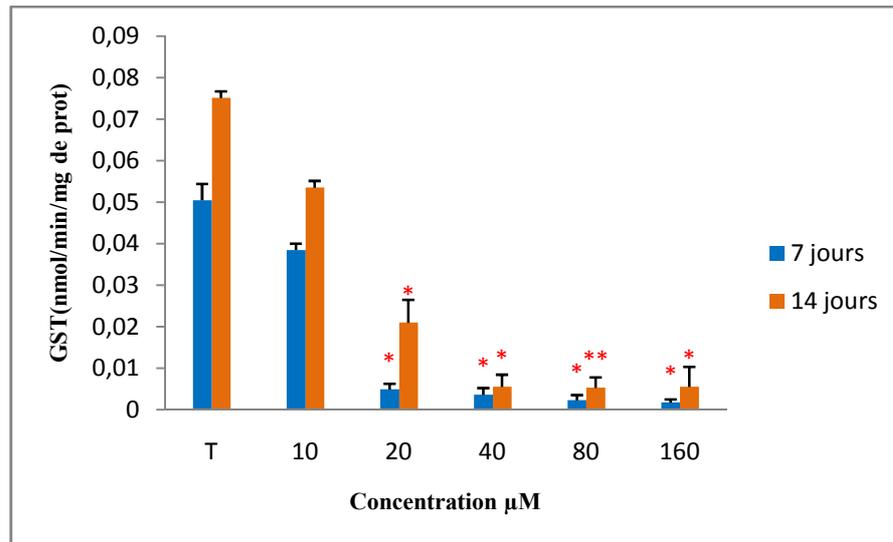


Figure 24: Effet du traitement par le zinc sur les variations de l'activité GST chez *Elodea canadensis* après 7 et 14 jours de traitement.

D'après la figure 24, on remarque que la GST diminue en fonction des différentes concentrations croissantes du Zn après 7 et 14 jours. L'activité GST diminue jusqu'à un niveau très bas à 80 et 160 μ M environ (90%).

16. Effet du Zinc sur l'activité catalase

La figure 25 montre l'effet du Zn sur les variations de l'activité catalase chez *Elodea canadensis* après 7 et 14 jours de traitement.

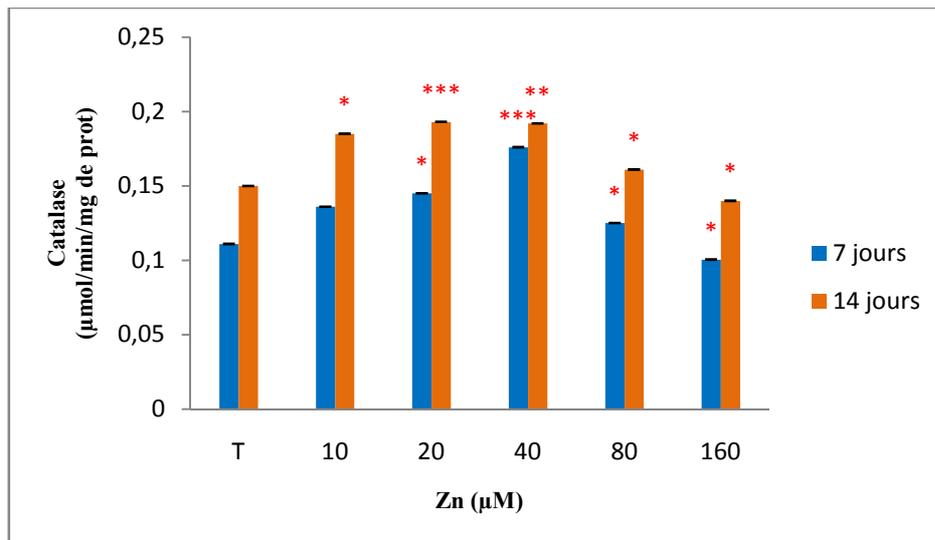


Figure 25: Effet du traitement par le zinc sur les variations de l'activité catalase chez *Elodea canadensis* après 7 et 14 jours de traitement.

Sur la figure 25, on constate que le traitement (après 7 jours) par le Zn aux faibles concentrations (10 et 20 μM) a tendance à stimuler l'activité enzymatique CAT, alors qu'une baisse est observée à partir de la concentration 80 μM environ (40%).

Après 14 jours de traitement au zinc, une augmentation maximum de l'activité catalase à 40 μM qui diminue aux fortes concentrations 80 et 160 μM environ de (25%).

17. Effet du Zinc sur l'activité ascorbate peroxydase(APX)

La figure 26 illustre les variations de l'activité APX chez les plantes *d'Elodea canadensis* après 7 et 14 jours de traitement par le zinc.

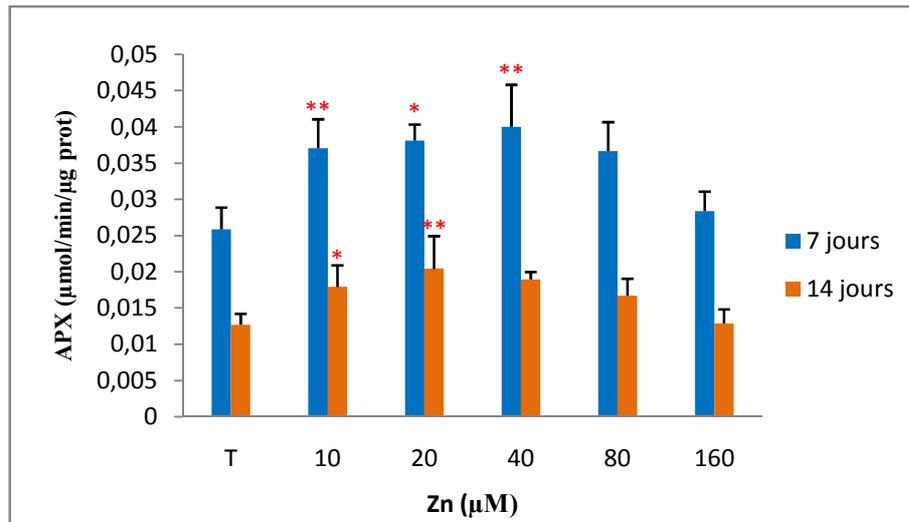


Figure 26: Effet du traitement par le zinc sur les variations de l'activité APX chez *Elodea Canadensis* après 7 et 14 jours de traitement.

D'après la figure 26, on constate que le traitement par le Zn aux faibles concentrations a tendance à stimuler l'activité enzymatique APX après 7 jours, une augmentation maximale à 20 et 40 µM puis une diminution de cette activité aux fortes doses environ (30%). Après 14 jours de traitement au Zn, une augmentation à 20 µM qui tend à diminuer progressivement aux plus fortes concentrations de Zn environ (10%).

18. Effet du zinc sur la teneur en chlorophylle (a, b et a+b)

Les effets du zinc sur la teneur en chlorophylle (a, b, a+b) en fonction de différentes concentrations de cadmium après 7 et 14 jours de traitement sont représentés dans les figures (27, 28 et 29).

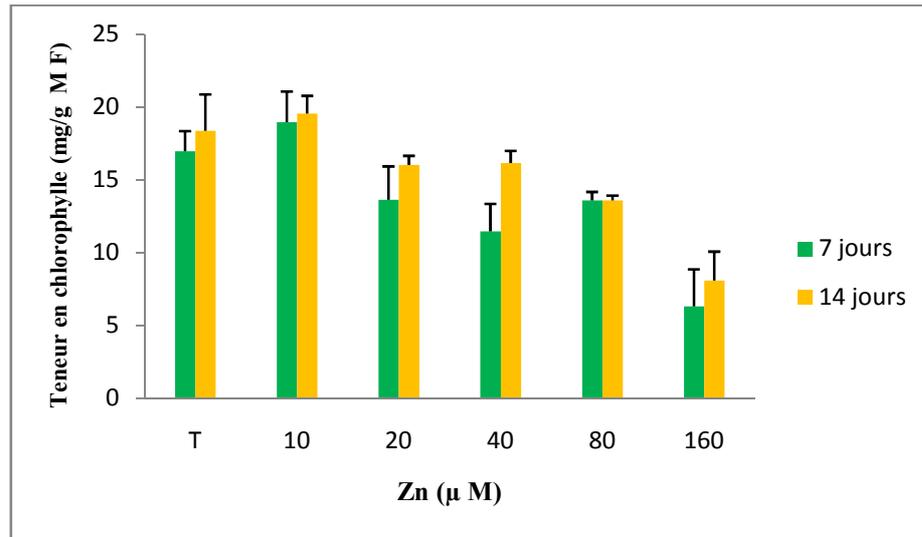


Figure 27: Effet du traitement par le zinc sur les variations du taux de la chlorophylle (a) chez *Elodea canadensis* après 7 et 14 jours de traitement.

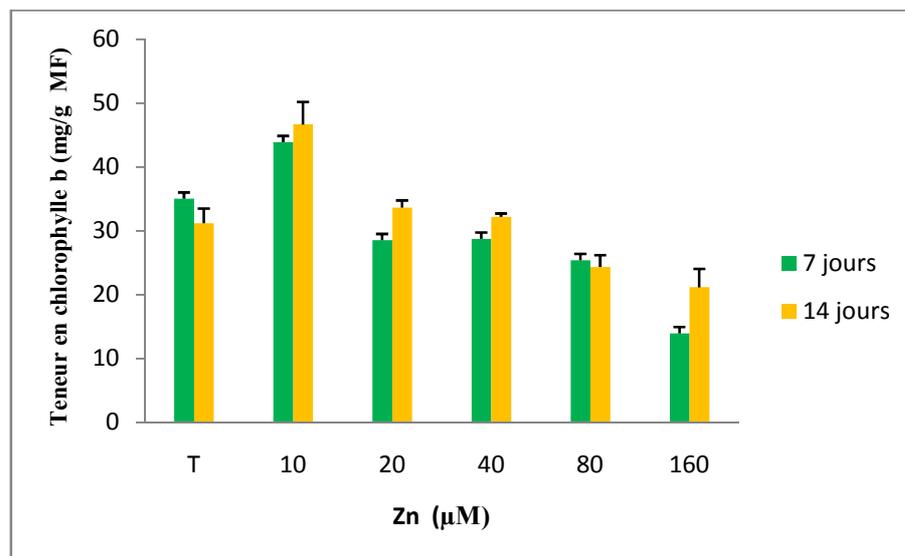


Figure 28: Effet du traitement par le zinc sur les variations du taux de la chlorophylle (b) chez *Elodea canadensis* après 7 et 14 jours de traitement.

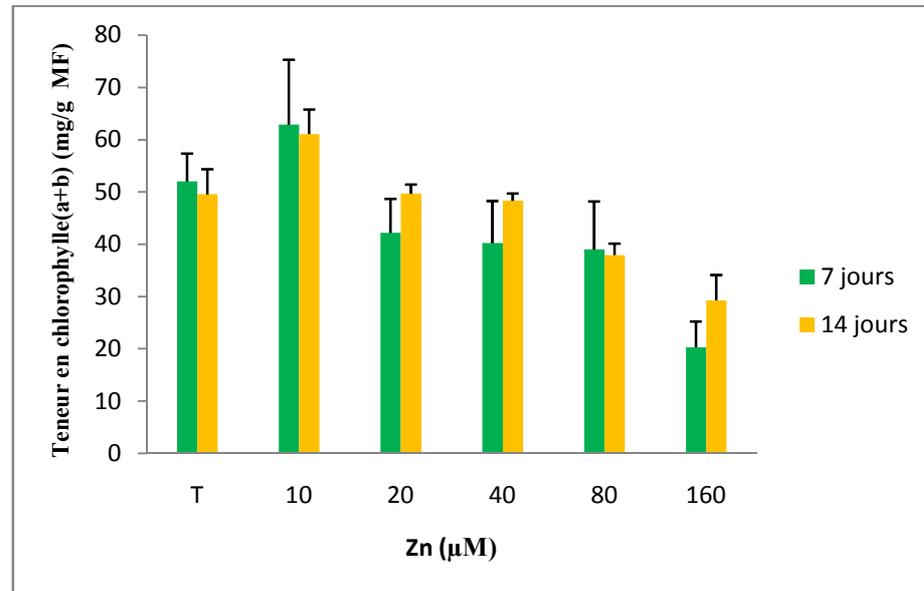


Figure 29: Effet du traitement par le zinc sur les variations du taux de la chlorophylle (a+b) chez *Elodea canadensis* après 7 et 14 jours de traitement

Sur la figure 27, 28 et 29, après traitement de 7 jours et 14 jours au zinc, on constate que le taux de chlorophylle a, b et a+b, augmente à 10 μM et diminue progressivement jusqu'à la plus forte concentration 160 μM .

19. Effet du zinc sur le métabolisme respiratoire

L'évolution du métabolisme respiratoire de la plante aquatique *Elodea canadensis* après 7 et 14 jours de traitement par le zinc est présentée dans la figure (30 et 31).

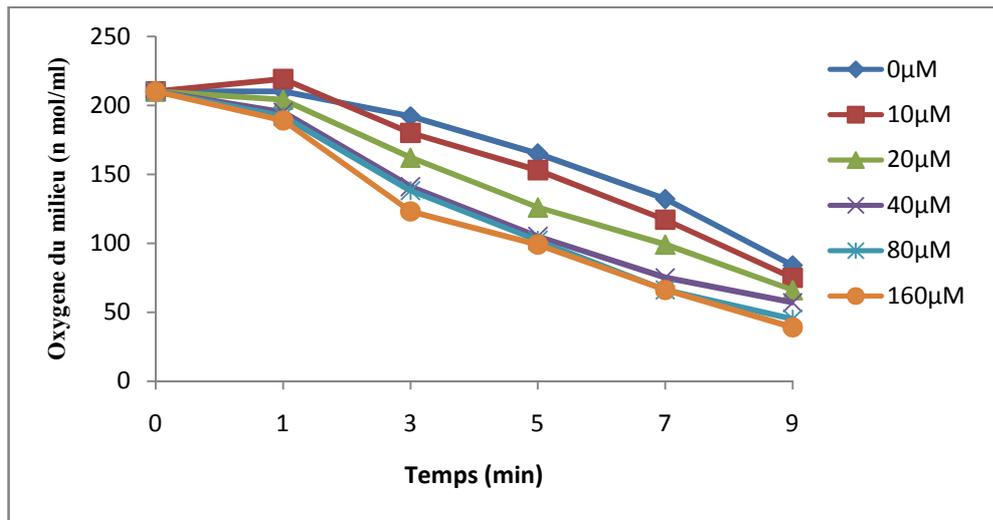


Figure 30: Effet du traitement par le zinc sur les variations du métabolisme respiratoire chez *Elodea canadensis* après 7 jours de traitement.

D'après la figure 30, On constate que les échantillons témoins présentent une respiration tout à fait normale avec une consommation d'O₂ proportionnelle au temps de mesure. Le traitement par les différentes concentrations de zinc montre que le métabolisme respiratoire d'*Elodea canadensis* est fortement inhibé par rapport au témoin après un traitement de 7 jours.

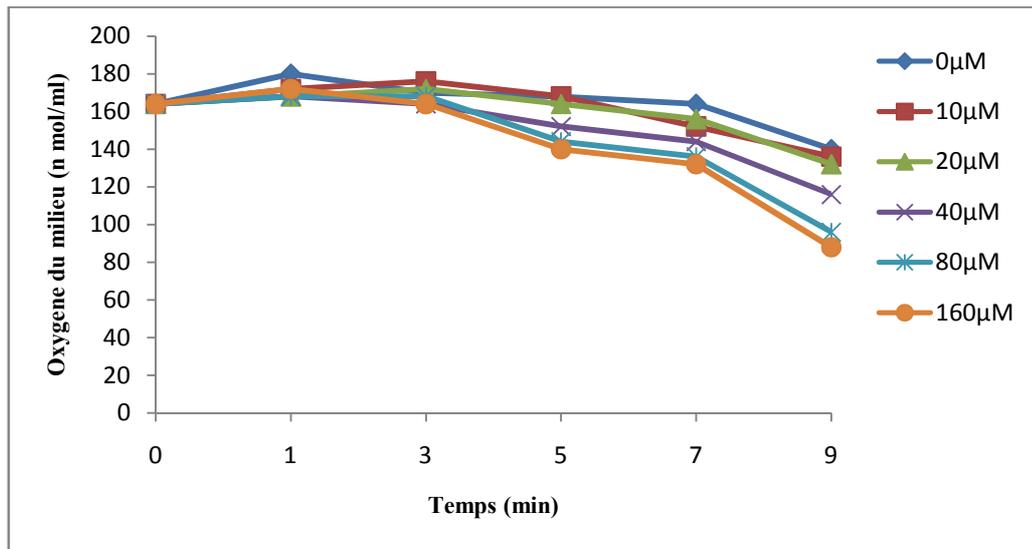


Figure 31: Effet du traitement par le zinc sur les variations du métabolisme respiratoire chez *Elodea canadensis* après 14 jours de traitement.

La figure 31 illustre l'évolution de la consommation d'oxygène par *Elodea Canadensis* suite au traitement par des concentrations croissantes de zinc.

Nous constatons une perturbation de l'évolution de l'oxygène consommé par *Elodea Canadensis* après 14 jours de traitement par rapport au témoin.

20. Effet du zinc sur le métabolisme photosynthétique

Les figures 32 et 33 illustrent l'effet du zinc sur le métabolisme photosynthétique après 7 et 14 jours de traitement où on remarque une libération d'O₂ dans le milieu pour les plants traités à différentes concentrations de zinc.

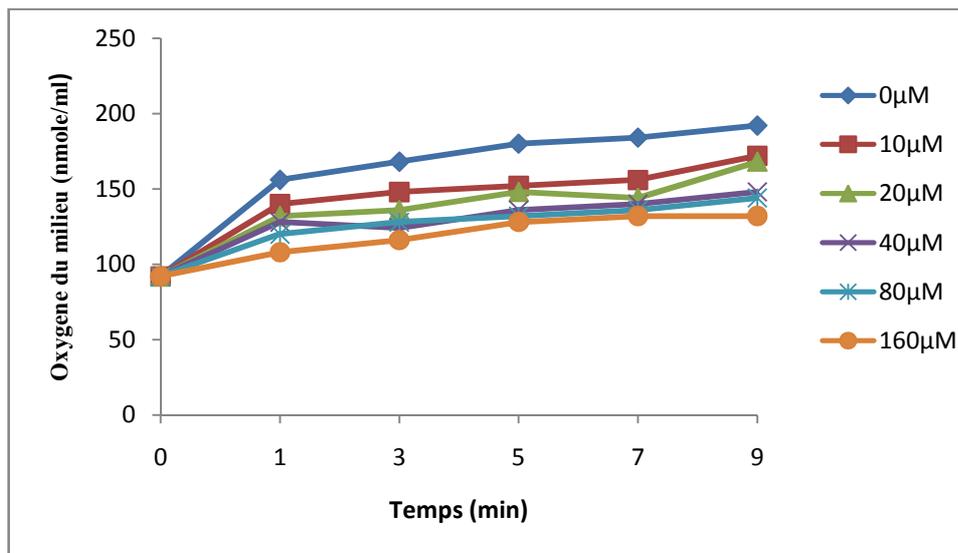


Figure 32: Effet du traitement par le zinc sur les variations de la photosynthèse chez *Elodea canadensis* après 7 jours de traitement.

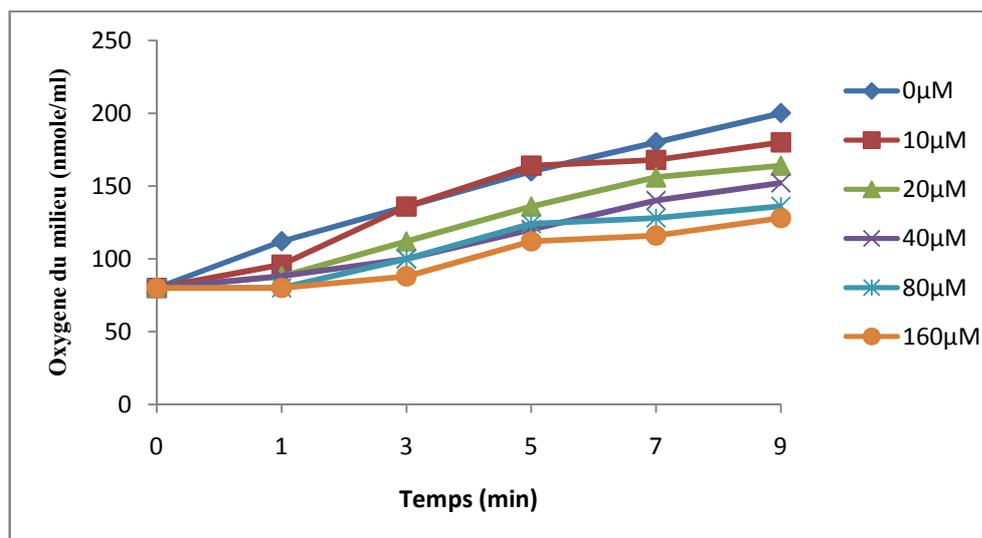


Figure 33: Effet du traitement par le zinc sur les variations de la photosynthèse chez *Elodea Canadensis* après 14 jours de traitement.

Nous remarquons qu'il y a une inhibition de la photosynthèse pour les échantillons traités avec le zinc par rapport au témoin.

Discussion

Dans ce dernier chapitre nous nous proposons de procéder à une discussion générale des principaux résultats obtenus dans notre travail. Le Cadmium (Cd) est un élément non essentiel et toxique, sans aucune signification métabolique alors que, le zinc (Zn) est un élément essentiel requis par de nombreux enzymes vitaux et joue un rôle structurel important en tant que stabilisant de protéines et les membranes.

Le zinc est connu pour avoir un effet stabilisateur et protecteur sur les membranes biologiques contre les dommages oxydatifs (peroxydation), la perte d'intégrité de la membrane (Cakmak, 2000 et Powell, 2000), et également l'altération de la perméabilité de la membrane (Bettger, 1981).

L'exposition des plantes aux métaux lourds peut entraîner de nombreux troubles physiologiques et biochimiques. Le traitement avec du cadmium et du zinc affecte de manière significative la croissance des plantes "*Elodea canadensis*", des études montrent que le cadmium a tendance à affecter de façon significative les paramètres de croissance (Chugh et Sawhney, 1995; Herrieche, 2004).

Les résultats obtenus dans notre travail viennent confirmer ceux obtenus par Zoghlami et al., (2006), *Lycopersicon esculentum* où l'on note que l'accumulation et la distribution de certains oligo-éléments dans les tissus de la plante dépendent de l'intensité du stress et de la nature de l'organe cible.

Dans notre expérimentation ce paramètre est jugé très élevé provoquant ainsi de forte perte en termes de rendement. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que l'accumulation de ce xénobiotique dans la plante serait à l'origine de l'inhibition du développement des fleurs et ceux en stimulant de façon importante la synthèse de certaines hormones (Éthylène) utilisées dans le phénomène de détoxification (Heller et *al.*, 2000).

La qualité de la croissance peut indiquer l'existence d'un effet délétère causé par le cadmium (Stratton et *al.*, 1979), ce paramètre peut constituer un moyen pour la détermination des effets des herbicides sur les organismes aquatiques.

Kelly et *al.*, (1979) constatent que l'allongement racinaire est affecté négativement en fonction de concentrations croissantes en cadmium. De plus, les travaux sur le chêne, Epron et *al.*, (1999) montrent que les traitements salins modérés et élevés altèrent fortement l'élongation des racines. Ceci montre que ce paramètre est un très bon indicateur/ biomarqueur de la pollution. De plus les travaux de (Alayat, 2015) montrent que le cadmium provoque une diminution significative du taux de germination des graines de blés et d'orge.

Les plantes piègent les radicaux libres et les peroxydes en induisant plusieurs enzymes antioxydantes, ainsi qu'un certain nombre de métabolites (Scandalios, 2002; Clijsters et *al.*, 1999; Mittler, 2002).

Les plantes exposées à des doses toxiques de pesticides, induisent des enzymes antioxydantes, un mécanisme bien démontré de protection pour minimiser les dommages oxydatifs cellulaires (Aust et *al.*, 1985; Mazhoudi et *al.*, 1997; Mittler, 2002).

Nos résultats montrent une augmentation de la quantité de protéine dans les plantes traitées en présence des différentes concentrations de Cd mais également de Zn, ceci s'expliquerait par le fait que la présence de xénobiotique à l'intérieur des tissus stimule la synthèse protéique de nombreuses enzymes entre autres celles intervenant dans la détoxification, ceci vient appuyer les résultats de Singh et *al.*, (2004) qui montre que l'accumulation des protéines dans les racines et les feuilles de tomate est proportionnelle à celle du métal.

Chaoui, (1997) montre que la quantité de protéine est non affectée dans les parties stimulées par le Cd et le Zn chez *Phaseolus vulgaris*. D'autres travaux (Wollgieh et Newmann, 1995) reportent l'induction de protéine spécifiques au choc thermique sous l'effet d'un stress métallique ce qui montre leur rôle dans la réponse adaptative.

La stimulation du taux des protéines enregistrée au niveau des plantes, traduit l'existence des protéines synthétisées lors du stress généré par les métaux lourds existants éventuellement dans les milieux hydriques expérimentaux, tel que rapporté dans les travaux de Dixon et *al.*, (2003). Cette augmentation des protéines s'expliquerait aussi par le fait que la présence de xénobiotiques à l'intérieur des tissus, stimule la synthèse protéique de nombreuses enzymes entre autres celles intervenant dans la détoxification, ce qui est en parfait accord avec les résultats de Stolt et *al.*, (2003) qui indiquent que l'exposition des plantes à différentes concentrations de cadmium a tendance à provoquer une augmentation de la synthèse des protéines particulièrement des phytochélatines dont le rôle est la détoxification.

Gardés-albert et *al.*, (2003) expliquent l'augmentation des protéines par le fait que la plante cherche à protéger son intégrité morphophysique, en réponse aux dommages et aux effets défavorables induit par le xénobiotique en élaborant des protéines dont le rôle est la neutralisation de la molécule herbicide.

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

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

Au cours de notre étude, nous avons remarqué que lorsque les plantes sont soumises à un stress chimique, la GSH et l'activité GST semblent être sensibles et répondent rapidement à la présence du polluant. Le dosage des taux de GSH dans les plantes traitées par le Cd suggère la participation active de cet élément dans la détoxification des espèces réactive à l'oxygène générées par le Cd. Ce résultat est confirmé par les observations rapportées par Asada et Takahashi, 1987.

Nos résultats sont aussi en accord avec ceux de Zhu et *al.*, 1999 ; Cao et *al.*, 2004 et Freeman et *al.*, 2004 chez lesquelles le niveau de GSH est rehaussé avec l'augmentation de la tolérance à l'accumulation du Cd pour des faibles concentrations, et aussi avec les

observations rapportées par Gallego et *al.*, 1996 ; Nagalakshmi et Prasad, 2001 ; Ducruix et *al.*, 2006, où le niveau de GSH diminue en réponse au stress induit par les fortes concentrations de cadmium.

Le glutathion joue de nombreux rôles physiologiques chez les végétaux (May et *al.*, 1998). Il représente une forme importante de stockage de sulfure réduit, et participe à l'allocation en sulfure des différents compartiments cellulaires et des différents organes (Herschbach et Rennenberg, 1991). C'est également un régulateur de l'expression génique (Wingate et *al.*, 1988; Baier et Dietz, 1997) et un précurseur des phytochélatines (PC) jouant un rôle prédominant dans la séquestration des métaux chez les végétaux (Clemens, 2006a; Clemens, 2006b).

Le GSH sert également de substrat pour la glutathion S-transférase (GST) qui catalyse sa conjugaison avec des xénobiotiques, participant ainsi à leur détoxification (Marrs, 1996). Il est impliqué dans la régulation redox du cycle cellulaire (Gyuris et *al.*, 1993). Du fait de sa forte concentration dans les tissus végétaux et de son fort pouvoir réducteur, le GSH participe au statut redox cellulaire en jouant le rôle de tampon redox dans les cellules (Foyer et Noctor, 2000; Foyer et *al.*, 2001; Foyer et Noctor, 2003).

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

enzyme de phase II, qui joue un rôle important à la fois dans la protection anti-oxydative et dans le métabolisme des xénobiotiques.

Elle catalyse la conjugaison du glutathion endogène (GSH) avec un grand nombre de structures variées, cette conjugaison induit le plus souvent une détoxification de composés cyto- et génotoxiques (Marrs, 1996).

Il s'agira ici de savoir si la GST a plutôt un rôle dans le mécanisme de détoxification des pesticides ou si elle intervient seulement comme enzyme de protection contre le stress oxydant. Pour cela nous comparerons les réponses obtenues par d'autres enzymes du stress anti-oxydatif comme l'ascorbate peroxydase.

La catalase qui est localisée essentiellement dans le peroxyosome, participe dans la dégradation de H_2O_2 généré par le cadmium (Foyer *et al.*, 1994). Dans notre travail, on constate que l'activité de cette enzyme augmente aux faibles concentrations de cadmium pour chuter ensuite aux fortes concentrations. Ceci pourrait s'expliquer par le fait qu'aux faibles concentrations de cadmium, il y a déclenchement des systèmes de détoxification qui pour la plus part sont formés d'enzymes dont principalement la catalase. Ceci permet ainsi à la plante de tolérer puis de s'adapter au xénobiotique ce qui se traduit par une augmentation de ces enzymes (CAT). Aux fortes concentrations de cadmium, les systèmes en question sont dépassés et les enzymes sont complètement inhibées ceci est en parfait accord avec les travaux de Chaoui *et al.*, (1997) et Cho et Park, (2000).

Une étude menée par Maria et *al.*, (2009) sur l'Écophysiologie de la tolérance d'*Elodea canadensis* à l'exposition au nickel, montre qu'une augmentation de l'activité CAT est observée.

L'APX réduit H₂O₂ en eau en utilisant l'ascorbate comme donneur d'électron qui résulte de la dehydro ascorbate. Il est recyclé en ascorbate qui utilise la GSH comme donneur d'électron et le Glutathion oxydé (GSSG) est converti en GSH par NADP-H qui dépend de l'enzyme glutathion réductase (Asada et Takahashi, 1987).

L'activité APX, enzyme très importante dans le système de défense, induit une réponse aux différents traitements de Cd chez les racines de tomate. L'APX protège la cellule contre les dommages oxydatives par H₂O₂ toxique (Sbartai, 2008). Nos résultats sont comparable à ceux obtenus par (Kampfenkel et *al.*, 1995 ; Wecky et Clijsters, 1996 ; Patra et Panda, 1998 ; Prasad et *al.*, 1999 ; Rucinska et *al.*, 1999 et Gallego et *al.*, 2002) sur l'activité APX. La stimulation de cette enzyme traduit bien la mise en place chez les cellules des plantes traitées d'un état de tolérance.

La proline est un acide aminé souvent considéré comme un biomarqueur de stress (Dinakar *et al.*, 2008 ; Szabados et Savouré, 2009). L'accumulation de la proline constitue aussi un véritable mécanisme de tolérance au stress (Slama et *al.*, 2005). L'existence chez les céréales d'une variation intra spécifique pour l'accumulation de la proline sous l'effet du stress hydrique suggère la possibilité d'une sélection, sur la base de ce caractère, des géotypes qui auront une bonne capacité à survivre et un rendement en grains stable en conditions hydriques limitantes (Bergareche et *al.*, 1993). Pour cette

raison, certains auteurs comme, Bellinger et *al.*, (1991) proposent l'accumulation de la proline comme technique de sélection.

Selon un autre point de vue, l'accumulation de proline n'est pas une réaction d'adaptation au stress, mais plutôt le signe d'une perturbation métabolique (Hanson et *al.*, 1977; Hernandez et *al.*, 2000). L'origine de la proline accumulée sous stress n'est pas totalement éclaircie. Elle est soit synthétisée de nouveau à partir de l'acide glutamique (Glu) ou via l'ornithine (Orn), qui sont utilisés comme précurseurs (Samaras et *al.*, 1995).

Les hydrates de carbone peuvent être des facteurs essentiels dans l'accumulation de la proline, car la synthèse des protéines est liée automatiquement au métabolisme des glucides et à la respiration (dans le cycle de Krebs) par l'intermédiaire l' α céto-glutarate qui forme le statut carbonique pour la synthèse de la proline (Chaib, 1998). L'addition de l'ornithine dans le milieu de culture augmente la source de la proline par l'intermédiaire de l'enzyme ornithine-amino-transférase (Chaib, 1998). L'accumulation de la proline induite par les stress, peut être le résultat de trois processus complémentaires : stimulation de sa synthèse ; inhibition de son oxydation et/ou altération de la biosynthèse des protéines (Tahri et *al.*, 1998).

La cinétique de la fluorescence chlorophyllienne est utilisée pour étudier les effets des stress abiotiques sur le rendement de la photosynthèse et principalement sur l'activité des photosystèmes PSII (Krause et Weis, 1991). Djekoun et Planchon, (1991) ont confirmé l'intérêt des mesures *in vivo* de la fluorescence chlorophyllienne pour

l'étude de l'adaptation des plantes cultivées aux contraintes de l'environnement. Il est clairement exposé dans la littérature que la photosynthèse et les échanges gazeux des feuilles sont affectés par plusieurs stress dont, la salinité, le stress hydrique, le stress métallique, la compaction du sol, une nutrition inadéquate...etc. (Thripathi et Tripathi, 1999).

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

Les résultats de (Alayat, 2015) soulignent que le cadmium induit un abaissement des concentrations en chlorophylles (a, b et a+b) et en caroténoïdes chez les céréales. Ceci s'accorde avec de nombreux travaux qui rapportent une réduction de la concentration en chlorophylle sous l'effet du cadmium (Wang *et al.*, 2006 ; Groppa *et al.*, 2007) et des métaux lourds en général (Mysliwa-Kurdziel *et al.*, 2002 ; Li *et al.*, 2007). D'autres auteurs (Van Assche et Clisters, 1990 ; Farago, 1994 ; Oncel *et al.*, 2000) rapportent que le cadmium pourrait empêcher la formation du complexe photoactif photochlorophyllide- NADPH- Enzyme en inhibant l'enzyme protochlorophyllide réductase ou encore la γ -aminolévalinique déshydrogénase et ce suite à l'interaction du cadmium aux groupements thiols (SH) des enzymes.

Les investigations basées sur des évaluations de la fluorescence chlorophyllienne ont prouvé que le PSII est tout à fait résistant au stress hydrique. Une grande partie du stress hydrique a été orientée pour diriger les effets de la déshydratation sur les réactions biochimiques de la photosynthèse (Heitholt *et al.*, 1991).

Yakhlef et Djekoun, (2000) suggèrent que la survie des plantes au manque d'eau est en partie due à l'entretien de la capacité photosynthétique des feuilles, permettant le rétablissement rapide des plantes suite à une période de stress hydrique.

Sous un stress hydrique, une diminution de la teneur en chlorophylle est remarquée chez le blé dur (Bousba *et al.*, 2009). Pour limiter les pertes en eau par évaporation et aussi l'augmentation de la résistance à l'entrée du CO₂ atmosphérique nécessaire à la photosynthèse, l'économie de l'eau se traduit par une turgescence relative moins affectée par le stress conduisant à une dilution de la chlorophylle (Slayter, 1974).

Tahri *et al.*, (1998) mettent en évidence une augmentation de la teneur en proline foliaire sous l'effet du stress suivie par un abaissement dans les teneurs en pigments chlorophylliens totaux (Chlorophylles *a* et *b*).

Les résultats de Tahri *et al.*, (1998) révèlent une certaine proportionnalité, mais inverse, entre les teneurs en proline accumulées et les teneurs en pigments chlorophylliens perdues. Ainsi la variété qui accumule plus de proline est aussi celle qui connaît la plus forte diminution de ses teneurs en pigments chlorophylliens et vice versa (Tahri *et al.*, 1998).

Après l'entrée symplastique dans le xylème, les métaux lourds sont ensuite transportés vers les parties aériennes par le courant transpiratoire. L'effet le plus habituel et le moins spécifique des métaux lourds consiste en une réduction de la croissance des différentes parties de la plante. Selon l'importance du stress, les feuilles peuvent présenter une chlorose due à la fois à une perte de chlorophylle, à une relative augmentation des caroténoïdes et à une déficience en fer (Romanowska, 2002).

La photosynthèse et la respiration sont deux phénomènes que produisent les plantes vertes. Sous une lumière particulièrement intense, la photosynthèse est le processus dominant. Pendant la nuit, ou en absence de lumière, la photosynthèse cesse, et la respiration devient le processus dominant : la plante consomme des nutriments (pour sa croissance ou une autre réaction métabolique).

Concernant la Respiration, nous avons remarqué que le traitement des plantes d'élodée réduit fortement l'activité respiratoire. Cette inhibition serait d'une part due à la présence des ROS qui sont connus comme éléments perturbateurs aussi bien du métabolisme respiratoire que de la photosynthèse (Kiss et *al.*, 2003 ; Kuciel et Mazurkiewicz, 2004) et d'autre part elle pourrait être expliquée par le passage rapide du cadmium à l'intérieur des racines.

En effet, il a été montré qu'au niveau des racines de blé dur certains canaux calciques voltage dépendant de la membrane plasmique connus sous l'appellation (RCA) et qui contrôlent $\Delta\Psi$ membranaire, sont perméable au cadmium et ceux en absence de Ca^{++} (White, 2000). Cette pénétration rapide du cadmium entraîne une forte perturbation de la chaîne respiration plus précisément au niveau du site responsable de

l'oxydation des substrats provenant du cycle de Krebs. Le cadmium peut ainsi inhiber certains enzymes déshydrogénase et les NADPH-dépendants.

Cependant, la consommation d'O₂ diminue sous stress métallique sévère, tout en indiquant des dommages métaboliques (Loesch et Kohl, 1999). Aussi nos résultats vont dans le même sens que ceux de Bouchlaghem et *al.*, (2011), qui explique que l'inhibition de la respiration dû aux effets des poussières métalliques, sur les mousses et les lichens est due à la perturbation de la phosphorylation oxydative mitochondriale. Cette perturbation serait expliquée en partie par l'interférence de certains métaux lourds dans les activités enzymatiques et respiratoires par conséquent, dans le mécanisme de phosphorylation de l'ADP en l'ATP par l'ATPase.

Les métaux lourds sont signalés pour influencer les échanges gazeux respiratoires. Nos résultats appuyent ceux de Maria et *al.*, (2009) sur la tolérance du nickel chez « *Elodea canadensis* », il a été noté que l'impact de la respiration dans la quantité totale d'échange d'oxygène a été légèrement améliorée après le traitement d'*Elodea* avec Ni. Le traitement avec des concentrations plus élevées de Ni conduit à une diminution progressive de la respiration.

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

Il est connu que les photosynthétats frais ont une influence bien plus nette sur le métabolisme énergétique que les photosynthétats de réserve (Leclerc, 1999).

Les métaux induisent également une réduction de l'activité de la photosynthèse qui résulte soit d'un effet direct sur le transport des électrons et les enzymes du cycle de Calvin (en particulier de la Rubisco) soit d'un effet indirect, en raison d'une diminution de la teneur en chlorophylle (Stobart et *al.*, 1985 ; Van Assche et Clijsters, 1986 ; Chatterjee et Chatterjee, 2000 ; Mysliwa-Kurdziel et Strzalka, 2002 ; Romanowska, 2002).

On contraste avec la photosynthèse, une stimulation de la respiration souvent observée, en réponse aux métaux lourds qui pourrait s'expliquer par une demande accrue d'ATP, générée par la phosphorylation oxydative, permettant de compenser la production limitée d'ATP par photophosphorylation (Romanowska et *al.*, 2002).

Conclusion

Face à l'extension de la contamination de la biosphère à cause de la pollution engendrée par le développement économique, il est indispensable de tenter, de protéger l'environnement de l'homme et les ressources renouvelables et donc la mise au point des outils nécessaires pour évaluer et surveiller la santé de l'environnement.

De nombreux macrophytes sont distingués par leur rôle de filtration et d'épuration hydrique. L'effet épuratif spécifique à ces plantes aquatiques, dépend de leur résistance vis-à-vis des ingrédients actifs provoquant d'éventuels effets secondaires, sur leur métabolisme.

Les capacités d'épuration de « *Elodea canadensis* » lui permettent de filtrer les eaux usées, grâce au grand pouvoir absorbant de leur système racinaire. Ce dernier possède une grande faculté d'absorber les xenobiotiques et un taux d'accumulation élevé.

Notre travail vient confirmer les observations des travaux réalisés préalablement sur d'autres espèces végétales et particulièrement « *Elodea canadensis* » par rapport à l'effet des concentrations croissantes de cadmium et de zinc sur certains métabolismes biochimiques.

Les résultats obtenus quant à l'effet des xénobiotiques sur l'élodée permettent de noter un certain nombre de points :

L'utilisation du cadmium et du zinc comme source de stress pour l'élodée nous a permis de mieux comprendre ces comportements vis-à-vis des polluants. Les résultats obtenus prouvent bien la présence d'un stress oxydant en réponse à l'accumulation des xénobiotiques au niveau des tissus du Macrophyte.

Ce stress se traduit par une inhibition du taux des chlorophylles à 7 jours du traitement, une augmentation du taux des protéines à 7 et 14 jours du traitement ; la croissance pondérale est affectée par la présence du polluant où on observe une diminution de ce paramètre en fonction des différentes concentrations du métal et du temps, et enfin une augmentation du taux de proline après 14 jours en fonction des mêmes concentrations de Cd et de Zn et par rapport aux témoins.

En ce qui concerne l'étude des biomarqueurs, les résultats obtenus dans cette partie mettent en évidence le potentiel d'accumulation des xénobiotiques dans les plantes aquatiques et la capacité de ces plantes pour survivre aux xénobiotiques dans ces macrophytes. Parallèlement, les enzymes antioxydantes qui protègent les cellules du métabolisme augmentent (APX, CAT, GST) et une diminution du GSH est observée chez « *Elodea canadensis* ».

Enfin concernant les paramètres métaboliques, à savoir la respiration et la photosynthèse, il apparaît clairement qu'elles sont très affectées en présence du Cd et Zn. Il faut noter que les effets du cadmium observés sur « *Elodea canadensis* », nous laissent supposer que les deux phénomènes touchés par le cadmium et le zinc sont la respiration et la photosynthèse, pour cela le rôle que pourrait jouer la mitochondrie et le chloroplaste reste à élucider.

Il en ressort de cette étude que le stress oxydant engendré par la présence des métaux lourds chez une plante aquatique « *Elodea canadensis* » peut être diminué ou corrigé par la présence de certains biomarqueurs qui font partie du système de défense de la plante.

Perspectives

Au terme de cette étude, il serait en effet intéressant de :

- Compléter ces résultats par une étude histologique
- Analyser l'évolution de l'activité respiratoire des mitochondries isolées à partir des racines des plantes « *Elodea canadensis* » en fonction des différentes concentrations de cadmium et de zinc.
- Identifier et évaluer les paramètres physico-chimiques des eaux purifiées par les macrophytes.
- Effectuer des tests de génotoxicité sur les feuilles d'élodée à fin de déterminer l'impact du cadmium et le zinc sur le génome.

Aarab N, 2004. Les biomarqueurs chez les Poissons et les Bivalves : de l'exposition à l'effet et du laboratoire au terrain. Thèse de Doctorat en Science du Vivant, Géosciences, et Science de l'environnement, option : Ecotoxicologie des milieux aquatiques, 276 p.

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

Alayat A, 2015. Etude de l'impact toxicologique de certains agents chimiques sur la qualité des céréales: « Cas du blé et de l'orge ». Thèse de Doctorat obtenue à l'Université de Badji Mokhtar –ANNABA, pp 78- 86.

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

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

Arora A; R Sairam et G Srivastava, 2002. "Oxidative stress and antioxidative system in plants" *Current Science* 82(10): 1227-1238.

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

Babich, H. and Stotzky, G. 1977a. Effect of cadmium on fungi and on interactions between fungi and bacteria in soil: influence of clay minerals and pH. *Appl. Environ. Microbiol.* 33, 1059-1066.

Babich, H. and Stotzky, G. 1977b. Sensitivity of various bacteria, including actinomycetes and fungi to cadmium and the influence of pH on sensitivity. *Appl. Environ. Microbiol.*, 33, 681-695.

Babich, H. and Stotzky, G. 1980. Environmental factors that influence the toxicity of heavy metals and gaseous pollutants to microorganisms, *Crit. Rev. Microbiol.* 8, 99-145.

Baize, D. 1997. Teneurs totales en éléments traces métalliques dans les sols (France). INRA.Editions, Paris, p 408.

Barcelo J. et Poschenrieder C., 1990 : Plant water relations as affected by heavy metal stress :a review. *J. Plant Nutr.* 13 : 1-37.

Beji Sassi A., Sassi S, 1999. Le cadmium associé aux dépôts phosphatés en Tunisie méridionale (cadmium associated with phosphate deposits in southern Tunisia). *J Afr Earth Sci*, 29, 501-513.

Bellinger Y., Bensaoud A., Larher F., 1991. Physiological significance of proline accumulation, a trait of use to breeding for stress tolerance. Colloque Physiology Breeding of winter Cereals for Stressed Mediterranean Environments, Montpellier (France). Ed. Les colloques .55. Inra. Paris.

Bergareche C., Llusia J., Febrero A., Bort J., Araus J.L., 1993. Effect of water stress on proline and nitrate content of barley relationships with osmotical potential, carbon isotope ratio and grain yield. Colloque Diversité génétique et amelioration variétale. Montpellier (France). *Les colloques*.64. (éd). Inra. Paris.

Bigot A, 2009. Identification et étude de l'expression de gènes de détoxification chez les bivalves d'eau douce *Unio tumidus* et *Corbicula fluminea*: Approches en laboratoire et en milieu naturel. Thèse de doctorat. Université Paul Verlaine de Metz, France.189 p.

Boening D.W, 1999. An evaluation of bivalves as biomonitors of heavy metals pollution in marine waters. *Environmental monitoring and assessment*, 55: 459-470.

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

Borgmann U, 2000. Methods for assessing the toxicological significance of metals in aquatic ecosystems: bio-accumulation-toxicity relationships, water concentrations and sediment spiking approaches. *Aquatic Ecosystem Health and Management*, 3: 277-289.

Bouchelaghem S. Djebbar Berrebbah H. Djebbar M.R, 2011. The impact of dust emits by the steel complex of El Hadjar (ANNABA) on two biological models: Mousses and lichens. *African Journal of Biotechnology* Vol. 10(18), 3574-3578

Bousba R., Ykhlef N., Djekoun A., 2009. Water use efficiency and flag leaf photosynthetic in response to water deficit of durum wheat (*Triticum durum Desf*). *World Journal of Agricultural Sciences* 5. 5: 609 - 616.

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

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

Buhler D.R., 1972. Environmental contamination of toxic metal. In "*heavy metals in the environment*" 20 p. Oregon State Univ. Corvallis. Oreg.

Burger J, 2006. Bioindicators: a review of their use in the environmental literature 1970-2005. *Environmental bioindicators*, 1: 136-144.

Burton G.A, 1992. *Sediment toxicity assessment*. Lewis Publishers, London, 211 p. Cai X, Liu W, Jin M, Lin K., 2007. Relation of diclofop-methyl toxicity and degradation in algae cultures. *Environ Toxicol Chem* 26, 970-975.

Cai X, Liu W, Jin M, Lin K., 2007. Relation of diclofop-methyl toxicity and degradation in algae cultures. *Environ Toxicol Chem* 26, 970-975.

Cajaraville M. P., Hauser L., Carvalho G., Hylland K., Olabarrieta I., Lawrence A. J., Lowe D., Goksoyr A, 2003. Genetic damage and the molecular/cellular response to pollution. In: Effects of pollution on fish, molecular effects and population responses. Eds. Lawrence A. J., Hemingway K. L. Blackwell Sciences.14-82 p

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

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

Chaib .G, 1998. Teneur en proline chez les différents organes de blé dur (*Triticum durum Desf*). Essai d'explication des conditions d'accumulation sous manque d'eau. Thèse de Doctorat. Univ. Constantine

Chaignon V, 2001 : Biodisponibilité du cuivre dans la rhizosphère de différentes plantes cultivées. Cas de sols viticoles contaminés par des fongicides. Thèse de Doctorat. Université d'Aix-Marseille.

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

Chaoui A., Jarrar B. et El Ferjani E., 2004: Effects of cadmium and copper on peroxidase, NADH oxydase and IAA oxidase activities in cell wall, soluble and microsomal membrane fractions of pea roots. *J. Plant Physiol.* 161: 1225-1234.

Chatterjee J. et Chatterjee C., 2000: Phytotoxicity of cobalt, chromium and copper in cauliflower. *Environ. Pollut.* 109 : 69-74.

Chaudhary, A.K., Reddy, G.R., Blair, I. A., Marnett, L.J., 1996. Characterization of an N6-oxopropenyl-2'-deoxyadenosine adduct in malondialdehyde - modified DNA using liquid chromatography /electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Carcinogenesis*,17, 1167-70.

Chaudhry Q, Schröder P, Werck-Reichhart D, Grajek W, Marecik R., 2002. Prospects and limitations of Phytoremediation for the removal of persistent pesticides in the environment. *Environ Sci Pollut R* 9, 4-7.

Chen, H.J., Chung, F.L., 1996. Epoxidation of trans-4-hydroxy-2-nonenal by fatty acid hydroperoxides and hydrogen peroxide. *Chem Res Toxicol*,9, 306-312.

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

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

Clemens S, 2001. Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. *Planta* 212: 475-486

Clemens S., 2006a. Evolution and function of phytochelatin synthases." *Journal of Plant Physiology* 163(3): 319-332.

Clemens S., 2006b. Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. *Biochimie* 88(11): 1707-1719.

Clijsters, H., Cuypers, A., Vangrosveld, J., 1999. Physiological responses to heavy metals in higher plants: defence against oxidative stress. *Verlag Z. Naturforsch.* 54, 730–734.

Cobbett C.S, 2000. Phytochelatin and their roles in heavy metal detoxification. *Plant Physiology* 123 : 825-32.

Cobbett C, Goldsbrough P, 2002. Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annu Rev Plant Biol* 53: 159-182

Connell DW., Chaisuksant Y. & Yu J ., 1999. Importance of Internal Biotic Concentrations in Risk evaluations with Aquatic Systems. *Mar Pollut Bull*39., 1-12:54-61.

Cossu, C., Doyotte, A., Jacquin, M.C., Vasseur, P. 1997a. Biomarqueurs du stress oxydant chez les animaux aquatiques. In: Biomarqueurs en écotoxicologie – Aspects fondamentaux (eds. Lagadic L., Caquet T., Amiart J. C., Ramade F.), 149-163p, Paris.

Cseh E., 2002. Metal permeability, transport and efflux in plants. In :Physiology and Biochemistry of Metal Toxicity and Tolerance in Plants. Prasad M.N.V et Strzalka K. (eds). pp 1-36.

Cunningham, S.D., and W.R. Berti, and J.W. Huang; 1995. Phytoremediation of contaminated soils. *Trends Biotechnol.* 13, 393-397.

Cunningham SD, Anderson TA, Schwab P, Hsu FC, 1996. Phytoremediation of soils contaminated with organic pollutants. *Adv Agron* 56, 55-114.

D'adamo R., Di Stasio M. et Fabbrochini A., 2008. Migratory crustaceans as biomonitors of metal pollution in their nursery areas. The Lesina lagoon (SE Italy) as a case study. *Environmental monitoring and assessment*, 143: 15-24

Daby D., 2006. Coastal pollution and potential biomonitors of metals in Mauritius. *Water, Air and soil pollution*, 174: 63-91.

Dagnelie, P., 1999. Statistiques théoriques et appliquées. Tome2 : références statistiques à une et à deux dimensions. Bruxelles. Univ De boeck et Larcier, 659p.

DalCorso G, Farinati S, Maistri S, Furini A, 2008. How plants cope with cadmium: staking all on metabolism and gene expression. *J Integr Plant Biol* 50: 1268-1280.

De Carvalho RF, Bromilow RH, Greenwood R, 2007. Uptake of pesticides from water by curly waterweed *Lagarosiphon major* and lesser duckweed *Lemna minor*. *Pest Manag Sci* 63, 789-797.

Deneux-Mustin, S., Roussel-Debet, S., Mustin, C., Henner, P., Munier-Lamy, C., Colle, C., Berthelin, J., Garnier-Laplace, J., Leyval, C. 2003. Mobilité et transfert racinaire des éléments en traces : influence des micro-organismes du sol. TEC & DOC, Paris.

Dhir B, Sharmila P, Saradhi P, 2009. Potential of aquatic macrophytes for removing contaminants from the environment. *Crit Rev Env Sci Tec* 39, 754-781.

Dinakar N., Nagajyothi P.C., Suresh S., Udaykiran Y., Damodharam T. 2008. Phytotoxicity of cadmium on protein, proline and antioxidant enzyme activities in growing *Arachis hypogaea* L. seedlings. *Journal of Environmental Sciences* 20: 199-206.

Dixon D.P., Mc Ewen A.G., Laphorn A.J. et Edwards R., 2003. Forced evolution of herbicide detoxifying glutathione transferase. *The journal of biological chemistry*, 278, (26): 23930-23935

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

Djekoun A., Planchon C., 1991. Tolerance to leaf water potential in soybean genotypes. *Euphytica*. **55**: 247 - 253.

Dreier W. & Goring M., 1974. Deen flus hoher salzkonzentrationen auf vershidene physiologische parameter von maiswurzeln wiss. Z. der HU. Berlin Nath. Naturwiss R., 23: 641- 644.

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

Epron D., Toussat M.L. and Badot P.M., 1999. Effect of sodium chloride salinity on root growth and respiration in oak seedlings. *Ann. For. Sci.* 56: 41-47.

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

Fassett D.W., 1974. Cadmium. In: Lee, D.H.K., Editor, 1974. Metallic contaminants and Human Health, *Academic Press, New York*.

Favier, A., 2003. Le stress oxydants: mécanismes biochimiques: Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *Actualité chimique*, 108-115.

Fodor F., 2002. Physiological responses of vascular plants to heavy metals. In: Physiology and Biochemistry of Metal Toxicity and Tolerance in Plants, Prasad M.N.V. et Strzalka K.eds, Kluwer Academic Publishers, Netherlands, pp. 149-177.

Foy, C.D., Chaney R.L. and White, M.C. 1978. The physiology of metal toxicity in plants, *Rev. Plant Physiol.* 29, 511-566.

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

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

Foyer CH, FL Theodoulou and S Delrot ., 2001. "The functions of inter- and intracellular glutathione transport systems in plants." *Trends in Plant Science* 6(10): 486-492.

Foyer C.H., Noctor G., 2003. Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiologia Plantarum* 119: 355-364.

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

Funes, V., Alhama, J., Navas, J.I., López-Barea, J., Peinado, J., 2005. Ecotoxicological effects of metal pollution in two mollusc species from the Spanish South Atlantic littoral. *Environ. Pollut.* 139, 214-23.

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

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

Gao J, Garrison AW, Hoehamer C, Mazur CS, Wolfe NL, 2000. Uptake and phytotransformation of organophosphorus pesticides by axenically cultivated aquatic plants. *J Agr Food Chem* 48, 6114-6120.

Gardea-Torresdey J.L., Peralta-Videa J.R., de la Rosa G., Parsons J.G. 2005. Phytoremediation of heavy metals and study of the metal coordination by X-ray absorption spectroscopy. *Coordination Chemistry Reviews* 249 : 1797-1810.

Gardés-Albert M., Bonnefont – Rousselot D., Abedinzadeh Z. et Jore D., 2003. Espèces réactives de l'oxygène. *L'actualité chimique*, pp.91-96.

George, G.S., Buchanan, G., 1990. Isolation, properties and induction of plaice liver cytosolic glutathione S-transferases. *Fish Physiology and Biochemistry*, 8, 437-449.

Giguère, A., Couillard, Y., Campbell, P.G.C., Perceval, O., Hare, L., Pinel-Alloul, B., Pellerin, J., 2003. Steady-state distribution of metals among metallothionein and other cytosolic ligands and links to cytotoxicity in bivalves living along a polymetallic gradient. *Aquat. Toxicol*, 64, 185-200.

Giller, E. K., Witter, Ernst. and Mcgrath, P.S. 1998. Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils. *Soil. Biol. Biochem.* 30, 1389-1414.

Gouia H.; Ghorbal M. H. and Meyer C., 2000. Effects of cadmium on activity of nitrate reductase and on other enzymes of the nitrate assimilation pathway in bean. *Plant physiol. Biochem.* 38 (7): 629-638.

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

Groppa M.D., Ianuzzo M.P., Tomaro M.L. et Benavides M.P., 2007a : Polyamine metabolism in sunflower plants under long-term cadmium or copper stress. *Amino Acids* 32 : 265-275.

Groppa M.D., Tomaro M.L. et Benavides M.P., 2007b : Polyamines and heavy metal stress : the antioxidant behavior of spermine in cadmium- and copper-treated wheat leaves. *BioMetals* 20 : 185-195.

Gutteridge, J.M.C., Halliwell, B., 1990. The measurement and mechanisms of lipid peroxidation in biological systems. *Trends biochem. Sci.* 15, 129–135.

Gyuris J, E Golemis, H Chertkov and R Brent ., 1993. "Cdi1, a human G1 and S phase protein phosphatase that associates with Cdk2." *Cell* 75(4): 791-803.

Haag-Kerwer A., Schäfer H.J., Heiss S., Walter C. et Rausch T., 1999 : Cadmium exposure in *Brassica juncea* causes a decline in transpiration rate and leaf expansion without effect on photosynthesis. *J. Exp. Bot.* 50 : 1827-1835.

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

Hanson A.D., Nelson C.E., Everson E.H., 1977. Evaluation of free proline accumulation as an index of drought resistance using two contrasting barley cultivars. *Crop Sci.*, 17: 720-726.

He ZL, Yang XE, Stoffella PJ 2005a. Trace elements in agro ecosystems and impacts on the environment. *J Trace Elem Med Biol* 19: 125-140.

Heitholt J.J., Johnson D.M., Ferris L., 1991. Stomatal limitation to carbon dioxide assimilation in nitrogen-and drought-stressed wheat. *Crop Sci.* 31: 135 -139 p.

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

Hernandez S., Deleu C., Larher F., 2000. Accumulation de proline dans les tissus foliaire de tomates en réponse à la salinité. *Life Science*, 323: 551-557.

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

Holden,M., 1975. *Chlorophylls I,chemistry and biochemistry of plant pigments.* 2ème édition.T.W.Goodwin.Academic press Edition.New York.pp.1-37

Huang H., Wu., J.Y. & Wu., J.H., 2007. Heavy metal monitoring using bivalved shellfish from Zhejiang coastal waters, East China Sea. *Environmental monitoring and assessment*, **129**: 315-320.

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

INERIS 2000. Fiche de données écotoxicologiques et environnementales des substances chimiques. Le ZINC. Version1, Institut Nationale de l'Environnement Industriel et des Risques.p, p. 58.

Israr M, Sahi SV., 2006. Antioxidative responses to mercury in the cell cultures of *Sesbania drummondii*. *Plant Physiol. Biochem.* 44: 590- 595.

Johnson D., 2008. Environmental indicators: their utility in meeting the OSPAR Convention's regulatory needs. *ICES journal of marine science*, 65: 1387-1391.

Kabata-Pendias A, Pendias H, 2001. Trace elements in soils and plants. Third Edition. CRC Press Press, Boca Raton, Florida.

Kaiser J., 2001. Bioindicators and Biomarkers of Environmental Pollution and Risk Assessment (Enfield: Sciences publishers inc).

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

Kelly J.M., Parker G.R. et Mcfee W.W., 1979. Heavy metal accumulation and growth of seedling of five species as influenced by soil cadmium level. *J. Environ. Qual*, 8(3): 361-364.

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

Klobus G., Burzynski M. et Buczek J., 2002. Heavy metals and nitrogen metabolism. *In* : Physiology and Biochemistry of Metal Toxicity and Tolerance in Plants, Prasad M.N.V. et Strzalka K. eds, Kluwer Academic Publishers, Netherlands, pp –355.

Krause G.H., Weis E., 1991. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. *Ann. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* (42): 313 -349.

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

Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J-C., Ramade, F., 1997. Biomarqueurs en écotoxicologie. *Collection Ecologie*, Masson, Paris, 53-66 p.

Lamy, I. 2002. Réactivité des matières organiques des sols vis-à-vis des métaux. *Journées nationales de l'étude des sols*. p 22.

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

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

Li, L.Y. and Li, R.S. 2000. The role of clay minerals and effect of H⁺ ions on removal of heavy metal (Pb²⁺) from contaminated soil. *Can. J. Geotech/Rev.* 37, 296-307.

Li S.W., Xue L.G., Xu S.J., Feng H.Y., An L.Z. 2007. Hydrogen peroxide involvement in formation and development of adventitious roots in cucumber. *Plant Growth Regulation* 52: 173-180.

Lindberg S. et Greger M., 2002. Plant genotypic differences under metal deficient and enriched conditions. *In* : Physiology and Biochemistry of Metal Toxicity and Tolerance in Plants, Prasad M.N.V. et Strzalka K. eds, Kluwer Academic Publishers, Netherlands. pp 357-393.

Loesch, R., Kohl, K.I., 1999. Plant respiration under the influence of heavy metals. In: Prasad, M.N.V., Hagemeyer, J. (Eds.), *Heavy Metal Stress in Plants – From Molecules to Ecosystems*. Springer, Berlin, pp. 139–156.

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

Lopes, P.A., Pinheiro, T., Santos, M.C., Mathias, M.D.L., Collares-Pereira M.J., ViegasCrespo A.M. 2001. Response of antioxidant enzymes in freshwater fish populations (*Leuciscusalburnoides* complex) to inorganic pollutants exposure. *The Science of the Total Environment*, 280, 153-63.

Maria G. Maleva, Galina F. Nekrasova , Przemysław Malec , M.N.V. Prasad , Kazimierz Strzałka ., 2009. Ecophysiological tolerance of *Elodea canadensis* to nickel exposure _ 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved. doi:10.1016/j. chemosphere. 77 (2009) 392–398

Marrs K.A., 1996. The function and regulation of glutathione *S*-transferases in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47: 127-158.

Maury-Brachet E, Ribeyre F, Boudou A., 1990. Actions and interactions of temperature and photoperiod on mercury accumulation by *Elodea densa* from sediment source. *Ecotox Environ Safe* 20, 141-155

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

McBride MB 2004. Molybdenum, sulfur, and other trace elements in farm soils and forages after sewage sludge application. *Commun Soil Sci Plant Anal* 35: 517

McCarthy J.F. & Shugart L.R., 1990. Biomarkers of environmental contamination. *Lewis Publishers, Boca Raton*.

McCord, J.M., Fridovich, I., 1969. Superoxide dismutase. *Journal of Biological Chemistry*, 244, 6049 -6055.

McFarland, V.A., Inouye, L.S., Lutz, C.H., Jarvis, A.S., Clarke, J.U., McCant, D.D., 1999. Biomarkers of oxidative stress and genotoxicity in livers of field-collected brown bullhead, *Ameiurus nebulosus*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 37, 236-41.

McGrath, S.P., 1998. Phytoextraction for Soil Remediation. In: Brooks, R.R. (Ed.). *Plants that hyperaccumulate heavy metals*. CABI Publishing, Wallingford, pp. 261-287.

Mittler, R., 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 7, 405–410.

Mitsou K, Koulianou A, Lambropoulou D, Pappas P, Albanis T, Lekka M., 2006. Growth rate effects, responses of antioxidant enzymes and metabolic fate of the herbicide Propanil in the aquatic plant *Lemna minor*. *Chemosphere* 62, 275-284.

Morin, D., Zini, R., Tillement, S.P., Burdeau, A., 2004. Prevention of cell damage in ischemic-reperfusion: mitochondrial respiratory chain as a pharmacological target. *Letters in drugs & Discovery*, 1: 279-284.

Moustakas, M., Lanaras, T., Symeonidis, L., Karataglis, S., 1997. Growth and some photosynthetic characteristics of field grown *Avena sativa* under copper and lead stress. *Photosynthetica* 30: 389-396.

Mueller MJ., 2004. "Archetype signals in plants: the phytoprostanes." *Current Opinion in Plant Biology* 7(4): 441-448.

Mysliwa-Kurdziel B. et Strzalka K., 2002 : Influence of metals on biosynthesis of photosynthetic pigments. *In* : *Physiology and Biochemistry of Metal Toxicity and Tolerance in Plants*, Prasad M.N.V. et Strzalka K. (eds), Kluwer Academic Publishers, Netherlands, pp. 201-227.

Nagalakshmi, N., Prasad, M.N.V., 2001. Responses of glutathione cycle enzymes and glutathione metabolism to copper stress in *Scenedesmus bijugatus*. *Plant Sci* 160: 291-299.

Nakano, Y. Azada, K., 1987. Purification of ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts : its inactivation in ascorbate depleted medium and reactivation by monodehydro ascorbateradical. *Plant Cell Physiol.*28: 131-140.

Nriagu, J.O., 1991. Human influence on the global cycling of trace metals. In: J.D. Farmer (Ed.), *Heavy Metals in the Environment*. CEP Consultants, Edinburgh, pp. 1-5.

Nriagu, J.O., 1996. A History of Global metal Pollution. *Science*, 272(april): 223-224.

Nordberg, J., Arnér, E.S.J., 2001. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radical Biology and Medicine*, 31, 1287-1312.

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 seedling. *Environmental Pollution*, 107: 325-320.

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.

Peakall D.B ., 1992. Animal biomarkers as pollution indicators. London: *Chapman Prog. Ser.*, 162: 125-135.

Perfus-Barbeoch L, Leonhardt N, Vavasseur A, Forestier C 2002. Heavy metal toxicity: cadmium permeates through calcium channels and disturbs the plant water status. *Plant J* 32: 539-548.

Pieret N., Delbart E. 2007. Fiches descriptives des principales espèces de plantes invasives en zones humides FUSAGx-Ecologie. L'élodée du Canada – *Elodea canadensis* Michaux. Cellule d'appui à la gestion des plantes invasives. Proposition de méthodes de gestion préventives et actives de la problématique des plantes invasives aux abords des cours d'eau non navigables en Région wallonne.

Pokorny B, Al Sayegh-Petkovsek S, Ribaric- Lasnik C, Vrtacnik J, Doganoc DZ, Adamic M, 2004. Fungi ingestion as an important factor influencing heavy metal intake in roe deer: evidence from faeces. *Sci Total Environ* 324: 223-234

Poschenrieder C., Gunsé B. et Barcelo J., 1989. Influence of cadmium on water relations, stomatal resistance and abscisic acid content in expanding bean leaves. *Plant Physiol.* 90. 1365-1371.

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

Rao J.V., Kavitha P., Srikanth K., Usman P.K. & Rao T.G., 2007. Environmental contamination using accumulation of metals in marine sponges, *Sigmadocia fibulata* inhabiting the coastal waters of Gulf of Mannar, India. *Toxicological and environmental chemistry.*, 89: 487-498.

Rauser WE, 1999. Structure and function of metal chelators produced by plants: the case for organic acids, amino acids, phytin, and metallothioneins. *Cell Biochem Biophys* 31: 19-48.

Rice PJ, Anderson TA, Coats JR., 1997. Phytoremediation of herbicidecontaminated surface water with aquatic plants. *ACS Symposium Series* 664, 133-151.

Romanowska E., 2002. Gas exchange functions in heavy metal stressed 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 257- 285.

Rosenthal H & Sperling, K. R., 1974. Effects of cadmium on development and survival of herring eggs. *In* " *The Early Life History of Fishes* " (J. H. S. Blaxter , Ed.), Springer

Roth U, von Roepenack-Lahaye E., Clemens S. 2006. Proteome changes in *Arabidopsis thaliana* roots upon exposure to Cd²⁺. *Journal of Experimental Botany* 57 (15) : 4003-4013.

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

Rusty D et al., 2014. Environmental specimen banks as a resource for mercury and mercury isotope research in marine ecosystems, *Environ. Sci.: Processes Impacts*, 2014,16, 10-27

Saint-Maxent T., 2002. Les espèces animales et végétales susceptibles de proliférer dans les milieux aquatiques et subaquatiques – Fiches synthèse espèces végétales. Agence de l'Eau Artois Picardie. 144p.

Salt DE, Smith RD, Raskin I, 1998. Phytoremediation. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 49: 643-668

Samaras Y., Bresson R.A., Csonka L.N., Garcia-Rios M.G., Paino D'Urzo M. & Rhodes D., 1995. Proline accumulation during drought and salinity. Environment and plant metabolism, flexibility and acclimation. Oxford BIOS.161: 79- 88.

Sanders, J.R. 1983. The effect of pH on the total and free ionic concentrations of manganese, zinc and cobalt in soil solutions. J. Soil Sci. 34, 315-323.

Sanders, J.R., McGrath, S.P., and Adams, T.M. 1986. Zinc, copper and nickel concentrations in ryegrass grown on sewage sludge-contaminated soils of different pH. J. Sci. Food Agr. 37, 961-968.

Sanità di Toppi L, Gabbrielli R, 1999. Response to cadmium in higher plants. Environ Exp Bot 41: 105-130.

Sbartai H., 2008: Etude des effets du cadmium sur la tomate (*Lycopersicon esculentum* L.) : essai *in vivo* et *in vitro*.Thèse de Doctorat de l'Université. Université de Annaba. 154 pages
Sergent, O., Griffon, B., Cillard, P., Cillard, J., 2000. Alcool et stress oxydatif. Patholboil, 49, 689 - 695.

Scandalios, J.G., 2002. The rise of ROS. Trends Biochem. Sci. 27, 483–486.

Servais, S., 2004. Altération mitochondriale et stress oxydant pulmonaire en réponse à l'ozone: Effets de l'âge et d'une supplémentation en oméga-3. Thèse doctorat, Université Claude bernard- Lyon 1, France, pp. 19-35.

Sharma SS, Kumar V, 2002. Responses of wild type and abscisic acid mutants of *Arabidopsis thaliana* to cadmium. J Plant Physiol 159: 1323-1327

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.

Singh, K.P., Mohan, D., Sinha, S., Dalwani, R., 2004. Impact assessment of treated/untreated wastewater toxicants discharged by sewage treatment plants on health, agricultural and environmental quality in the wastewater disposal area. *Chemosphere* 55: 227- 255.

Slayter R., 1974. The effect of internal water status on plant growth development and yield In: plant responses to climatic factors . Proc.of upsal symposium, Unesco.

Slama A., Ben Salem M., Ben Naceur M., Zid E.D., 2005. Les céréales en Tunisie: production, effet de la sécheresse et mécanismes de résistance. Institut national de la recherche agronomique de Tunisie (Inrat). Univ. Elmanar. Tunisie.

Smolders R., Bervoets L., Wepener V. & Blust R., 2003. A conceptual framework for using mussels as biomonitors in whole effluent toxicity. *Human and ecological risk assessment*, 9: 741-760.

Sorensen E.M., 1991. Cadmium In, Metal Poisoning in Fish. *CRC Press, Boca Raton, Florida, USA*, pp. 175-234.

Stobart A.K., Griffiths W.T., Ameen-Bukhari I. et Sherwood R.P., 1985 : The effect of Cd²⁺ on the biosynthesis of chlorophyll in leaves of barley. *Physiol. Plant.* 63 : 293-298.

Stolt J. P., Sneller F. E. C., Bryngelsson T., Lundborg T. And Schat H., 2003. Phytochelatin and Cadmium accumulation in wheat. *Environmental and experimental botany*, 49: 21-28.

Stratton, G., W., Huber, A., L., Corke, c., T., 1979. Effect of mercuric ion on the growth, photosynthesis and nitrogenase activity of *Anabaena inaequalis*. *Applied Environmental Microbiology* 38 : 537.

Susarla S., Victor F. Medina V. F, McCutcheon S.C. 2002. Phytoremediation: an ecological solution to organic chemical contamination. *Ecological Engineering* 18 : 647-658.

Szabados L., Savouré A. 2009. Proline: a multifunctional amino acid. *Trends in Plant Science* 15 : 89- 97.

Tahri E. H., Belabed A. et Sabki K., 1998. Effet d'un stress osmotique sur l'accumulation de la proline et chlorophylle et des ARNm codant pour la glutamine synthétase chez trois variétés de blé dur (*Triticum durum*). Bull. Inst. Sci., Rabat, (21) : 81-87.

Thripathi A.K., Tripathi S., 1999. Change in some physiological and biochemical characters in *Albizia lebbek* as bioindicateurs of heavy metal toxicity. *J. Environ. Biol.*, 20 (2): 93-98.

Toussaint B, 2005. Inventaire de la flore vasculaire du Nord/Pas-de-Calais (Ptéridophytes et Spermaphytes) : raretés, protection, menaces et statuts. Bull. de la Soc. Bot. Nord Fr., vol. 58, fasc. 3 et 4 : I-XXI - 1-107.

Troll and J. Lindsley., 1955. A photometric method for the determination of proline; *J. Biochem*: 655-660.

Tront JM, Saunders FM., 2006. Role of plant activity and contaminant speciation in aquatic plant assimilation of 2,4,5-trichlorophenol. *Chemosphere* 64, 400-407.

Van Assche F. et Clijsters H., 1986 : Inhibition of photosynthesis in *Phaseolus vulgaris* by treatment with toxic concentration of zinc : effect on ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *J. Plant Physiol.* 125 : 335-360.

Van Assche, F., Clijsters, H., 1990. Effects of metals on enzymes activity in plants, *Plant cell Environ.* 13: 195-206.

Van Kauwenbergh SJ, 1997. Cadmium and other minor elements in world resources of phosphate rock. Proceedings of the Fertilizer Society No. 400, London.

Viard, B., Maul, A., Pihan, J.C., 2004. Standard use conditions of terrestrial gastropods in active bio monitoring of soil contamination. Journal of Environmental Monitoring, 6, 103-107.

Viaroli P., Bartoli M., Giordani G., Austoni M. & Zaldivar J.M., 2005. Biochemical processes in coastal lagoons : from chemical reactions to ecosystem functions and properties. Indicators of stress in the marine benthos. IOC workshop report No. 195, pp. 27-30.

Wang, D., Li, H. (2006). Effect of earthworms on the phytoremediation of zinc-polluted soil by ryegrass and Indian mustard. Biol. Fertil. Soils 43, 120-123.

Warwick R., 2005. Taxonomic distinctness as an indicator of stress in the marine macrobenthos. Indicators of stress in the marine benthos, IOC workshop report No. 195, pp.10-11.

Weckbecker, G., Cory, J.G., 1988. Ribonucleotide reductase activity and growth of glutathione depleted mouse *leukemia L 1210* cells in vitro. Cancer letters, 40: 257-264.

Weckx, J., Clijsters, H., 1996. Oxidative damage and defense mechanism in primary leaves of *Phaseolus vulgaris* as result of root assimilation of toxic amounts of copper. Physiol. Plant. 96: 506-512.

White, P.J., 2000. Calcium channels in higher plants Biochimica and Biophysica Acta. 1465: 172-189.

Wollgieh, R., Newmann D., 1995. Stress response of tomato cell cultures to toxic metals and heat shock: differences and similarities. J. Plant Physiol. 146: 736-742.

Ykhlef N., Djekoun A., 2000. Adaptation photosynthétique et résistance à la sécheresse chez le blé dur (*Triticum turgidum L. var. durum*) : Analyse de la variabilité génotypique. Option Méditerranéennes. Série A. 40: 327 -330.

Zhu, Y.L., Pilon-Smits, EAH, Jouanin, L., Terry, N., 1999. Overexpression of glutathione synthetase in indian mustard enhances cadmium accumulation and tolerance. *Plant Physiol.* 119: 73-80.

Zielinski, S., Portner, H.O., 2000. Oxidative stress and antioxidative defense in cephalopods: a function of metabolic rate or age?. *Comp. Biochem. Physiol. B*, 125, 147-160.

Zoghalmi Boulila, L., Djebali, W., Chaib, W., Ghorbel, M.H., 2006. Modification physiologiques et structurales induites par l'interaction cadmium-calcium chez la tomate (*Lycopersicon esculentum*). *C.R Biologies* 329 : 702-711.

Zorrig W, 2009. Recherche et caractérisation de déterminants contrôlant l'accumulation de cadmium chez la laitue « *Lactuca sativa* ». Faculté des sciences de Tunis-Sup Agro Montpellier, 276p.

TOXICOLOGICAL IMPACT ASSESSEMENT OF CADMIUM ON AQUATIC MACROPHYTE: *ELODEA CANADENSIS*

Sabrina Zouainia*, Mohamed Reda Djebar, Hana Sbartai, Asma Cherait,
 Lyes Khene, Housseem Kahli, Houria Berrebbah

1Laboratory of cellular Toxicology, Department of biology, Faculty of science, Badji Mokhtar University, Annaba, Algeria

ABSTRACT: *Eloдея canadensis* is a submersed macrophytes, widely distributed in Aquatic environment and able to remove heavy metals from water. This study examines the Cd toxicity on *Eloдея canadensis*. The aim of this research was to study damaging effects of prolonged cadmium exposure on leaves of *Eloдея canadensis* treated for 7 and 14 days with different concentrations of cadmium (0, 10, 20, 40, 80, 160 μM). These effects have been studied by measuring the plant growth, photosynthetic activities and the stress effects in response to cadmium exposure were also investigated by evaluating the levels of some biomarkers (GSH and GST activity). The results obtained show a dose-related inhibition of the growth and decrease of photosynthetic activities of *Eloдея canadensis* compared to the control. We noted also a significant and dose-related increase in GST activity associated with decrease of GSH level. To deal with the cadmium induced oxidative stress, *Eloдея canadensis* activated antioxidant enzymes to diminish the effects of Reactive Oxygen Species (ROS).

Keywords: *Eloдея Canadensis*, cadmium, Respiratory metabolism, photosynthesis, biomarkers.

INTRODUCTION:

Heavy metals are widely released from human activities, such as agriculture and industries, and considerate high toxic for environment and all living organism, human health included. Effectively, heavy metals are easily transported and accumulated in environment, causing air, ground and water pollutions and the contamination of various organisms (Aksoy *et al.*, 2005).

Cadmium (Cd) is a bivalent, non-essential and highly toxic heavy metal and one of the most studies ones with a well-known phytotoxicity. Indeed, numerous works have indicated that Cd causes nutrient deficiency in plants (Zoghلامي *et al.*, 2006 ; López-Millán *et al.*, 2009) and induces inhibition of chlorophyll biosynthesis and a decline in the photosynthetic rate (Tukaj *et al.*, 2007 ; López-Millán *et al.*, 2009). In addition, Cd greatly disturbed the cell wall organization and affected membrane-located activities, as ATP production (Dorta *et al.*, 2003) and ion uptake (Das *et al.*, 1997). Cd toxicity, also, enhanced oxidative stress by increased levels of reactive oxygen species (ROS) (Sharma *et al.*, 2009).

Submerged aquatic plants are known to accumulate metals from their environment and affect metal fluxes through those ecosystems (Singh *et al.*, 2011). *Eloдея canadensis* is a submerged freshwater macrophyte, which absorbs mineral elements through its wide leaf surfaces directly from the aquatic medium. Various studies have demonstrated the potential use of this specie to reduce organic matter or remove heavy metals from polluted water (Dunbabin *et al.*, 1992 ; Eugelink, 1998, Mishra *et al.*, 2009). The Cadmium accumulation in these plants can caused various physiological and biochemical modifications. By this fact, and the aim of this study is the possible use of these changes to evaluate the response of *Eloдея canadensis* to cadmium exposure and to understand its mechanisms of resistance and/or adaptations to heavy metal stress,

by following the respiratory and photosynthesis metabolism and some stress biomarkers (GSH, GST).

MATERIALS AND METHODS:

Biological material

The biological material chosen for our investigation is an aquatic plant *Eloдея Canadensis*, these submerged macrophytes was used as model system to study toxic effects and biological responses upon exposure to cadmium perturbations.

Chemical material

Cadmium (Cd) is a bivalent, non-essential and highly toxic heavy metal, whose concentration in air, soil and waters of the earth is continuously increasing due to industrial and urban activities and agricultural practices. One of the most toxic metals is a persistent contaminant that accumulates in the environment. Large amounts of this metal are released annually in various environmental compartments and may pose a significant threat to the ecosystem (Pacyna *et al.*, 1995).

Treatment

Plants of *Eloдея a Canadensis* are washed with distilled water and cultured in nutriment solution medium, ph = 7.4 (containing 67.32 mg/l de Ca²⁺, 10.08mg/l Mg²⁺, 4.82mg/l K⁺, 11.96 mg/l Na²⁺, 27.36 mg/l SO₄²⁺, 20.82 mg/l Cl⁻, 216.07 mg/l HCO₃, 2.5 mg/l NO₃, 1.00 mg/l NO₂, 2.33 mg/l Si₂ and 1000 ml of distilled water) used as control.

In the same medium and after few days of acclimatization to the laboratory condition, the addition of different cadmium concentration (0, 10, 20, 40, 80, 100 μM) was applied for 7 and 14 days of treatment.

Measurement of Biochemical and Enzymatic Parameters

After treatment of submerged macrophytes, the leaves are collected for analysis of various parameters as respiratory metabolism, photosynthesis and some stress biomarkers (GSH, GST).

*Correspondence: Sabrina ZOUAINIA, Laboratory of cellular Toxicology, Department of biology, Faculty of science, Badji Mokhtar University, Annaba, Algeria Tel: +213 668735061 email: zouainia.sabrina@yahoo.fr

Determination of Glutathione (GSH)

The glutathione was assayed by the method of Weckberker and Cory, 1988, based on measuring the absorbance of the 2-nitro-5 mercapturic resulting from the reduction of the acid 5-5 'thiol-bis- 2-nitrobenzoic acid (DTNB) by the thiol groups (-SH) glutathione.

Determination of activity Glutathione S-transferase (GST)

The glutathione S-transferase activity is performed by the method of habig *et al.*, 1974. It is based on the conjugation reaction between GST and a substrate, CDNB (1-Chloro-2,4-dinitrobenzene) in the presence of a cofactor: glutathione (GSH). This activity is measured at a wavelength of 340nm by a spectrophotometer visible/UV (Jenway 63000).

Study of Respiratory and photosynthetic metabolism

The apparatus used is an oxygen electrode, HANSATECH type, wich allows the measurement of the production or consumption of oxygen.

The intensity of photosynthesis of *Elodia Canadensis* is measured by the oxygen electrode as for the respiration rate when the sample is hidden by a black box to speed up the metabolic process (Djebar *et al* 2000).

Statistical anlalysis

The statistical analysis is performed by the student "t" test that compares the averages of two populations using data from two independent samples, conducted using a data analysis software: Minitab (version 16.0) (Dagnelie, *et al.*, 1999)

RESULTS AND DISCUSSION:

Glutathione variations (GSH)

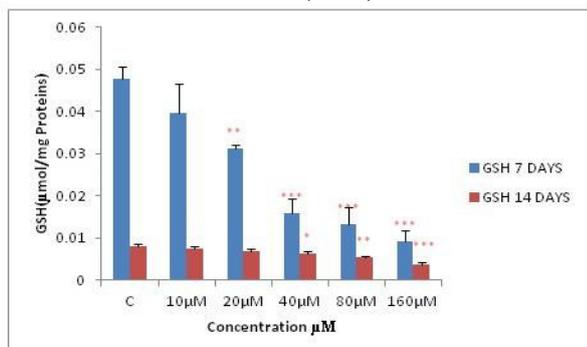


Fig 1. Evolution of GSH level as a function of times and different cadmium concentrations on *Elodea Canadensis* after 7 and 14 days of treatment.

Figure 01 illustrates the effects of the various concentrations of Cadmium on the GSH rate after 7 and 14 days of treatment. Indeed, the level of GSH decreased from (0.00478 µM/mg of protein) in control to (0.093µM/mg of protein) in cells treated by the strongest concentration of our molecule for the 7 days treatment, and from (0.008µM/mg of protein) in control to (0.003µM/mg of protein) in cells treated by strongest concentration (160µM) of our molecule for 14 days treatment.

GSH is considerate as one of the most frequently used indicators of stress biomarkers preventing damage to important cellular components caused by reactive

oxygen species and free radicals (Pompella *et al.*, 2003). Statistical analysis revealed significant differences in the rate of GSH between the control and our 5 concentrations used for 7 and 14 days of treatment.

Glutathione S-transferase activity (GST)

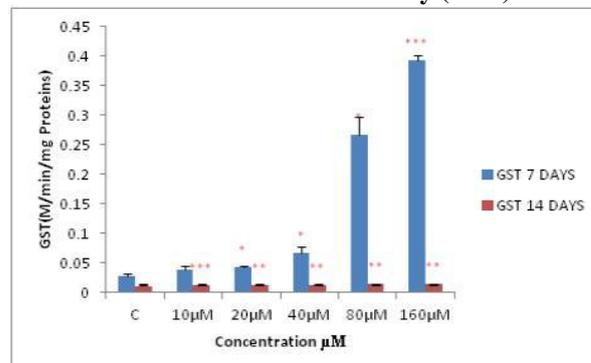


Fig 2. Evolution of glutathione S-transferase activity as a function of different cadmium concentrations on *E. canadensis* after 7 and 14 days of treatment.

The Figure 2 show a dose-dependent increase of GST activity on the *E. Canadensis* treated with different Cadmium concentrations compared to the control after 7 and 14 days of treatment.

The GST increase from (0.0027µM/mg of protein) in the control to (0.393µM/mg of protein) in the *E.Canadensis* treated with the cadmium concentrations of 160µM.

After 14 days of treatment, the GST activity on the *E.Canadensis* was increased by the treatment with the different cadmium concentration. The GST increase from (0.011µM/mg of protein) in the control to (0.015µM/mg of protein) with the strongest concentrations of our molecule.

GST plays a vital role in detoxification response during oxidative stress, provides a first line of defense after toxic heavy metal insult, and catalyzes the conjugation of the reduced form of GSH to xenobiotic substrates for their elimination (Cherait *et al.*, 2014). Statistical analysis revealed significant differences in the rate of GST between the control and our 5 concentrations used for 7 and 14 days of treatment.

Effects of cadmium on the respiratory metabolism

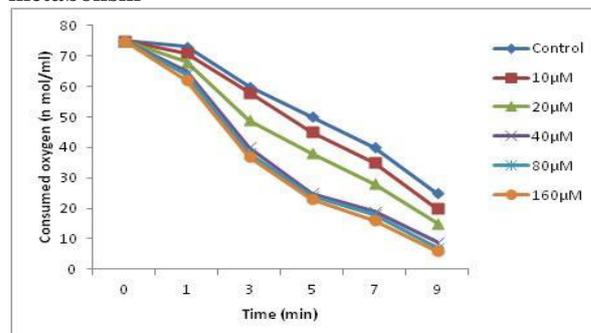


Fig 3. Evolution of oxygen consumption as a function of different cadmium concentrations on *E. canadensis* after 7 days of treatment.

The figure 3 represents the evolution of oxygen consumption after 7 days of cadmium treatment of *E.Canadensis*. The results obtained indicate a dose-dependent decrease on the all *E.Canadensis* treated with different cadmium concentration compared to the control.

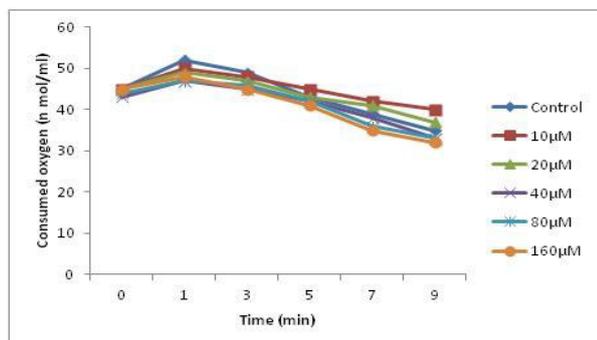


Fig 4. Evolution of oxygen consumption as a function of different cadmium concentrations on *E. canadensis* after 14 days of treatment.

The figure 4 represents the evolution of oxygen consumption after 14 days of cadmium treatment. The results indicated the perturbation on the all *E.Canadensis* treated with different cadmium concentration compared to the control.

Effects of cadmium on the photosynthetic activity

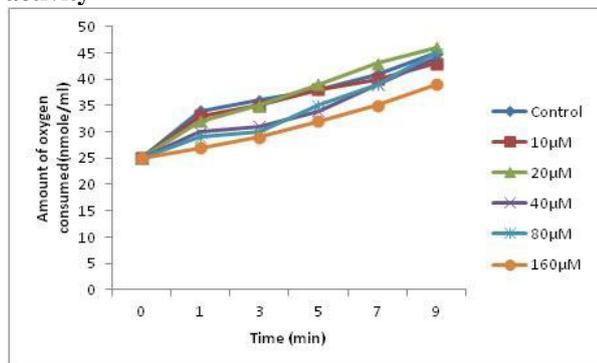


Fig 5. Evolution of photosynthetic activity as a function of different cadmium concentrations on *E. canadensis* after 7 days of treatment.

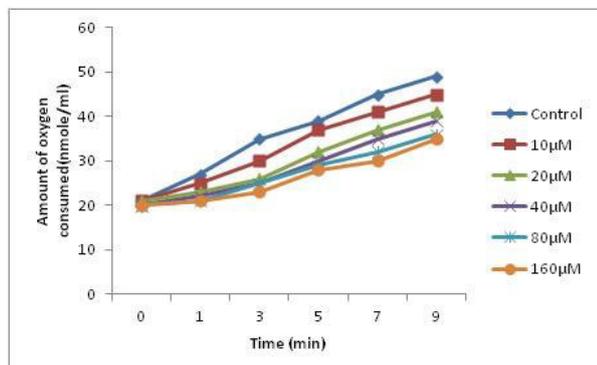


Fig 6. Evolution of photosynthetic activity as a function of different cadmium concentrations on *E. canadensis* after 14 days of treatment.

The figure 5 and 6 below shows a marked increase in the amount of oxygen produced in the middle, dice the second minute of recording for all the concentrations. The maximum amount of oxygen produced is recorded at 9min for the control with (45 and 49 nmol O2/ml).

DISCUSSION:

Cadmium (Cd) is a non-essential and toxic element, without any metabolic significance. Cd²⁺ ions are known to affect the structure and function of chloroplasts in many plant systems such as *Triticum aestivum* (Neelima,1991 ; Loggini,1999; and Prasad, 1995). The primary site of action by any heavy metal has been reported to be the photosynthetic pigments especially the biosynthesis of chlorophyll and carotenoids (Baszynski 1980 and Prasad, 1995). Cd inhibiting chlorophyll biosynthesis and the proper development of chloroplast structure have been reported in *Pennisetum typhoideum* (Prasad, 1987) and *T. aestivum* (Malik, 1992).

The treatment with cadmium significantly affects the growth of plants "*Elodea canadensis*", similar in vitro studies show that cadmium tends to significantly affect the growth parameters (Chugh *et al.*, 1995; *Herrieche*, 2004).Treatment with cadmium at low concentrations appears to positively affect all the morphological parameters of *elodea* plants. Cadmium at low concentrations rather seems to activate some metabolic processes involved in the growth and development of *E. canadensis*.

Respiratory metabolism, we found that the treatment of *Elodea* plants greatly reduced respiratory activity, this inhibition is firstly due to the presence of ROS, which are known as disruptive as well as elements of the respiratory metabolism of photosynthesis (Kiss *et al.*, 2003; Kuciel *et al.*,2004) and secondly it could be explained by the rapid passage of cadmium in roots. Indeed , it has been shown that the roots of some durum voltage dependent calcium channels in the plasma membrane, known as the appellation (RCA), are permeable to cadmium , and those in the absence of Ca⁺⁺ (White, 2000).

This rapid penetration of cadmium causes a strong disturbance of the respiratory chain specifically at the site responsible for substrate oxidation from the Krebs cycle. Cadmium can thus inhibit certain enzymes dehydrogenases and NADPH-dependent. While the photosynthetic metabolism following fluctuations in function of the different concentrations of the metal. At low concentrations of cadmium, photosynthesis remains active but still smaller than the control in contrast to high concentrations where it is inhibited. Our results are consistent with those obtained by (Israr *et al.*, 2006).

The use of these modifications for the evaluation of toxicity of these pollutants was largely discussed in various organisms (Prasad *et al.*, 2001; Perry *et al.*, 2002; Dhir *et al.*, 2004; Pavlíková *et al.*, 2008). Indeed, this species was shown to accumulate heavy metals such as Cd, Se, and Cu in their tissues (Thiébaud *et al.*, 2010; Qian *et al.*, 1999). These plants were therefore used for the evaluation and monitoring of metals in

water (Wahaab *et al.*, 1995; Kähkönen *et al.*, 1999; Cardwell *et al.*, 2002). In addition, aquatic plants could be used in phytoremediation to reduce organic matter or remove metallic pollutants from water. (Dunbabin *et al.*, 1992; Mishra *et al.*, 2009). Some of this research was conducted using *Elodea* sp. (Miretzky *et al.*, 2004; Olette *et al.*, 2008).

The induction of detoxifying enzymes of plants under stress conditions is often reported (Nimptsch, *et al.*, 2007). Plant cells are able to protect their lives through the use of enzyme mechanisms GST (Apel *et al.*, 2004). The treatment with different concentrations of cadmium induce a high activity of GST, this could be explained by the entry of xenobiotics in plant cells (*Elodea Canadensis*) and induction of detoxification system (Lagadic *et al.*, 1997).

Our results agree with those reported by dazy *et al.*, 2009, where they found maximal activities of GST and significant decrease of GSH in samples from polluted area.

Glutathione plays a central role in the process of intracellular defense and exists in two forms, oxidized GSSG and reduced GSH. GSH deficiency exposes the cell to a risk of oxidative damage (Sies, 1991), through its ability to bind to heavy metal ions (Adam *et al.*, 2005). The glutathione-enzymes include glutathione peroxidase (GSH-Px) and glutathione S-transferase (GST) involved in the detoxification reaction intermediates and oxygen radicals (Yu, 1994). The level of GSH decreased in cells treated by different concentration of cadmium. Several studies confirm the results and help to better explain the relationship between the decrease in GSH and an increase in GST activity.

CONCLUSION:

In conclusion, our results showed that cadmium is toxic in concentration dependent manner to the submersed macrophytes *Elodea canadensis*. The physiological and biochemical process in plants was significantly affected by stress of cadmium. To deal with the cadmium induced oxidative stress, *Elodea canadensis* adopt a defense strategies by activation of some stress biomarkers (GSH and GST activity) to diminish the effects of reactive oxygen species.

REFERENCES:

- Adam, V., Zehnàlek J., Petrlovà, J., Potešil, D., Sures, B., Trnková, L., Jelen, F. J., Viteek, R., Kizek, D. Sensors. Phytochelatin modified electrode surface as a sensitive heavy metal ion biosensor. Sensors; 5: 70-84, 2005.
- Aksoy, A., Demirezen, D., Duman, F. Bioaccumulation, Detection and Analyses of Heavy Metal Pollution in Sultan Marsh and its Environment; Water, Air and Soil Pollution, 164: 241-255, 2005.
- Apel, K and H.Hirt. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress and signal transduction. Annu. Rev. Plant Biol, 55:373-399, 2004.
- Baszynski, T, Wajda, L, Krol, M, Wolinska, D, Krupa, Z, Tukendorf, A . Photosynthetic activities of cadmium-treated tomato plants. Physiol. Plant., 48, pp. 365–370, 1980.
- Cardwell, A., Hawker, D., Greenway, M. Metal accumulation in aquatic macrophytes from southeast Queensland, Australia. Chemosphere 48, 653–663, 2002.
- Cherait, A., Djebbar, M.R., Berrebbah, H. Saccharomyces cerevisiae as a model for the evaluation of dihydropyridine calcium antagonist effects. International Journal of Biosciences, Vol. 4, No. 12, p. 108-116, 2014 .
- Chugh, L.K, Sawhney, S.K. Effect of cadmium on germination, amylases and rote of respiration of germinating pea seeds. Environmental pollution, 92. (1): 1-5, 1995.
- Dagnelie, P. Statistiques théoriques et appliqués. Tome 2: références statistiques à une et à deux dimensions. Bruxelles. Université de BOECK et LARCIER, 659, 1999.
- Das P, Samantaray S, Rout GR. Studies on cadmium toxicity in plants : areview. Environ.Pollution 98:29-36, 1997.
- Dazy, M; J.F.M asfarau, J.F.Férard. Induction of oxidative stress biomarkers associated with heavy metal stress in *Fontinalis antipyretica* Hedw. elsevier. chemosphere, 75: 297-302, 2009.
- Dhir, B., Sharmila, P., Saradhi, P.P. Hydrophytes lack potential to exhibit cadmium stress induced enhancement in lipid peroxidation and accumulation of proline. Aquat. Toxicol. 66, 141–147, 2004.
- Djebbar, MR, H. Djebbar. Bioénergétique, les mitochondries végétales. Synthèse. Publication de l'université d'ANNABA : 103, 2000.
- Dorta DJ, Leite S, DeMarco KC, Prado IM, Rodrigues T, Mingatto FE, Uyemura SA, Santos AC, Curti C. A proposed sequence of events for cadmium-induced mitochondrial impairment, J InorgBiochem 97:251-7, 2003.
- Dunbabin, J., Bowmer, K.. Potential use of constructed wetlands for treatment of industrial wastewaters containing metals. Sci. Total Environ. III, 151–168, 1992.
- Eugelink AH. Phosphorus uptake and active growth of *Elodea canadensis* Michx. and *Elodea nuttallii* (Planch.) St. John. Water Sci Technol 37:59 – 65, 1998.
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B. Glutathione-S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. Journal of Biological Chemistry, 249(22), 7130-7139, 1974.
- Herrieche, O. Impact du cadmium et l'interaction cadmium-calcium sur la germination et la croissance du blé dur (*Triticum durum* Dsf; Var. Vitron). Effet sur la respiration des racines. Mémoire de magister en toxicologie. Département de biologie. Université Annaba: 120 pages, 2004.
- Israr, M. et Sahi, S.V. Cadmium accumulation and antioxidative reponses in the

- Sesbaniadrummondii callus. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 50: 121-127, 2006.
- Kahkonen, M., Manninen, P. The uptake of nickel and chromium from water by *Elodea Canadensis* at different nickel and chromium exposure levels. Chemosphere 36, 1381–1390, 1998.
- Kiss, S.A; Varga, I.S; Galbacs, Z; Maria, T.H; Csikkel-Szolnoki, A. Effect of age on a magnesium supply on the free radical and antioxydant content of plants. Actabilogicaszegediensis, vol. 47 (1-4), pp, 127-130, 2003.
- Kuciel, R. and A. Mazurkiewicz. Formation and Detoxification of reactive oxygen species. Biochemistry and Molecular Biology Education, 323(17): 183-186, 2004.
- Lagadic, L, T.Caquet, J.C. Amiard. Biomarqueurs en écotoxicologie. Aspects fondamentaux. Ed Masson, 196. (37) , 1997.
- Loggini, B, Scartazza, A, Brugnoli, E, Navari-Izzo, F. Antioxidative defense system, pigment composition, and photosynthetic efficiency in two wheat cultivars subjected to drought. Plant Physiol., 119, pp. 1091–1099, 1999.
- Lopez-Millan, A.F., Sagardoy, R., Solanas, M., Abadia, A. and Abadia, J. Cadmium toxicity in tomato (*Lycopersicon esculentum*) plants grown in hydroponics. Environmental and Experimental Botany., 65, 376-385, 2009.
- Malik, R.S., Panwar R.S. and Malik R.K. Chemical control of broad leaf and grassy weeds in wheat (*Triticum aestivum*). Indian J. Agronomy, 37 : 324-346, 1992.
- Miretzky, P., Saralegui, A., Fernandez, A. Aquatic macrophytes potential for the simultaneous removal of heavy metals. Chemosphere 57, 997, 1005, 2004.
- Mishra, V.K., Tripathi, B.D. Accumulation of chromium and zinc from aqueous solutions using water hyacinth (*Eichhornia crassipes*). Journal of Hazardous Materials 164, 1059e1063, 2009.
- Neelima, A , Pardhasaradhi, P, Mohanty, P. Inhibition of chloroplast photochemical reactions by treatment of wheat seedlings with low concentrations of cadmium: analysis of electron transport activities and changes in fluorescence yield. Plant Cell Physiol., 32 (7), pp. 943–951, 1991.
- Nimptsch, J, S. Pflugmacher. Ammonia triggers the promotion of oxidative stress in the aquatic macrophyte *Myriophyllum mattogrossense*. Chemosphere, 66: 708-714, 2007.
- Olette R., Couderchet M., Biagiatti S., Eullaffroy P. Toxicity and removal of pesticides by selected aquatic plants. CHEMOSPHERE 70:1414–1421, 2008 .
- Pacyna, J.M., Scholtz, M.T., Li, Y.F., Environmental Reviews, 3, 145-159, 1995.
- Pavlikova D, Pavlik M, Staszko L, Motyka V, Szakova J, Tlustos P, Balik J. Glutamate kinase as a potential biomarker of heavy metal stress in plants. Ecotoxicol Environ Saf 70:223–230, 2008.
- Perry C, Mackay-Sim A, Feron F, McGrath J. Olfactory neural cells: an untapped diagnostic and therapeutic resource. Laryngoscope. Apr; 112(4):603-7, 2002.
- Pompella A¹, Visvikis A, Paolicchi A, De Tata V, Casini AF. The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. Biochem Pharmacol. Oct 15;66(8):1499-503, 2003 .
- Prasad, D.D.K, Prasad, A.R.K. Altered δ -aminolevulinic acid metabolism by lead and mercury in germinating seedlings of bajra (*Pennisetum typhoides*). J. Plant Physiol., 127, pp. 241–249, 1987.
- Prasad, M.N.V. Inhibition of maize leaf chlorophylls, carotenoids and gas exchange functions by Cadmium. Photosynthetica., 31, pp. 635–640, 1995.
- Prasad M.N.V., Malec P., Waloszek A., Bojko M., Strzalka K. Physiological responses of *Lemna trisulca* L. (duckweed) to cadmium and copper bioaccumulation. Plant Sci., 161: 881–889, 2001.
- Qian, J.-H., A. Zayed, Y.-L. Zhu, M. Yu, N. Terry. Phytoaccumulation of trace elements by wetland plants: III. Uptake and phytoaccumulation of ten trace elements by twelve plant species. J. Environ. Qual., 28: 1448-1455, 1999.
- Sharma, S. S., & Dietz, K.-J. The relationship between metal toxicity and cellular redox imbalance. Trends in Plant Science, Vol.14, No.1, 43-50, 2009.
- Sies H. Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radic. Biol Med* 27:916-921, 1999.
- Singh, D., Gupta, R., Tiwari, A. Phytoremediation of lead from wastewater using aquatic plants. International Journal of Biomedical Research (7) 411-421, 2011.
- Thiébeau P., Lô-Pelzer E., Klumpp K., Corson M., Hénault C., Bloor J., de Chezelles E., Soussana J.F., Lett J.M., Jeuffroy M.H. Conduite des légumineuses pour améliorer l'efficacité énergétique et réduire les émissions de gaz à effet de serre à l'échelle de la culture et de l'exploitation agricole. Innovations Agronomiques 11, 45-58, 2010.
- Tukaj, Z., Bascik-Remisiewicz, A. Skowronski, T. and Tukaj, C. Cadmium effect on the growth, photosynthesis, ultrastructure and phytochelatin content of green microalga *Scenedesmus armatus*: A study at low and elevated CO₂ concentration. Environmental and Experimental Botany 60: 291-299, 2007.
- Wahaab, A.R., H.J. Lubberding, G.J. Alaerts. Copper and chromium (III) uptake by duckweed. Water Sci. Technol., 32:(11): 105-110, 1995.
- Weckbecker, G., Cory, J.G. Ribonucleotide reductase activity and growth of glutathione depleted mouse *leukemia* L 1210 cells in vitro. Cancer letters, 40: 257-264, 1988.
- White, P.J. Calcium channels in higher plants biochemica and biophysica acta. 1465: 172-189, 2000.

Yu, B.P; Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol. Rev.*, 74, 139-162, 1994.

Zoghlami Boulila, L., Djebali, W., Chaib, W., Ghorbel, M.H. Modification physiologiques et

structurales induites par l'interaction cadmium-calcium chez la tomate (*Lycopersicon esculentum*). *C.R Biologies* 329 : 702-711, 2006.