



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA  
RECHERCHESCIENTIFIQUE



جامعة عبد الحميد ابن باديس مستغانم  
UNIVERSITE ABDELHAMID IBN BADIS DE MOSTAGANEM

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département de Biologie  
Filière : Sciences Biologiques  
Spécialité : Eau et environnement

THESE PRESENTEE POUR L'OBTENTION DU DIPLOME DE DOCTORAT LMD

Présentée par

TADJOURI Houria

*Thème*

**Effets du cadmium sur les paramètres anatomiques,  
biochimiques et chimiques du soja (*Glycine Max L. Merr.*)**

Soutenue publiquement le **08/12/2022**

Devant le jury :

Pr. Chibani Abdelwahab	<b>Président</b>	Université de Mostaganem
Pr. Mahdadi Zouhair	<b>Examineur</b>	Université de Sidi Bel Abbès
Dr. Sidhom Warda	<b>Examinatrice</b>	Université de Mostaganem
Pr. Chadli Rabah	<b>Directeur de thèse</b>	Université de Mostaganem
Pr. Nemmiche Saïd	<b>Co-directeur de thèse</b>	Université de Mostaganem

**Année Universitaire : 2022-2023**

## REMERCIEMENTS

À l'issue de ce travail, je remercie tout d'abord le bon DIEU, le tout puissant, pour m'avoir donné la force et le courage ainsi que l'audace pour dépasser toutes les difficultés et terminer ce travail.

Au terme de ce travail, je voudrais exprimer toute ma reconnaissance aux personnes qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce travail.

En tout premier lieu, j'exprime ma plus grande gratitude et mon profond respect pour le Directeur de ma thèse, Mr. CHADLI Rabah, professeur à l'université de Ibn Badis, Mostaganem ; aussi mon Co-directeur Mr Nemmiche Saïd professeur à l'université de Ibn Badis, Mostaganem ; Je le remercie particulièrement pour la disponibilité, la patience, la confiance et la compréhension qu'il m'a accordées durant les années de labeur.

Je tiens à exprimer ma gratitude à Mr Pr. Chibani Abdelwahab, professeur à l'université de Ibn Badis, Mostaganem de m'avoir fait l'honneur de présider le jury de cette thèse. Soyez assuré de tous mes respects.

Que Monsieur Mr, Mahdadi Zouheir professeur à l'université Djilali Liabes de Sidi Bel Abbas trouve ici l'expression de mes respectueuses considérations de m'avoir honoré pour l'expertise de ce manuscrit.

Je tiens à remercier Dr. Sidhoum Warda à l'université d'Ibn Badis, Mostaganem, d'avoir accepté de juger notre travail. Veuillez accepter mes sincères remerciements pour votre honorable présence dans ce jury.

J'adresse mes vifs remerciements à Mr. Halbouche (qu'il repose en paix)

Et Mr Ait Saada professeurs à l'université d'Ibn Badis, Mostaganem. Je voudrais remercier toutes les bonnes personnes que j'ai rencontrées pendant mon séjour à Mostaganem. Merci également à mes camarades, vous m'avez tous rendu la vie agréable même dans les moments difficiles.

Et bien sûr, je remercie énormément mon amie et ma collègue, Mme Benati Fatima Zohrapour pour son aide, son soutien moral et pour l'intérêt qu'elle a porté à mon travail.

## DÉ DICACES

Afin d'être reconnaissant envers ceux qui m'ont appuyé et encouragé à

effectuer ce travail de recherche, je dédie ce mémoire :

A la mémoire de Mon cher PAPA,

L'étoile qui m'a guidé et guiderai toujours mon chemin. Vous étiez le père  
exemplaire, Jene vous remercierai jamais assez pour votre éducation, votre

soutien et vos sacrifices tout au long de mon parcours.

J'espère pouvoir faire votre fierté comme vous faites la mienne. Repose en paix

A MA TRES CHERE MERE

Source inépuisable de tendresse, de patience et de sacrifice. Ta prière et ta

Bénédictio n'ont été d'un grand secours tout au long de ma vie.

Quoique je puisse dire et écrire, je ne pourrais exprimer ma grande affection et

ma profonde reconnaissance.

J'espère ne jamais te décevoir, ni trahir ta confiance et tes sacrifices.

Puisse Dieu tout puissant, te préserver et t'accorder santé, longue vie et

Bonheur.

À vous je dédie ce travail.

## RESUME

Le cadmium (Cd) est considéré comme un oligo-élément dangereux et un polluant environnemental qui pose un grave problème à l'agro écosystème et altère les fonctions des organismes vivants. Dans ce but, cette recherche consistait à évaluer les effets de Cd sur les réponses éco physiologiques de *Glycine max* L. Les graines de soja ont été semées dans le sol pendant 03 mois puis irriguées avec zéro, 50, 150, 300 ppm de CdCl<sub>2</sub> pendant 10 jours. La croissance et les paramètres physiologiques du soja ont été mesurés ; Les racines, les tiges et les feuilles ont été contaminées par le Cd d'une manière dépendante de la concentration. Le risque pour la santé humaine causé par le Cd n'est acceptable qu'à 50 ppm et augmente avec la concentration de Cd. Les résultats ont révélé des réponses différentes selon la concentration de Cd. Cependant, pour contrôler le niveau de ROS, le soja pourrait contrecarrer le stress lié au Cd en augmentant les activités enzymatiques anti oxydantes qui sont régulées à la hausse dans les racines et les feuilles. Les phénols totaux, les flavonoïdes, la teneur en proline et l'activité phénylalanine ammoniac-lyase ont augmenté avec la concentration de Cd. Enfin, le glutathion et l'Ascorbate ont été augmentés dans les feuilles, et ils ont été moins affectés dans les racines par rapport au témoin. Ce métal lourd a affecté l'anatomie des racines et les tiges. Par rapport au témoin, le diamètre des racines a augmenté en raison de la plus grande taille du cortex et de la surface du cylindre vasculaire, et les tissus vasculaires ont été nettement affectés par le Cd.

**Mots-clés :** Cadmium ; *Glycine max* L. ; Stress oxydatif ; Enzymes antioxydants ; Réponses physiologiques ; Anatomie.

## ملخص

يعتبر الكاديوم من العناصر الخطرة والملوثات البيئية التي تشكل مشكلة خطيرة على النظام البيئي الزراعي وتضعف وظائف الكائنات الحية. تحقيقاً لهذه الغاية ، يتألف هذا البحث من تقييم آثار الكاديوم على الاستجابات الفيزيولوجية البيئية لـ *Glycine max* L. تم قياس نمو فول الصويا والمعايير الفسيولوجية. تلوثت الجذور والسيقان والأوراق بـ كاديوم بطريقة تعتمد على التركيز. إن مخاطر صحة الإنسان من الكاديوم مقبولة فقط عند 50 جزء في المليون وتزداد مع تركيز الكاديوم. تم قياس نمو فول الصويا والمعايير الفسيولوجية. تلوثت الجذور والسيقان والأوراق بالكاديوم بطريقة تعتمد على التركيز. إن مخاطر صحة الإنسان من الكاديوم مقبولة فقط عند 50 جزء في المليون وتزداد مع تركيز الكاديوم. أظهرت النتائج استجابات مختلفة اعتماداً على تركيز الكاديوم ، ومع ذلك ، للتحكم في مستوى ROS ، يمكن لفول الصويا مواجهة الإجهاد المرتبط بالـ Cd عن طريق زيادة أنشطة إنزيم مضادات الأكسدة التي يتم تنظيمها في الجذور والأوراق. ارتفع إجمالي الفينولات والفلافونويد ومحتوى البرولين ونشاط فينيل ألانين أمونيا- لياز مع تركيز الكاديوم ، وأخيراً زاد الجلوتاثيون والسكريات في الأوراق ، وكانوا أقل تأثراً في الجذور مقارنةً بالمجموعة الضابطة. أثر هذا المعدن الثقيل على تشريح الجذور والسيقان بالمقارنة مع التحكم ، زاد قطر الجذر بسبب حجم القشرة الأكبر ومساحة سطح أسطوانة الأوعية الدموية ، وتأثرت أنسجة الأوعية الدموية بشكل ملحوظ بمرض الكاديوم.

**الكلمات الرئيسية:** الكاديوم ؛ جلايسين ماكس إل. الأكسدة؛ إنزيمات مضادات الأكسدة. الاستجابات الفسيولوجية؛ تشريح.

## ABSTRACT

Cadmium (Cd) is considered to be a dangerous trace element and environmental pollutant that causes a serious problem to agro ecosystem, and alters the functions of living organisms. For this purpose, this research was to assess the effects of Cd on the Eco physiological responses of *Glycine max* L. Seeds. Soybean seeds were sown in soil for 03 months and then irrigated with zero, 50, 150, 300 ppm of CdCl<sub>2</sub> for 10 days. The growth and physiological parameters of soybean were measured; the potential Toxicological risk associated with soybean consumption was evaluated. Roots, stems, and leaves were contaminated by Cd in a concentration-dependent manner. The human health risk caused by Cd is only acceptable at 50 ppm and increases with the concentration of Cd. The results revealed different responses according to Cd concentration. However, to control the level of ROS, soybeans could counteract Cd stress via elevating antioxidant enzyme activities which are upregulated in roots and leaves. The total phenols, flavonoids, proline content and phenylalanine ammonia-lyase activity were increased with Cd concentration. Finally, glutathione, and ascorbate were increased in the leaves, and they were less affected in the roots compared to control. This heavy metal affected root; stem anatomy. In comparison to control, root diameter increased as a consequence of the greater size of the cortex and the vascular cylinder area, and vascular tissues were markedly affected by Cd.

**Keywords :** Cadmium ; *Glycine max* L ; Oxydative stress ; Antioxydant enzymes ; Physiological réponses ; Anatomy.

# TABLE DES MATIERES

## Première partie

### Synthèse bibliographique

Chapitre I. La contamination de l'environnement par les métaux lourds

1	Les métaux lourds .....	1
1.1	Le cadmium .....	2
1.2	Les propriétés physico-chimiques.....	3
1.2.1	Propriétés chimiques .....	3
1.2.2	L'abondance dans la croûte continentale.....	3
1.3	Les sources de cadmium .....	4
1.3.1	Les sources naturelles de cadmium.....	4
1.3.2	Les sources anthropiques de cadmium .....	4
1.4	Les facteurs affectant la biodisponibilité du cadmium dans le sol .....	5
1.4.1	Le pH.....	5
1.4.2	La matière organique .....	5
1.4.3	La capacité d'échange de cations.....	6
1.4.5	Potentiel redox du sol (Eh) .....	6
1.4.6	La concentration de cadmium dans le sol .....	6
1.5	Le mécanisme de toxicité du cadmium.....	6
1.5.1	Absorption et transport de Cd par les racines .....	7
1.5.2.1	La voie apoplastique.....	7
1.5.2.2	La voie symplastique.....	8
1.6	Protéines de transport membranaires .....	8
1.6.1	Les transporteurs ZIP-IRT1 .....	8
1.6.2	Transporteurs de type "Yellow Stripe-Like" (YSL).....	9
1.7	L'accumulation et distribution de cadmium dans les tissus.....	9
1.8	Chélation et séquestration du cadmium dans les vacuoles .....	10
2.	Les mécanismes cellulaires impliqués dans la tolérance des plantes .....	11
2.1	Acides organiques .....	11

2.2 Réductases racinaires .....	11
2.3 Les phytochélatines.....	11
2.4 Métallothionéines (MTS).....	12
2.5 Mycorhizes.....	12
2.6 Les protéines de choc thermiques .....	13
3. Les effets du cadmium sur les organismes .....	13
3.1 Les effets sur la santé humaine .....	13
3.1.1 Air et poussière.....	13
3.1.2 Fumer de tabac.....	13
4. Les effets du Cd sur les plantes.....	13
4.1 L'effet du Cd sur la photosynthèse .....	14
4.2 Effet du Cd sur la croissance.....	14

## **Chapitre II. Le stress oxydatif**

1 Les espèces réactives d'oxygènes (ERO) et les espèces réactives de nitrogène (ERN) .....	16
1.1 Définition .....	16
1.2 Les Types de ROS .....	17
1.2.1 Le radical superoxyde .....	17
1.2.1.1 Le site de production du radical super oxyde .....	17
1.2.1.2 Les propriétés de radical superoxyde .....	18
1.2.2 L'oxygène singulet ( $^1O_2$ ) .....	19
1.2.2.1 Le site de production du l'oxygène singulet.....	19
1.2.2.2 Les propriétés du l'oxygène singulet.....	19
1.2.3 Le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) .....	20
1.2.3.1 Le site de production ( $H_2O_2$ ) .....	20
1.2.3.2 Les propriétés du peroxyde d'hydrogène .....	20
1.2.4 Le radical hydroxyle ( $OH\cdot$ ) .....	20
1.2.4.1 Les propriétés du ( $OH\cdot$ ) .....	21
2 Les stress oxydants.....	22
2.1 La production de ROS dans différentes organelles.....	22
2.1.1 Mitochondries .....	22
2.1.2 Chloroplastes.....	23

2.1.3 Peroxysomes .....	24
2.1.4 Apoplast .....	24
2.1.5 Membrane plasmique.....	25
2.1.6 Paroi cellulaire .....	25
2.1.7 Réticulum endoplasmique.....	25
2.2 Les conséquences des ERO sur les macromoléculaires.....	26
2.2.1 Peroxydation des lipides (LPO).....	26
2.2.2 Oxydation des protéines.....	27
2.2.3 Modification d'ADN.....	28
2.3 Le rôle des espèces réactives d'oxygène (ERO) dans la signalisation .....	29
2.4 Les mécanismes antioxydants de défenses .....	29
2.4.1 Les systèmes antioxydants enzymatiques .....	30
2.4.1.1 Systèmes enzymatiques .....	30
2.4.1.1.2 Catalase (CAT) (E.C.1.11.1.6).....	30
2.4.1.1.3 Ascorbate peroxydase (E.C. 1.1.11.1).....	30
2.4.1.1.4 Guaiacol peroxydase (GPX).....	31
2.4.1.1.5 Monodéshydroascorbate réductase (MDHAR).....	31
2.4.1.1.6 Dehydroascorbate Reductase (DHAR).....	31
2.4.1.1.7 Glutathion réductase (GR).....	32
2.4.1.1.8 Glutathion S-transferases.....	32
2.4.2 Le système antioxydants non enzymatique.....	32
2.4.2.1 Acide ascorbique.....	32
2.4.2.2 Glutathion (GSH) .....	33
2.4.2.3 Les caroténoïdes .....	34
2.4.2.4 Tocophérols .....	34
2.4.2.5 Proline.....	35
2.4.2.6 Les composés phénoliques .....	35
2.4.2.7 Flavonoïdes.....	35

### **Chapitre III. Le Soja**

1 Le soja ( <i>Glycine max</i> (L.) Merr).....	37
--	----

1.1 Origine et diffusion .....	37
1.2 Classification et description botanique .....	37
1.3 Développement et culture du soja.....	39
1.3.1 Maturation des semences .....	39
1.3.2 Germination .....	39
1.3.3 Symbiose.....	39
1.3.4 Réponses au stress.....	40
1.4 Qualités alimentaires.....	40
1.4.1 Protéines.....	41
1.4.2 Lipides.....	41
1.5 L'intérêt économique .....	42
1.6 Les modifications structurelles anatomiques des organes et tissus végétaux par les métaux et les métalloïdes dans l'environnement.....	42
1.6.1 Altérations anatomiques des tissus radiculaires dues aux métaux et aux métalloïdes.....	43
1.6.1.1 Effet des métaux (loid) sur le méristème apical de la racine.....	44
1.6.1.2 Effet des métaux et des métalloïdes sur le rhizoderme.....	44
1.6.1.3 Effet des métaux et des métalloïdes sur le cortex racinaire .....	46
1.6.1.4 Effet des métaux et des métalloïdes sur le cylindre central et le système vasculaire des racines.....	47
1.6.2 Altérations anatomiques des tissus de la tige dues aux métaux et aux métalloïdes	48
1.6.3 Altérations anatomiques des tissus foliaires dues aux métaux et aux métalloïdes.	48

## **Deuxième partie**

### **Etude expérimentale**

#### **Chapitre I. Matériel et Méthodes**

1 Matériel végétal et traitement métallique au cadmium.....	50
2 Récolte des plantules.....	51
3 Détermination des paramètres physiologiques .....	51
3.1 Paramètres de croissance.....	51
3.2 Quantification des pigments (chlorophylles et caroténoïdes) .....	51

3.3 Estimation de la teneur relative en eau des feuilles (LRWC) .....	52
3.4 Estimation des indicatifs du stress oxydatif .....	52
3.5 Estimation la teneur en malondialdéhyde (MDA).....	52
3.6 Estimation de la teneur en peroxyde d'hydrogène (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ).....	53
Détermination de l'activité des enzymes antioxydants .....	53
Extraction .....	53
Dosage des protéines.....	53
5.2.1 Détermination de l'activité de catalase (CAT, EC 1.11.1.6).....	53
5.2.2 Détermination de l'activité de l'ascorbate peroxydase (APX, EC1.11.1.1).....	54
5.2.3 Détermination de l'activité du gaïacol peroxydase (GPx, EC 1.11.1.7) .....	54
5.2.4 Détermination de l'activité du Glutathione-S-transferase (EC 2.5.1.18) .....	54
5.2.5Détermination de l'activité du L-Phenylalanine ammonia lyase (PAL, EC4.3.1.5).....	54
6. Détermination de l'activité des antioxydants non enzymatiques .....	54
6.1 Estimation de la teneur en proline .....	54
6.2 Détermination de l'acide ascorbique .....	55
7. Détermination de la teneur en glutathion (GSH), thiols non-protéiques (NPT) et les phyto- chelatines (PCs).....	55
7.1 Extraction .....	55
7.1.1 Détermination de la teneur en glutathion réduit (GSH) .....	55
7.1.2 Dosage des thiols non-protéiques.....	55
7.1.3 Estimation des teneurs en phytochélatines.....	56
8. Détermination des métabolites secondaires.....	56
8.1 Extraction.....	56
8.2 Dosage des phénols .....	56
8.3 Dosage des flavonoïdes.....	56
8.4 Estimation du pouvoir antioxydant (Test DPPH) .....	57
8.5 Évaluation des risques .....	57
9 Dosage de la teneur en cadmium et des éléments nutritifs.....	57
9.1 Protocole expérimentale .....	58
a. a. Minéralisation de la poudre végétale .....	58
b. b. Stockage des échantillons minéralisés et le blanc .....	58
10L'anatomie de la plante .....	59
10.1 Technique de double coloration.....	59

a. Réalisation d'une coupe végétale à main levée .....	59
b. Réalisation d'une coupe transversale racinaire .....	59
c. La technique de coloration .....	60
11 Analyse statistique.....	61

## **Chapitre II. Résultats et Discussion**

1 Résultats .....	62
1.1 Effet du traitement au Cd sur la croissance du soja.....	62
1.2 Effets du traitement du Cd sur le contenu des pigments photosynthétiques.....	63
1.3 Effet du traitement au Cd sur la teneur relative en eau des feuilles (TRE).....	65
1.4 Effets du traitement au Cd sur les teneurs en H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> et en MDA .....	66
1.5 Effets du traitement au Cd sur l'activité des enzymes antioxydants.....	67
1.5.1 Effets du traitement au Cd sur l'activité d'ascorbate peroxydase.....	67
1.5.2 Effets du traitement au Cd sur l'activité de catalase.....	68
1.5.3 Effets du traitement au Cd sur l'activité de peroxydase .....	69
1.5.4 Effets du traitement au Cd sur l'activité de Glutathion S-transférases.....	70
1.5.5 Effets du traitement au Cd sur l'activité de phénylalanine amonalyse.....	71
1.6 Effets du traitement au Cd sur les métabolites antioxydants.....	72
1.6.1 Effets du traitement au Cd sur la teneur en proline.....	72
1.6.2 Effets du traitement au Cd sur la teneur en ascorbate (AsA).....	72
1.7 Effets du traitement au Cd sur les thiols (GSH ; NPTH et PC).....	73
1.7.1 Effets du traitement au Cd sur la teneur en GSH.....	73
1.7.2 Effets du traitement au Cd sur la teneur en NP-TH .....	74
1.7.3 Effets du traitement au Cd sur la teneur en phytochélatines .....	75
1.8 Effets du traitement au Cd sur les flavonoïdes, le phénol total et la DPPH.....	76
1.8.1 Effets du traitement au Cd sur les flavonoïdes .....	76
1.8.2 Effets du traitement au Cd sur les phénols.....	76
1.9 Effets du traitement au Cd sur DPPH.....	90
1.10 Effets du traitement au Cd sur l'anatomie du soja.....	78
1.11 Effet sur l'anatomie de la racine .....	79
1.11.1 Effet du stress métallique sur la structure anatomique de la tige.....	79
1.11.2 Effet du stress métallique sur la structure anatomique de la tige.....	83

2 Discussion ..... 86

Conclusions et perspectives.

Références bibliographiques.

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1:</b> Propriétés physiques et chimiques pertinentes du cadmium .....	3
<b>Tableau 2:</b> Production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) dans différentes conditions de stress et leurs effets sur les plantes.....	21
<b>Tableau 3:</b> Impact du Cd sur le poids frais et la longueur des pousses et des racines de ( <i>Glycine max L.</i> ) .....	62
<b>Tableau 4:</b> Impact du Cd sur les contenus des pigments photosynthétiques Chl a, b et des caroténoïdes de ( <i>Glycine max L.</i> ) traités avec différentes concentrations (50, 150 et 300 ppm) de CdCl <sub>2</sub> après 10 jours de croissance dans le sol.....	64
<b>Tableau 5:</b> Impact du traitement au cadmium sur les paramètres anatomiques de racine et tige de <i>Glycine max L.</i> traité avec diverses concentrations de cadmium. ....	78

## Liste des figures

<b>Figures</b>		<b>Page</b>
<b>Figure 01</b>	Les voies apoplastiques et symplastique	8
<b>Figure 02</b>	Voies de transport du Cd des racines vers les pousses	9
<b>Figure 03</b>	La figure montre l'homéostasie redox à base de glutathion (GSH) et de phytochélate (PC) et la signalisation du stress chez les plantes soumises à un stress de métaux lourds. ERO, espèces réactives de l'oxygène	10
<b>Figure 04</b>	L'absorption du métal lourd ( $Cd^{2+}$ ) par les transporteurs régulés par le zinc/fer (ZIP) pénètre dans le cytosol et stimule la synthèse des phytochélatines (PC) dérivées du glutathion par les synthèses de PC (PCS)	12
<b>Figure 05</b>	Schéma montrant les transporteurs (cases vertes) et les nutriments minéraux (cases vert clair) impliqués dans l'absorption et la translocation du Cd dans la plante	15
<b>Figure 06</b>	Sites hypothétiques de génération de superoxyde dans les photosystèmes I et II	18
<b>Figure 07</b>	Représentation schématique des principaux sites impliqués dans la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) et des différents mécanismes de balayage dans les cellules végétales	26
<b>Figure 08</b>	Les différentes causes de génération des ERO et leurs conséquences sur les macromolécules	28
<b>Figure 09</b>	Le rôle potentiel du glutathion et des phytochélatines dans la tolérance au stress abiotique chez les plantes	34
<b>Figure 10</b>	Les différentes structures des flavonoïdes	36
<b>Figure 11</b>	les voies de piégeage des espèces réactives de l'oxygène (ERO) par le système de défense antioxydant des plantes	36
<b>Figure 12</b>	Le soja, <i>Glycine max</i> , légumineuse herbacée	38
<b>Figure 13</b>	Schéma des réactions les plus courantes des tissus racinaires à un excès de métaux et de métalloïdes dans l'environnement.	43
<b>Figure 14</b>	Aperçu général de l'impact du métal (lourd) sur les altérations structurelles des racines, des tiges et des feuilles	49
<b>Figure 15</b>	Plantes de Soja après un mois de germination, repiquées dans des cylindres	50
<b>Figure 16</b>	Les plantes du Soja ( <i>Glycine max</i> L.) traitées au Cd cultivées sous serre.	50
<b>Figure 17</b>	La partie racinaire du soja ( <i>Glycine max</i> L.) des différentes doses de Cd Cl <sub>2</sub> .	51

## Liste des figures

Figures	Page
<b>Figure 18</b> Les plantes en poudre	58
<b>Figure 19</b> Méthodologie de reconnaissance des tissus différenciés des spermaphytes au moyen de la double coloration (Vert de Méthyle / Rouge Congo)	62
<b>Figure 20</b> Effet de Cd (50, 150, 300 ppm) sur la biomasse racinaire et foliaire.	63
<b>Figure 21</b> Effet de Cd (50, 150, 300 ppm) sur la longueur racinaire et foliaire.	63
<b>Figure 22</b> Effet de Cd (50, 150, 300 ppm) sur la teneur en chlorophylle a et b.	64
<b>Figure 23</b> Effet de Cd (50, 150, 300 ppm) sur la teneur en chlorophylle totale.	65
<b>Figure 24</b> Effet de Cd (50, 150, 300 ppm) sur la teneur en caroténoïdes.	65
<b>Figure 25</b> Effet de Cd (50, 150, 300 ppm) sur la teneur en malondialdéhyde (MDA)	67
<b>Figure 26</b> Effet de Cd (50, 150, 300 ppm) sur la teneur en peroxyde d'hydrogène (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	67
<b>Figure 27</b> Effet de Cd (50, 150, 300 ppm) sur l'activité de l'APX	68
<b>Figure 28</b> Effet de Cd (50, 150, 300 ppm) sur l'activité de catalase.	69
<b>Figure 29</b> Effet de Cd (50, 150, 300 ppm) sur l'activité de peroxyde.	70
<b>Figure 30</b> Effet de Cd (50, 150, 300 ppm) sur l'activité de la Glutathion S-transférases.	71
<b>Figure 31</b> Effet de Cd (50, 150, 300 ppm) sur l'activité de phénylalanine aminolyse.	71
<b>Figure 32</b> Effet de Cd (50, 150, 300 ppm) sur la teneur en proline	72
<b>Figure 33</b> Effet de Cd (50, 150, 300 ppm) sur le taux de l'acide ascorbique	73
<b>Figure 34</b> Effet de Cd (50, 150, 300 ppm) sur la teneur en GSH.	74
<b>Figure 35</b> Effet de Cd (50, 150, 300 ppm) sur la teneur en NPT.	75
<b>Figure 36</b> Effet de Cd (50, 150, 300 ppm) sur la teneur en PC.	76
<b>Figure 37</b> Effet de Cd (50, 150, 300 ppm) sur la teneur en flavonoïdes.	77
<b>Figure 38</b> Effet de Cd (50, 150, 300 ppm) sur la teneur en phénols.	77
<b>Figure 39</b> Effet de Cd (50, 150, 300 ppm) sur la capacité antioxydante (DPPH).	78
<b>Figure 40</b> Effet de Cd sur l'anatomie des plants de soja.	79
<b>Figure 41</b> Coupe transversale d'une Racine de <i>Glycine max (L.) Mer.</i>	80
<b>Figure 42</b> Coupe transversale de la racine témoin (A1):(Gx4), (B1):(Gx10), (C1):(Gx40)	81
<b>Figure 43</b> Coupe transversale d'une racine stressée à 50 ppm. (A2):(Gx4), (B2):(Gx10), (C2):(G x40)	82
<b>Figure 44</b> Coupe transversale d'une racine stressée à 150 ppm (A3):(Gx4), (B3):(Gx10), (C3):(G x40)	82
<b>Figure 45</b> Coupe transversale d'une racine stressée à 300 ppm. A4. (Gx4), (B4):(Gx10), (C4):(G x40)	82
<b>Figure 46</b> Coupes transversales d'une Tige de <i>Glycine max (L.)Mer</i>	84
<b>Figure 47</b> Coupe transversale de la tige témoin. (A5):(Gx4) (B5):(Gx10) (C5):(Gx40)	85
<b>Figure 48</b> Coupe transversale d'une tige stressée à 50 ppm. (A6):(Gx4) (B6):(Gx10) (C6):(G x40)	85
<b>Figure 49</b> Coupe transversale d'une tige stressée à 150 ppm. (A7):(Gx4) (B7):(Gx10) (C7):(G x40)	85
<b>Figure 50</b> Coupe transversale d'une tige stressée à 300 ppm (A8):(Gx4) (B8):(Gx10), (C8):(G x40)	86

## LISTE DES ABREVIATIONS

<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>AsA</b>	Ascorbate
<b>ATP</b>	Adénosine triphosphate
<b>BSA</b>	Bovine Sérum albumine
<b>Car</b>	Caroténoïdes
<b>CAT</b>	Catalase
<b>Cd</b>	Cadmium
<b>Cd(OH)<sup>+</sup></b>	Hydroxyde de cadmium
<b>CdCl<sub>2</sub></b>	Cadmium chloride
<b>CdCO<sub>3</sub></b>	Carbonate de cadmium
<b>CdHCO<sub>3</sub></b>	Carbonate d'hydrogène de cadmium
<b>CEC</b>	Capacité d'échange cationique
<b>Chl a</b>	Chlorophylle a
<b>Chl b</b>	Chlorophylle b
<b>CTE</b>	La chaîne de transport des électrons
<b>DCT1</b>	Cation divalent 1
<b>DDT</b>	Dich loro diphenyl trichloro ethane
<b>DM</b>	Deltaméthrine
<b>DMT1</b>	Transporteur de métaux divalents 1
<b>EDTA</b>	Ethylène diamine tetra-acétique acide
<b>Eh</b>	Potentiel redox
<b>EPT</b>	Éléments potentiellement toxiques
<b>ERN</b>	Espèces réactives de l'azote
<b>ERO</b>	Espèces réactives de l'oxygène
<b>GR</b>	Glutathion réductase
<b>GSH</b>	Glutathion
<b>GSNO</b>	S-nitrosoglutathione
<b>GST</b>	Glutathion-S-transférases
<b>GST</b>	Glutathion-S-transférases
<b>HCB</b>	Hexachlorure de benzène
<b>HCH</b>	Hexachlorocyclohexanes
<b>HSP</b>	Protéines de choc thermique
<b>IMI</b>	Imidaclopride
<b>ITCMI</b>	Institut technique des cultures maraîchères et industrielles
<b>K Da</b>	Kilo dalton
<b>LPO</b>	Peroxydation des lipides
<b>MDA</b>	Malondialdéhyde

<b>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub></b>	Dinitrogène trioxyde
<b>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub></b>	Tétraoxyde de diazote
<b>NO<sup>+</sup></b>	Le nitrosonium
<b>NO<sub>2</sub></b>	Radical de dioxyde d'azote
<b>NOX</b>	NADPH oxydases
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	Le radical superoxyde
<b>OPT</b>	La famille des transporteurs d'oligopeptide
<b>PAL</b>	Phénylalanine ammoniac lyase
<b>PC</b>	Phytochélatines
<b>PC</b>	Phytochélatine
<b>POC</b>	Pesticides organochlorés
<b>POP</b>	Pesticides organophosphorés
<b>ppm</b>	Partie par million
<b>PSI</b>	Les photosystèmes I
<b>PSII</b>	Les photosystèmes II
<b>PST</b>	Protéines solubles totales
<b>PSV</b>	Protéines de stockage vacuolaires
<b>RE</b>	Le réticulum endoplasmique
<b>Si-OH</b>	Silanol
<b>SOD</b>	Superoxyde dismutase
<b>SST</b>	Sucre soluble total
<b>TBARS</b>	Thiobarbiturique substances réactives acides
<b>TCA</b>	Trichloracétique acide
<b>w/v</b>	Poids par volume
<b>ZIP-IRT1</b>	Transporteur réglementé par le zinc/fer réglementé
<b>ZnCO<sub>3</sub></b>	Carbonate de zinc

# **INTRODUCTION**

## Introduction

La pollution de l'environnement par les métaux lourds est l'un des aspects les plus importants d'un problème environnemental et sanitaire croissant, principalement en raison de la non-biodégradabilité et des demi-vies biologiques plus longues. Ces métaux lourds sont essentiels et bénéfiques pour les plantes en faibles quantités, mais lorsqu'ils sont présents en excès, ils sont toxiques pour les plantes. En revanche, d'autres métaux lourds, dont le cadmium (Cd), le plomb (Pb) et le mercure (Hg) sont non essentiels et très toxiques pour les plantes.

Parmi ces métaux, le cadmium (Cd) est un métal lourd toxique, présent dans l'environnement principalement en raison des activités anthropiques telles que les industries métallurgiques, les cimenteries, les fonderies, les raffineries et la production d'engrais phosphatés, est ensuite transféré dans la chaîne alimentaire. Le cadmium inhibe la croissance des plantes en raison de l'altération du taux de photosynthèse, de l'absorption et de la distribution des macro- et micro-éléments et des perturbations des défenses antioxydantes. La chaîne contaminée est également une source d'exposition au cadmium, un métal lourd qui est une neurotoxine, une toxine rénale et un agent de reproduction toxique pour l'être humaine.

Les stress environnementaux conduisent à la production de substances hautement réactives appelées les espèces réactives d'oxygène (ERO), qui interagissent avec un certain nombre de molécules et métabolites causant des lésions cellulaires. De plus, les plantes développent des systèmes de défense antioxydant enzymatique et non enzymatique, qui contrecarrent l'effet des ERO en les piégeant et en protégeant les pigments photosynthétiques et les fonctions cellulaires.

Dans l'alimentation humaine et animale, les plantes de *soja* sont un constituant important. En outre, outre sa capacité à fixer l'azote mobile, le soja est cultivé pour ses graines oléagineuses riches en protéines, en graisses, en sels minéraux et en vitamines. Cette huile de soja a une composition nutritionnelle particulière qui en fait la plus grande huile oléagineuse au monde destinée à la consommation humaine.

C'est dans ce contexte que se situe ce travail de thèse dont l'objectif principal est d'étudier l'effet de différentes doses du cadmium (Cd) sur la réponse morphologique physiologique et anatomique de *soja* (*Glycine max* L.). Nous avons mené à choisir (*Glycine max* L.) comme plante modèle et le Cd comme élément inducteur du stress métallique.

Nous avons choisi de travailler sur le *Soja (Glycine max L.)* parce que le soja présente aussi une importance pour la filière légumes comme composante d'alimentation humaine et animale. Le soja représente plus de 50 % de la consommation d'huile végétale. Le soja est non seulement riche en matières grasses, en hydrates de carbone, en vitamine C et en minéraux, mais il a également fait l'objet d'une attention particulière en raison de ses propriétés anticancéreuses.

Ce travail a été organisé en trois parties, auxquelles correspondent trois chapitres.

- Dans la première partie nous exposons une recherche bibliographique sur les données de cadmium et le stress, généralité sur les métaux lourds particulièrement cadmium, le stress oxydatif, différents procédés de phytoremédiation et le soja (*Glycine max L.*)
- La deuxième partie expose la méthodologie adoptée, par la préparation des échantillons, le protocole expérimental et la technique d'analyse retenue dans notre étude.
- Enfin une troisième partie aborde les résultats obtenus, discussion et enfin d'une conclusion générale.

**PREMIERE PARTIE**  
**SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE**

**CHAPITRE I :**  
**LA CONTAMINATION DE**  
**L'ENVIRONNEMENT PAR LES**  
**METAUX LOURDS**

La pollution des sols, de l'air, des eaux et des sédiments par des métaux toxiques est l'un des principaux problèmes auxquels notre monde industrialisé est actuellement confronté. Les niveaux naturels de ces métaux ont été largement dépassés par diverses activités anthropiques, l'utilisation dans les produits commerciaux sont à l'origine de la pollution par le cadmium et d'autres types de métaux lourds (**Cuypers ,2016; Romero-Puertas ,2019**). La contamination des sols par ces métaux lourds est l'un des aspects les plus importants d'une crise écologique et sanitaire croissante à cause de leur non-biodégradabilité et de leur plus longue demi- vie biologique. La présence de ces métaux dans les sols peut être bénéfique ou toxique pour l'environnement (**Gallego et al. ,2012; Gupta et al. ,2019; Shi et al. ,2019**).

## 1 Les métaux lourds :

Les métaux lourds sont des métaux naturels dont le numéro atomique (Z) est supérieur à de 20 et une densité élémentaire supérieure à 5 g cm<sup>3</sup>. Ils sont des éléments inorganiques qui ont une densité cinq fois supérieure à celle de l'eau (**Shi et al. ,2019; Singh et al. ,2017**). Dans la croûte terrestre, les métaux lourds sont souvent présents sous forme d'ions. Ces ions présents dans la solution du sol peuvent pénétrer dans les racines et être chargés dans le xylème du système vasculaire où ils sont ensuite transférés vers les parties aériennes le long du flux de transpiration

(**Shi et al. ,2019**). La mobilisation des métaux peut être facilitée par des phénomènes naturels mais également par des activités anthropiques. Les sources naturelles comprennent les éruptions volcaniques, l'altération des roches et l'érosion. Tandis que les activités anthropiques sont principalement l'irrigation des eaux usées, les engrais, les pesticides et les applications de boues, les activités industrielles, l'élimination des déchets solides (**Gupta et al. ,2019; Romeo –Puertas et al. ,2019**).

Chez les végétaux les micronutriments essentiels se trouvent à 0,01 % comprennent le cuivre (Cu), le fer (Fe), le nickel (Ni) et le zinc (Zn). Ces micro-minéraux fonctionnent comme des cofacteurs dans plus de 1500 protéines sont essentielles au métabolisme de la plante « la photosynthèse, la respiration des mitochondries », tandis que les enzymes contenant du Zn sont des régulateurs importants de transcription et traduction (**Cuypers et al. ,2016; Gupta et al. , 2019**). Par contre, les principales menaces que les métaux lourds font peser sur les plantes sont associées à l'exposition au cadmium (Cd), l'arsenic (As), plomb (Pb) et au cuivre (Cu) (**Wei et al. ,2020**).

Ces éléments peuvent perturber les processus biochimiques et physiologiques et diminuer la productivité des plantes (**Cuypers et al. ,2016**). L'exposition aux métaux lourds induit une inhibition de la croissance, une sénescence accélérée, une inhibition de l'absorption des nutriments

ou la mort cellulaire chez les plantes. La consommation des nutriments contenant des traces de ces éléments toxiques contribue potentiellement à l'exposition humaine à des risques pour la santé humaine (Clemens et Ma, 2016).

### 1.1 Le cadmium :

Le cadmium a été découvert par **Karl Hermann** et **Friedrich Romeyer** en **1817** à partir de l'oxyde de zinc produit lors du processus de grillage du carbonate de zinc. Le cadmium a été trouvé sous forme d'anions de cadmium, et était insoluble dans les bases. Son nom vient de *cadmia fossilis*, qui désignait anciennement le minerai de zinc (Javed et al., 2018). Le cadmium est un métal tendre, blanc argenté, ductile, avec une légère teinte bleutée. Est un élément du groupe IIB et est caractérisé comme un métal lourd (Zhang et Reynolds, 2019). Le cadmium (Cd) a un numéroatomique de 48 et une masse atomique de 112,4 g/mol. Il revient à la famille des métaux de transition (Qin et al., 2020).

### 1.2 Les propriétés physico-chimiques :

Le cadmium est un polluant extrêmement toxique à l'état de traces et présente une grande mobilité dans le système sol-plante (Shiun et al., 2020 ; Gallego et al., 2017). Cependant, le cadmium est généralement considéré comme un élément non essentiel, n'ayant aucune fonction biologique et relativement instable (Zhang et Reynolds, 2019). Ce métal possède une grande solubilité dans l'eau ce qui permet facilement d'entrer dans la chaîne alimentaire par les plantes comestibles (Romero-Puertas et al., 2019; Vazquez et al., 2020).

Selon l'Agence américaine pour la protection de l'environnement (EPA), le Cd est le troisième contaminant le plus dangereux pour l'environnement après le mercure et le plomb. Il est considéré comme le seul métal qui présente des risques pour la santé des hommes et des animaux à des concentrations dans les tissus végétaux qui ne sont généralement pas phytotoxiques (Ismael et al., 2019). Le Cd n'est présent que sous forme inorganique et dans un état d'oxydation (+2). Sa biodisponibilité dépend en grande partie des conditions du sol, il dépend fortement de la structure du sol, de la matière organique et du pH (Clemens et Ma, 2016; Romero-Puertas et al., 2019).

Le Cd est plus disponible dans les sols aérobie que dans les sols anaérobies en raison de la formation de Cds insoluble dans ces derniers (Clemens et Ma, 2016).

De plus, le Cd a une longue demi-vie biologique qui peut aller jusqu'à 30 ans. Il est efficacement conservé, c'est un polluant pertinent et sa biodisponibilité est bien supérieure à celle du plomb, de l'arsenic ou du mercure (Clemens, 2006; Clemens et al., 2013; Gallego et Benavides, 2018).

### 1.2.1 Propriétés chimiques :

La biologie du cadmium ressemble à celle du zinc en ce qui concerne la flexibilité de la coordination et l'absence de chimie redox. Ainsi, le seul état de valence important pour la biologie est le cadmium (II). Avec une coque remplie d'électrons, Il a donc une stabilité légèrement inférieure dans les complexes avec l'oxygène et des ligands d'azote. Cependant, les affinités relatives des deux ions sont inversées pour les ligands de soufre, car le cadmium est considérablement plus thiophile que le zinc (**Sigel et al. ,2003**).

En tant que membre du groupe 12 du tableau périodique, le cadmium (Z= 48, poids atomique 112,41) est similaire au zinc et au mercure dans ses propriétés chimiques et physiques (**Tableau 1**). En effet, le Cd a d'abord été isolé et identifié comme une impureté dans les carbonates contenant du Zn (par exemple, la smithsonite ; ZnCO<sub>3</sub>(s). Le cadmium se présente comme un métal divalent blanc-bleuâtre, mou et malléable. A 25°C, le Cd a une densité spécifique de 8,65 g.cm<sup>-3</sup>, le point d'ébullition est de 765°C et le point de fusion de 321°C (**Javed et al. ,2018**).

**Tableau 1:** Propriétés physiques et chimiques pertinentes du cadmium (**Sigel et al. ,2003**)

Propriétés	
Numéro atomique	48
Poids atomique (g mol <sup>-1</sup> )	112.411
Rayon atomique (pm)	155
Rayon ionique de Cd <sup>2+</sup> (pm)	95
Point de fusion (°C)	320.9
Point d'ébullition (°C)	767.3
Densité a 25 °C (g cm <sup>-1</sup> )	8.642
États d'oxydation	+2 , +1 (non commun)

### 1.2.2 L'abondance dans la croûte continentale :

Les métaux lourds sont plus abondants dans les roches sédimentaires telles que les schistes, dont la teneur en Cd entre 11 mg/kg (**Tabelin et al. ,2018**). Le cadmium est un élément rare dans la croûte terrestre, avec une concentration dans la lithosphère de 0,08-0,1 ppm. En tant qu'élément chalcophile, le Cd a tendance à se concentrer dans les minéraux sulfurés (**Sigel et al. ,2003**).

**Zhang et Reynolds (2019)** rapportent que le Cd est un élément avec une abondance de 0,15mg/kg dans la croûte terrestre et une abondance de  $1,1 \times 10^{-4}$  mg/L dans la mer.

### 1.3 Les sources de cadmium :

Les métaux accumulés naturellement sont insignifiants par rapport à ceux causés par l'activité anthropique. La majeure partie du Cd bio disponible dans l'environnement est d'origine anthropique (**Terrón-Camero et al. ,2019**). Dans la nature, les composés du Cd peuvent exister en plusieurs phases et se trouvent dans l'air, l'eau, et les sédiments (**Clemens et Ma, 2016; Gallego et al. ,2012**).

Les écosystèmes agricoles modernes ont continuellement reçu des contaminations croissantes en Cd provenant de sources naturelles et de sources anthropiques, notamment les activités minières et l'application d'engrais contenant du Cd et de boues d'épuration sur les terres agricoles, ce qui a entraîné une contamination du sol par le Cd et une augmentation de l'absorption du Cd par les cultures et les légumes destinés à la consommation humaine. Les activités humaines contribuent de 3 à 10 fois plus de Cd à l'environnement que les sources naturelles (**Chen et al. ,2019**).

#### 1.3.1 Les sources naturelles de cadmium :

Le Cd est un élément naturel et un composant naturel des roches ; la concentration de Cd est de 0 ~ 11 mg kg<sup>-1</sup> dans la croûte terrestre. Le Cd est transféré dans l'environnement (par exemple, dans les sols) par des processus naturels et anthropiques et est généralement présent dans l'environnement à de faibles niveaux. Cependant, les concentrations moyennes de Cd dans les sols sans source anthropique évidente varient entre 0,06 et 1,10 mg kg<sup>-1</sup>. Cette différence signifie que l'altération des roches mères peut produire un enrichissement naturel en Cd dans les sols (**Kumaret al. ,2016**).

En général, 25 000 tonnes de Cd sont libérées dans l'atmosphère chaque année, dont la moitié est produite par l'altération des roches, et l'autre moitié par les volcans et les feux de forêt (**Javed et al. ,2018**) Le cycle biogéochimique naturel du Cd a été altéré par les activités humaines qui intensifient progressivement le transfert du Cd des continents vers l'atmosphère, les rivières, les mers et les océans (**Ningjing et al. ,2017**).

#### 1.3.2 Les sources anthropiques de cadmium :

Les principales sources sont les rejets des activités d'extraction ou de fusion des métaux et l'application d'engrais phosphatés contenant des impuretés de Cd (**Clemens et Ma, 2016; Vazquez et al. ,2020**).

D'une part, les activités agricoles (irrigation, amendements calcaires, ainsi que les engrais inorganiques, et les boues d'épuration), l'électricité produite à partir du charbon et du pétrole, les activités industrielles (fonte de fer et d'acier et produits chimiques), l'exploitation minière et les

déchets des méthodes de travail à la chaîne sont les principales causes de contamination par les métaux lourds (**Terrón-Camero et al. ,2019**). D'autre part, il est rejetés dans l'environnement par les systèmes de chauffage, les industries, les incinérateurs de déchets, le trafic urbain, les cimenteries et comme un contaminant des engrais phosphatés (**Gallego et al. ,2012**).

#### **1.4 Les facteurs affectant la biodisponibilité du cadmium dans le sol :**

Le sol est le principal facteur responsable de la disponibilité des métaux lourds pour les plantes. La géologie sous-jacente détermine principalement la teneur en métaux dans le sol par un processus d'altération sur une longue période (**Gupta et al. ,2019**).

Parmi les facteurs qui entraînent la mobilisation de cadmium dans un environnement de sol sont notamment :

##### **1.4.1 Le pH :**

Le pH est considéré comme le principal facteur qui affecte la solubilité des métaux dans le sol. Il influence grandement la chimie et la mobilité du Cd dans les sols agricoles. Le cadmium et ses composés sont relativement solubles dans l'eau en conditions acides, mais la solubilité du Cd est limitée par la formation de carbonate de cadmium ( $\text{CdCO}_3$ ) ou l'adsorption du Cd sur la phase solide du sol dans les sols neutres à alcalins (**Gupta et al. ,2019; QIN et al. ,2020**). Les sols fortement acides et la salinité élevée du sol (chlorure) favorisent l'absorption du Cd par toutes les plantes (**Chaney et al. ,2019**).

D'autre part, à faible pH du sol, la solubilité du Cd dans les phases solides, telles que carbonates, hydroxydes et phosphates, sera augmentée. Tandis qu'à un pH du sol plus élevé, le Cd est susceptible de former du  $\text{Cd}(\text{OH})^+$  par hydrolyse, ce qui a permis d'améliorer l'affinité d'adsorption du Cd avec le sol (**Li et al. ,2017**).

**Ismael et al. (2018)** rapportent que la teneur en Cd des plants de colza cultivés dans un sol pollué par le Cd était nettement plus élevée à pH 4,0 qu'à pH 5,0. En milieu acide, le Cd se présente sous forme d'ions  $\text{Cd}^{2+}$  libres ; toutefois, à pH 6-7, la majeure partie du cadmium existe sous d'autres formes telles que le Cd Cl, le  $\text{CdHCO}_3$  et le  $\text{CdCO}_3$  hydraté avec des complexes de cadmium tels que le  $\text{CdCl}_n$  à la disposition des plantes.

##### **1.4.2 La matière organique :**

La teneur en matière organique joue un rôle essentiel dans la déduction de la mobilité et la disponibilité du Cd dans le sol. Elle réduit la quantité de Cd bio disponible dans le sol par adsorption. D'autre part, elle convertit le Cd soluble/échangeable en une fraction organiquement liée, ce qui aboutit à la formation de complexes stables avec des substances humiques pour réduire l'absorption ou la biodisponibilité. L'application du compost a permis dans une quantité inférieure d'environ 70 % de substances solubles/échangeables Cd dans un sol contaminé par le Cd (**Li et al.**

,2017).

(Pan et al. ,2016) rapportent que la matière organique du sol et les oxydes métalliques jouent un rôle important dans l'adsorption et l'occlusion des métaux traces dans les sols.

#### **1.4.3 La capacité d'échange de cations :**

La capacité d'échange de cations affecte également la mobilité du Cd dans le sol ; un mécanisme important dans la sorption de cations est le remplacement du magnésium de structure Mg avec Cd sur les bords des feuilles octaédriques, bien la liaison aux groupes silanol (Si-OH) peut également se produire (Qin et al. ,2020).

#### **1.4.5 Potentiel redox du sol (Eh) :**

Le potentiel d'oxydoréduction du sol détermine la tendance de la solution du sol d'accepter ou de donner les électrons. La solubilité et la biodisponibilité du cadmium dans le sol dépendent principalement du potentiel redox du sol (Eh). La forme prédominante de Cd absorbée par les plants de riz est le  $Cd^{2+}$ , et l'absorption est supprimée dans des conditions réduites (Gupta et al. ,2019; Honma et al. ,2016).

#### **1.4.6 La concentration de cadmium dans le sol :**

En général, les concentrations de Cd dans les sols non pollués sont d'origine géogénique et sont généralement inférieures à 0,5 mg kg<sup>-1</sup> de sol sec mais peuvent atteindre jusqu'à 3,0 mg kg<sup>-1</sup> ou plus de 100 mg dm<sup>3</sup> dans les 25 cm supérieurs de la couche de sol en raison de diverses activités humaines. En particulier, l'application d'engrais phosphatés est une cause importante de pollution par le Cd dans les sols agricoles, la teneur en Cd des engrais phosphatés allant de moins de 3,6 à 527 mg kg<sup>-1</sup>. La concentration de  $Cd^{2+}$  dans la solution du sol et le coefficient de diffusion du  $Cd^{2+}$  dans les solutions aqueuses régissent le transport du  $Cd^{2+}$  vers les racines des plantes (Qin et al. ,2020).

Les métaux lourds comme le Pb, le Cd, le Cu et le Zn sont largement répartis dans les roches et les sols, mais seulement en quantités infimes (c'est-à-dire en mg/kg). Les roches ignées comme le basalte et le granit peuvent contenir jusqu'à 160 mg/kg Cd (Tabelin et al. ,2018).

#### **1.5 Le mécanisme de toxicité du cadmium :**

L'absorption, la translocation, la détoxification et la séquestration des métaux lourds sont des processus clés dans les plantes pour traiter les quantités excessives des métaux lourds. Les plantes supérieures peuvent absorber le cadmium du sol et de l'eau par leurs cellules racinaires, en fonction de sa disponibilité et de sa concentration, et une petite quantité peut être absorbée directement dans l'atmosphère (Gallego et al. ,2012; Ismael et al. ,2019; Qin et al. ,2020).

L'hyper accumulation des métaux lourds par les plantes supérieures comporte trois étapes :

- ✓ Transport des métaux à travers la membrane plasmique des cellules racinaires.
- ✓ Chargement et transfert du xylème.
- ✓ Détoxification et séquestration des métaux au niveau de la plante entière et des cellules.

Le transport du Cd à travers la membrane cellulaire des racines est l'étape initiale de son absorption. En raison de sa grande mobilité et de sa solubilité dans l'eau, le Cd pénètre facilement les racines à travers le tissu cortical. De plus, l'accumulation de Cd dans les pousses de plantes dépend principalement de l'entrée du Cd par la racine, de sa séquestration dans les vacuoles de la racine, de sa translocation dans le xylème et le phloème tout au long de sa croissance (**Gallego et al. ,2012; Ismael et al. ,2019; Kumar et al. ,2016**).

### 1.5.1 Absorption et transport de Cd par les racines :

Après absorption par les racines, le Cd est transféré sur les tiges par xylème en peu de temps. Le xylème a permis le transfert de Cd des racines aux pousses comme principal facteur décisif pour l'accumulation de Cd dans les pousses a été confirmé dans un certain nombre de plantes y compris le riz (**Li et al. ,2017**).

(**Shi et al. ,2015**) rapportent que l'absorption et le transfert de l'As et du Cd dans les cultures et les légumes varient considérablement entre les cultivars d'une même espèce.

D'autre part, des facteurs externes tels que le Fe a tendance à réduire l'absorption de Cd, comme l'indique *Hordeum vulgare*. Dans le système de transport de *A. halleris*, Zn et Fe déplace le Cd du milieu vers le xylème racinaire (**Kumar et al. ,2016**).

L'absorption des cations métalliques divalents  $M^{2+}$  se fait en deux étapes, l'adsorption apoplastique puis l'absorption symplastique, il existe deux grandes voies d'écoulement de l'eau dans les plantes, l'apoplastique et les voies symplastiques (**Figure 01**).

#### 1.5.2 .1 La voie apoplastique :

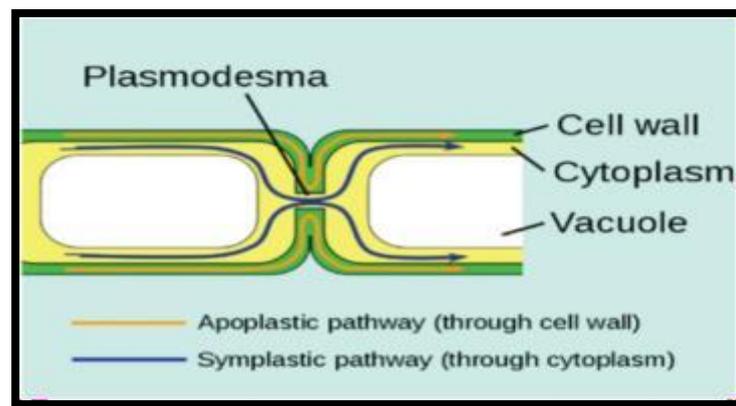
Dans la voie apoplastique, les mouvements d'eau dans les espaces libres (apoplasme) à l'intérieur de la plante qui ne sont pas délimités par des membranes, ce qui inclut le mouvement le long des parois cellulaires et dans les espaces intercellulaires. Cette étape, c'est-à-dire l'absorption des ions métalliques de la solution du sol, les cations s'accumulent dans l'apoplaste des racines de la plante qui est contrôlée par les propriétés d'échange de la paroi cellulaire et dépendante du pH, car les groupes fonctionnels dans les parois cellulaires des racines, c'est-à-dire des groupes carboxyle, se déprotonent de plus en plus avec une augmentation du pH du sol.

La voie apoplastique est une voie rapide et spontanée, ce qui signifie qu'elle ne nécessite aucune énergie (système passif).

### 1.5.2.2 La voie symplastique :

Dans la symplastique l'eau traverse le symplaste, qui consiste en un cytoplasme et plasmodesmata (minuscules connexions entre le cytoplasme des cellules adjacentes).

Ce processus, l'absorption symplastique, est un processus actif et dépend de l'activité métabolique, et elle est aussi beaucoup plus lente et dépend de l'activité métabolique, et elle est aussi beaucoup plus lente par rapport à la première étape.



**Figure 01** : Les voies apoplastique et symplastique (Ismael et al. ,2019).

Le cadmium peut pénétrer dans les cellules racinaires par divers canaux et par plusieurs classes de protéines membranaires sont impliquées dans l'absorption du Cd chez les plantes (Ismael et al. ,2019; Li et al. , 2017).

## 1.6 Protéines de transport membranaires :

### 1.6.1 Les transporteurs ZIP-IRT1:

Les transporteurs ZIP-IRT1 (transporteur réglementé par le zinc/fer) sont des protéines non spécifiques responsables de l'absorption du fer à haute affinité de sol. Ce sont des protéines de transport membranaire plasmiques décrites pour la première fois dans Arabidopsis, ils sont induits à la fois dans les racines et les pousses dans des conditions limitant de Zn. Les membres de la ZIP ont été maintenant identifiés dans plusieurs espèces des plantes, ainsi que dans les bactéries, les champignons et les animaux. Plusieurs résultats indiquent qu'ils sont impliqués dans le transport des cations divalents à travers les membranes.

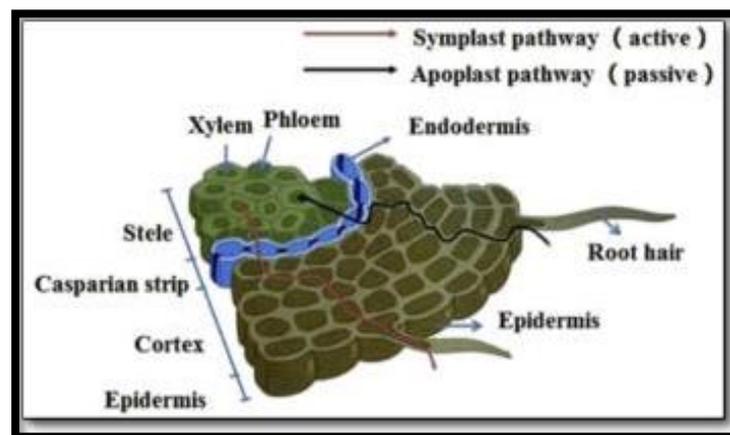
(Gallego et al., 2012) rapportent que le cadmium peut pénétrer dans les cellules des racines sous forme de  $Cd^{2+}$  par Les transporteurs ZIP tels que les orthologues d'AtIRT1 et Tc ZNT1/TcZIP4, par les orthologues du transporteur TaLCT1 du blé, ou par cation. En outre, Le rapport Zn/Cd est très pertinent pour l'évaluation de la toxicité du Cd, car le Cd peut être transféré

dans l'usine par le transporteur Zn ZNT1.

### 1.6.2 Transporteurs de type "Yellow Stripe-Like" (YSL)

Ils font partie de la famille des transporteurs d'oligopeptides (OPT) et sont impliqués dans le transport de complexes métal-nicotianamine à travers la membrane de la cellule végétale. Ainsi, lorsque le Cd est complexé, elle peut être absorbée par les protéines YSL. En outre, le SnYSL3 est un transporteur en fournissant une large gamme de complexes métal-nicotinamine, qui est potentiellement important pour la lutte contre les métaux lourds stress, en particulier pour Cd et Fe (Gallego et al. ,2012; Ismaël et al. ,2019)

Famille SnYSL3 : La famille des protéines de la résistance naturelle associée macrophages (NRAMP) est un autre groupe de transporteurs de métaux qui transportent plusieurs cations et sont maintenant reconnus comme des transporteurs d'ions métalliques couplés aux protons. Les transporteurs NRAMP, également connus sous le nom de DCT1 (cation divalent 1) ou DMT1 (transporteur de métaux divalents 1), ont une large gamme de substrats d'ions métalliques, dont Zn, Fe, Mn, Cu, Al, Ni, Cd, Co et Pb, et différentes fonctions dans différentes espèces (Ismaël et al. ,2019 ; Figure 02



**Figure 02:** Voies de transport du Cd des racines vers les pousses (Li et al. ,2017).

### 1.7 L'accumulation et distribution de cadmium dans les tissus :

Une fois que le Cd pénètre dans un organisme, la bioaccumulation du métal peut être trouvée dans divers tissus. Les plantes entières contenaient généralement un Cd plus élevé que les tissus mous des palourdes (Zhang et Reynolds, 2019). La bioaccumulation du Cd est influencée par des facteurs tels que la génétique des plantes, la teneur en Cd dans le sol.

Plusieurs études ont noté que l'accumulation supplémentaire de Cd dans les grains se fait par l'intermédiaire du phloème. Li et al. ,2017 montrent que OsHMA3 joue un rôle essentiel dans la compartimentation du Cd en vacuoles dans les cellules racinaires ; tandis que l'OsHMA2 participe à l'acheminement du Cd vers des tissus en développement. Après le transfert du

xylème au phloème au niveau des nœuds, le Cd est favorablement transporté vers les nœuds supérieurs et finalement dans la panicule plutôt que dans les feuilles.

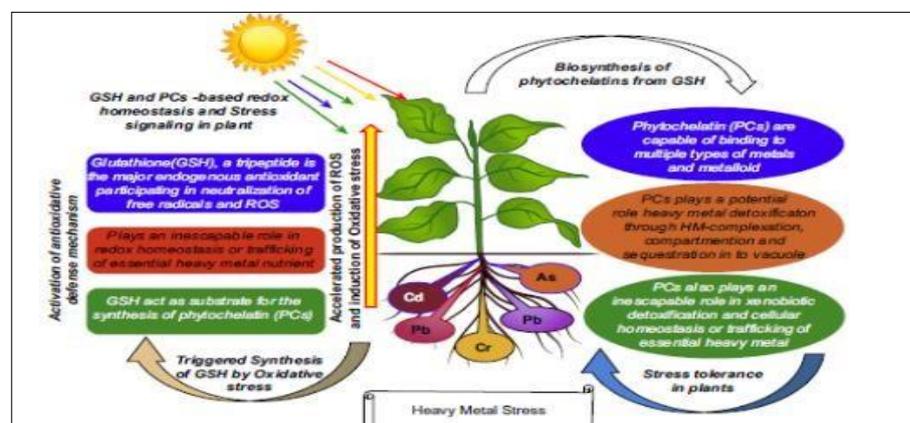
Le terme "hyper accumulateur" a été inventé par **Brooks, 1998** pour les plantes afin de les différencier des plantes exclusives. Ces usines procèdent activement à une réévaluation essentielle de la teneur en cobalt et en Cu hyper accumulateurs. (**Kumar et al. ,2016**) montrent que les espèces *Arabidopsis*, *Thlaspi*, *Solanum nigrum* et *S. alfredii* ont également été inclus comme accumulateurs de Cd.

### 1.8 Chélation et séquestration du cadmium dans les vacuoles

La chélation des métaux lourds par un ligand est considérée comme un mécanisme général de tolérance chez les plantes, bien que dans certains cas, la compartimentation ultérieure d'un ligand du complexe métallique.

Les symptômes de toxicité créés par les métaux observés sont peut-être dus à l'interaction des métaux lourds au niveau moléculaire et cellulaire. Elle peut être due à la liaison du métal lourd au groupe sulfhydryle de différentes protéines ainsi qu'à la génération de radicaux libres, entraînant l'inhibition ou la destruction de la cellule. La chélation cytosolique de métaux lourds implique les peptides et d'autres molécules organiques. La séquestration apoplasmique de certains ions métalliques, dans l'orge a également été rapportée.

Les vacuoles comprennent la destination finale pour une importante portion de la charge cellulaire HM, soit sous forme d'ions libres ou sous sa forme liée avec des molécules spécifiques telles que phytochélatines (PC). Ces dernières sont produites spécifiquement en réponse à l'exposition aux métaux lourds, en particulier Cd et As, à partir de GSH comme un précurseur. Le complexe HM-PC (es) est séquestré dans les vacuoles suivi par un transport à médiation par l'intermédiaire de transporteurs ABC (**Kumar et al. ,2016; Sharma et al. ,2016 ; Figure 03**).



**Figure 03:** La figure montre l'homéostasie redox à base de glutathion (GSH) et de phytochélate (PC) et la signalisation du stress chez les plantes soumises à un stress de métaux lourds. ERO, espèces réactives de l'oxygène (**Singh et al. ,2015**)

## 2. Les mécanismes cellulaires impliqués dans la tolérance des plantes :

Les mycorhizes extracellulaires et les exsudats de la paroi cellulaire agissent comme des protecteurs contre les métaux lourds. Le plasma peut également participer à la tolérance, soit en réduisant l'absorption des métaux lourds, soit en augmentant des ions métalliques d'efflux. Parmi les mécanismes impliqués dans la tolérance :

### 2.1 Acides organiques

La sécrétion d'acide organique améliore l'absorption des racines par la mobilisation des métaux lourds. Il existe de nombreux acides organiques de faible poids moléculaire qui peuvent influencer la libération du Cd dans le sol. La solubilité du Cd est due à la formation d'un complexe d'acides organiques de faible poids moléculaire, par exemple l'acide acétique et le succinate présents dans la rhizosphère du blé (kyle), qui sont responsables de l'accumulation du génotype Cd et de la non-accumulation du génotype (Arcola) (Kumar et al., 2016).

### 2.2 Réductases racinaires :

La réduction de  $Fe^{3+}$  ou  $Cu^{2+}$  pour augmenter l'absorption de Fe, Cu, Mn et Mg par certains cotes se fait avec un faible apport de Fe et Cu. Les gènes de la Ferro-réductase sont clonés d'Arabidopsis et de maïs. Les caractéristiques des enzymes de la racine réductase pour la tolérance de l'hyper accumulation des métaux transformés dans la zone

### 2.3 Les phytochélatines :

Les PC sont de petits polypeptides de faible poids moléculaire, riches en cystéines et dotés d'une structure générale (g-Glu- Cys)<sub>n</sub> Gly, où n = 2-11. Ils sont synthétisés par voie enzymatique et participent à la détoxification des métaux lourds dans les plantes poussant dans un sol riche en métaux.

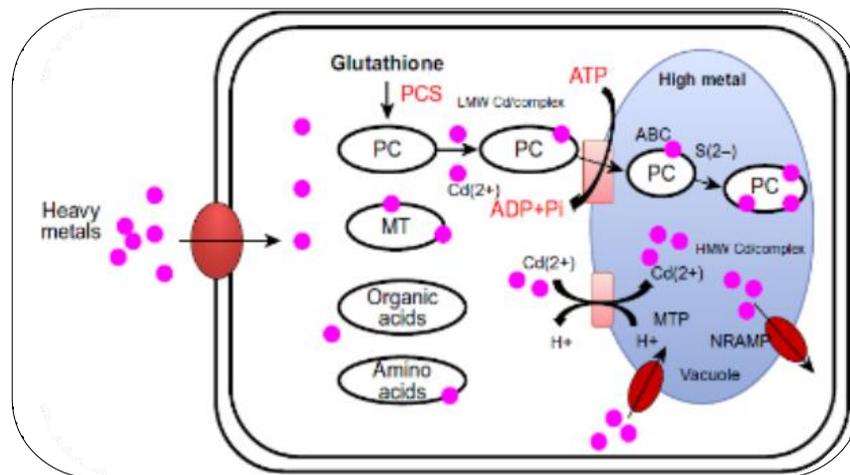
À ce jour, les PC ne sont pas seulement signalés dans les plantes mais ont également été trouvés dans des champignons et d'autres organismes. En plus, ils ont la capacité de se lier à différents métaux, dont le Cd, le Cu, le Zn ou l'As, par l'intermédiaire des résidus sulfhydryle et carboxyle, dont la biosynthèse est principalement contrôlée par le glutathion (g-glutamylcysteinyl-glycine).

On sait que les PC sont synthétisés dans le cytosol en réponse à la toxicité des métaux lourds. PC-métal et PC-métalloïde sont très stables dans la nature et sont formés et séquestrés dans les compartiments vacuolaires où l'effet toxique des métaux est moins préoccupant (Ahmad, 2015; Kumar et al., 2016).

Kumar et al. (2016 ; Figure 04) montrent que la détoxification des métaux lourds à base de PC pourrait être un mécanisme de défense d'abord impliqué dans les plantes inférieures et

ensuite établi dans les plantes vasculaires supérieures pour l'élimination principalement du Cd.

Des études ont indiqué que la tolérance au cadmium du *Silène vulgaris* n'était pas due à la production de divers PC, alors que chez *S. vulgaris* la production de PC est plus élevée mais n'intervient pas dans la tolérance du Cd. rhizosphérique du solne sont pas exactement implicites (Kumar et al. ,2016).



**Figure 04:** L'absorption du métal lourd ( $\text{Cd}^{2+}$ ) par les transporteurs régulés par le zinc/fer (ZIP) pénètre dans le cytosol et stimule la synthèse des phytochélatines (PC) dérivées du glutathione par les synthèses de PC (PCS) (Kumar et al. ,2016).

#### 2.4 Méthallothionéines (MTS) :

Ce sont des protéines riches en cystéine (20 à 30 %), d'un faible poids moléculaire de 7k Da, ils sont stables à la chaleur, et ont une forte affinité pour les métaux lourds.

Les méthallo-thionéines peuvent se lier aux métaux via le groupe thiol de la cystéine et jouent un rôle majeur dans la détoxification et le métabolisme des métaux lourds. Chez les plantes, ces méthalloprotéines défendent et protègent contre l'augmentation du niveau de métaux toxique tels que le Cd et l'Hg par différents mécanismes tels que le piégeage des ERO, la séquestration, la régulation des méthallo-enzymes et l'activation des gènes de transcription. D'autre part, ils montrent des propriétés d'induction et des activités de fixation des métaux très avantageuses. Les niveaux d'homéostasie des MTS peuvent également être affectés par des éléments nutritifs comme le Cu et le Zn (Ahmad, 2015; Kumar et al. ,2016)

#### 2.5 Mycorhizes :

La rhizosphère est habitée par une grande quantité de microorganismes comme plusieurs bactéries et champignons (champignons mycorhiziens). Les bactéries colonisent les racines et les mycorhizes participent à l'augmentation de la biodisponibilité de divers éléments ainsi que l'absorption d'ions métalliques de manière significative. Le réseau d'hyphes des mycorhizes

présents dans le sol est l'un des facteurs importants pour l'élimination des métaux lourds sur une grande surface. Par exemple, l'adsorption des hyphes peut entraîner la fixation de 0,5 mg de Cd par gramme de biomasse sèche (**Kumar et al. ,2016**).

## **2.6 Les protéines de choc thermiques :**

Les HSP sont une classe de chaperons moléculaires dont la structure de la protéine normale et fonctionnent également pour protéger et réparer d'autres protéines dans des conditions de stress des plantes. L'activation de HSP comme HSP70, Hsp80 et HSP25 par des métaux lourds a été rapporté par plusieurs chercheurs. Ils sont impliqués dans la prévention de la dénaturation de diverses protéines de stress oxydatif résultant de la toxicité des métaux lourds (**Kumar et al. ,2016**).

## **3. Les effets du cadmium sur les organismes :**

Le Cd est un métal depuis longtemps reconnu comme une menace majeure pour les animaux, les plantes et également pour la santé humaine via la chaîne alimentaire, en raison de sa grande toxicité, de sa mobilité et de sa disponibilité pour tous les organismes vivants. Il représente l'une des substances les plus toxiques rejetée dans l'environnement à cause de son persistance avec une longue demi-vie qui peut aller jusqu'à 30 ans (**Chen et al. ,2019; Stephan Clemens et al. ,2013; Zhu et al. ,2018**). Comme un élément non essentiel, il est peu probable que le Cd pénètre dans le corps par un mécanisme de transport Cd-spécifique et provoque des perturbations physiologiques et moléculaires (**Lane et al. ,2015**).

### **3.1 Les effets sur la santé humaine :**

#### **3.1.1 Air et poussière :**

Les concentrations de cadmium dans l'air ambiant sont généralement faibles. Le cadmium présent dans l'air ne contribue qu'à moins de quelques pour cent du total des doses de cadmium absorbé dans l'organisme. Comme dans le cas de l'eau contaminée, l'air pollué par le cadmium peut se trouver à proximité de certaines industries métallurgiques.

#### **3.1.2 Tabagisme :**

Le tabagisme est une source importante d'exposition au cadmium. Les feuilles de tabac accumulent le cadmium d'une manière similaire aux feuilles des légumes verts. Une cigarette contient environ 1 mg de tabac sec 1g Cd (varie selon le type et la marque). A 10% l'inhalation de la teneur en cadmium et l'absorption par les poumons d'environ 50 %, fait du tabagisme une source importante d'insuffisance rénale (**Chaney et al. ,2019**).

## **4. Les effets du Cd sur les plantes :**

Le cadmium n'est pas essentiel à la croissance et au développement des plantes, mais une fois absorbé par le sol en accompagnant les nutriments essentiels, il peut produire des

changements complexes aux niveaux génétique, biochimique et physiologique qui entraînent une réduction substantielle de la croissance. L'accumulation de Cd inhibe également la croissance, le développement et la productivité des plantes par une altération de la biosynthèse des acides aminés, l'inhibition des activités enzymatiques, l'induction du stress oxydatif, l'interférence avec la nutrition minérale et les déséquilibres métaboliques (Gallego et Benavides, 2018; Zhu et al., 2018).

#### 4.1 L'effet du Cd sur la photosynthèse :

La toxicité du Cd permet de diminuer le taux net de photosynthèse. Zhu et al. 2018 rapportent que les symptômes visuels de la toxicité du Cd chez les plantes sont la chlorose et la nécrose des feuilles, le brunissement des racines et l'apoptose cellulaire.

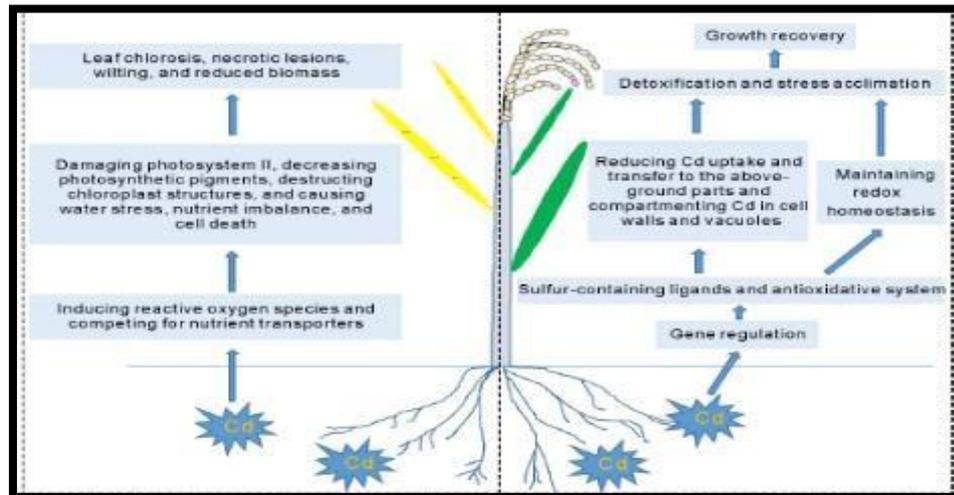
La réduction du taux de photosynthèse entraîne un apport limité d'énergie métabolique et donc une restriction de l'assimilation de l'azote. Le flux d'azote à travers les acides aminés peut donc changer en réponse au stress du Cd.

Les acides aminés affectent également la synthèse et l'activité de certains des enzymes, l'expression des gènes et l'homéostasie redox. En outre, les acides aminés riches en groupes carboxyle, amino, thiol et phénolique sont impliqués dans la synthèse de glutathion et les phytochélatines, qui sont capables de former des cations métalliques complexes diminuant sa réactivité avec d'autres molécules au niveau cellulaire, et servant de composés de chélation des métaux à longue distance. Effet du Cd sur la croissance

#### 4.2 Effet du Cd sur la croissance :

En outre, l'absorption de Cd par les plantes dépend le stade de croissance et la durée d'exposition au stress de la sécheresse. L'absorption de Cd a diminué au stade de la préfloraison et a augmenté au stade de la maturité chez l'arachide (*Arachis hypogaea*) soumise à un stress de sécheresse, mais la réponse a varié selon les cultivars étudiés (Rizwan et al., 2018). Rapportent que la réponse des végétaux au taux de photosynthèse et à la teneur en chlorophylle a varié entre les génotypes de soja soumis au stress du Cd.

Le Cd est préjudiciable à la croissance des plantes, même à de faibles concentrations, ce qui entraîne une chlorose, lésions nécrotiques, flétrissement, inhibition de l'élongation des racines, et la biomasse réduite. La toxicité du cadmium nuit à l'échange gazeux, diminue les pigments photosynthétiques, induit un stress hydrique, et provoque la destruction des structures chloroplastiques. De plus, l'excès de Cd diminue l'absorption de macro et de des micronutriments par les plantes, ce qui détériore la qualité des parties comestibles (Qin et al., 2020 ; Figure 05).



**Figure 05:** Schéma montrant les transporteurs (cases vertes) et les nutriments minéraux (cases vert clair) impliqués dans l'absorption et la translocation du Cd dans la plante (Qin et al. ,2020).

# **CHAPITRE II :** **LE STRESS OXYDATIF**

Les plantes sont constamment soumises à des variations environnementales qui vont être néfastes pour leur développement. On parle de situation de "stress" lorsque les facteurs externes sont capables d'induire un effet potentiellement nuisible sur les organismes vivants mais peut également être utilisée pour décrire l'effet nuisible lui-même. On distingue respectivement les stress de types biotiques et abiotiques tels que la salinité, les radiations UV, les métaux lourds, les changements de température extrêmes, la sécheresse, la pollution de l'air, les herbicides, la carence en nutriments.

Un des principaux effets de ces conditions de stress et la production produisent des radicaux d'oxygène réactifs excessifs qui sont très réactives et toxiques dans la cellule végétale. La production d'ERO est une conséquence inévitable de la vie en condition aérobie. Ils sont formés en continu dans les cellules. Il a été montré qu'ils causent des dommages au niveau cellulaire mais qu'ils sont également impliqués dans des voies de signalisation d'adaptation à des stress, de défense aux pathogènes et de développement.

## **1 Les espèces réactives d'oxygène (ERO) et les espèces réactives de nitrogène (ERN) :**

### **1.1 Définition :**

L'oxygène moléculaire a été introduit dans notre atmosphère il y a environ 2,7 milliards d'années par les organismes photosynthétiques évoluant dans l'O<sub>2</sub>. Les plantes utilisent l'oxygène, via le métabolisme aérobie, pour fournir l'énergie nécessaire à leur croissance et à leur développement. Dans des conditions normales, il est impliqué dans plusieurs réactions biochimiques. La réduction de l'O<sub>2</sub> en H<sub>2</sub>O fournit l'énergie qui permet l'impressionnante complexité des organismes supérieurs. Cependant, une réduction incomplète de l'O<sub>2</sub> entraîne la production des espèces réactives de l'oxygène (ERO) ont été les sous-produits inévitables du métabolisme aérobie (**Dar et al. ,2017; Gill et Tuteja, 2010; Singh et al. ,2013; Tiwari et al. ,2018**).

Dans des conditions environnementales normales, les molécules ROS sont incapables de causer des dommages car elles sont constamment balayées par toute une série de mécanismes antioxydants. Cependant, l'équilibre délicat entre la production d'ERO et leur piégeage par les antioxydants est perturbé par différents facteurs de stress biotiques et abiotiques, ces perturbations entraînent une augmentation de la production intracellulaire d'ERO (**Dar et al. ,2017; Himabinduet al. ,2016**).

Le terme ERO englobe les substances contenant un ou plusieurs atomes d'oxygène activés (**Demidchik, 2015**). Ce sont des molécules radicalaires et non radicalaires. Les radicaux libres sont toute espèce chimique qui existe indépendamment et qui contient un ou plusieurs électrons non

appariés. Certains radicaux libres n'ont pas d'atomes d'oxygène (par exemple, les métaux de transition ou les radicaux centrés sur le carbone). Les ROS et les radicaux libres favorisent tous deux le stress oxydatif par l'oxydation des composés cellulaires (Mehla et al. ,2017; Romero-Puertas et al. ,2019).

En plus d'ERO, le terme d'espèces réactif d'azote (ERN) est un autre ensemble des molécules radicales et non radicales produites dans des conditions de stress, qui conduisent à un stress nitrosatif. Le RNS est dérivé de l'acide nitrique oxyde (-NO) qui sert de composant de signalisation clé dans diverses situations de stress et certains d'entre eux sont également impliqués dans le cycle de l'azote. D'autre part, ils sont largement utilisés pour décrire la famille des oxydes d'azote (NO) molécules apparentées, telles que le peroxydinitrite (ONOO), le dénitrogène trioxyde ( $N_2O_3$ ), tétraoxyde de diazote ( $N_2O_4$ ), S-nitrosoglutathione (GSNO), le radical de dioxyde d'azote ( $NO_2$ ), le nitrosonium ( $NO^+$ ) et l'anion nitroxyde ( $NO^-$ ).

Le stress nitrosatif, un autre processus de stress causé en conséquence de l'accumulation d'ERN dans cellules végétales. Cependant, les deux familles de molécules réactives (ERO et ERN) sont impliquées dans des processus de signalisation qui se chevauchent ; en effet, l'existence d'un stress nitro-oxydant a été signalée dans certaines circonstances (Corpas, 2014; Saddhe et al. ,2019).

## 2. Les Types de ROS :

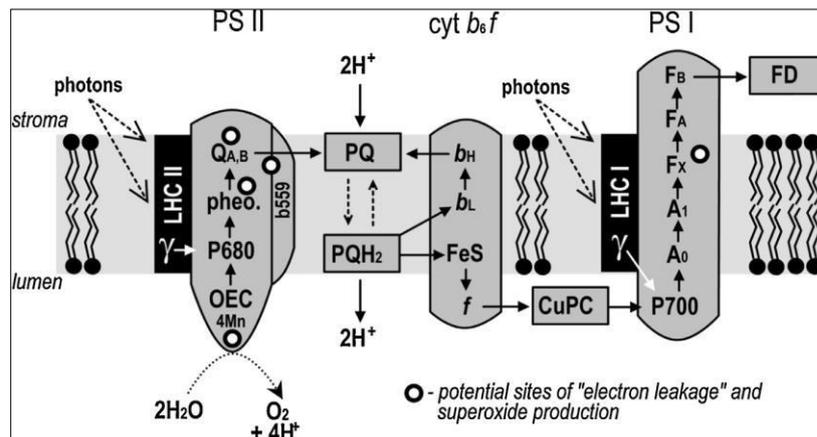
### 2.1 Le radical superoxyde :

Il est bien établi que les ROS apparaissent continuellement pendant la photosynthèse dans les chloroplastes par réduction partielle de l' $O_2$  molécules ou le transfert d'énergie vers elles (Gill et Tuteja, 2010). Le radical superoxyde est généré lors de la réduction partielle de l' $O_2$  pendant le transfert électronique le long de la chaîne de transport des électrons (CTE) des chloroplastes et d'autres compartiments de la cellule végétale (Dar et al. ,2017).

#### 2.1.2 Le site de production du radical superoxyde :

Il est produit à différentes sites dans la cellule, mais le mécanisme de sa production est presque similaire sur tous les sites (Tiwari et al. ,2018). La réduction de l' $O_2$  pour produire le radical superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ) a lieu dans la chaîne de transport des électrons non cyclique localisé dans les thylakoïdes des chloroplastes (Dar et al. ,2017). Dans la chaîne de transport des électrons des mitochondriaux, lorsque le cytochrome terminal des oxydases C oxydase réagissent avec  $O_2$ , quatre électrons sont transférés et de l' $H_2O$  est libéré (Dar et al. ,2017; Gill et Tuteja, 2010). Mais l' $O_2^{\cdot-}$  peut aussi réagir avec les composants du CTE autres que le cytochrome C pour générer de l' $O_2$ .

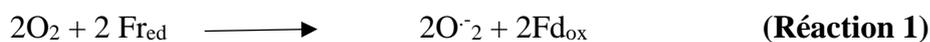
En outre, le site principal de l'O<sub>2</sub> est l'électron primaire lié à la membrane thylakoïde accepteur de PSI. Les superoxydes (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) sont produits en raison du transfert d'électrons vers l'O<sub>2</sub> au lieu de réduire le NADP pendant la réaction de transfert d'électrons en excès dans le PSI et le PSII (**Himabindu et al. ,2016**). Dans la plupart des cas, le contrôle du flux d'électrons entre les photosystèmes II (PSII) et I (PSI) régule l'état de réduction du côté accepteur du PSI (**Figure 06**). L'activation régulée du cycle C-3 et le contrôle du taux de flux d'électrons sont des facteurs importants qui déterminent l'état redox du pool de ferrédoxines (**Tiwari et al. ,2018**).



**Figure 06:** Sites hypothétiques de génération de superoxyde dans les photosystèmes I et II (**Demidchik, 2015**).

Dans les tissus végétaux, environ 1 à 2 % de la consommation d'O<sub>2</sub> entraîne la production d'O<sub>2</sub><sup>•-</sup>. Le radical superoxyde (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) peut également subir d'autres réactions pour générer des ROS plus réactifs comme <sup>•</sup>OH et éventuellement plus de <sup>1</sup>O<sub>2</sub> (**Himabindu et al., 2016**).

Des études montrent que la majorité de la réduction de l'O<sub>2</sub> in vivo se fait par l'intermédiaire de la ferrédoxine réduite (Frd), qui réduit l'oxygène moléculaire en un radical superoxyde (**Réaction 1**). Le peroxyde d'hydrogène est ensuite formé par dismutation de l'O<sub>2</sub><sup>•-</sup> (**Réaction 2**). Cette dernière se produit spontanément, mais la vitesse de la réaction est fortement augmentée par la SOD (**Réaction 3**) (**Dar et al. ,2017; Gill & Tuteja, 2010; Tiwari et al. , 2018**).



### 1.2.1.2 Les propriétés de radical superoxyde :

C'est le premier élément qui se forme dans une cellule végétale. Parce que l'O<sub>2</sub><sup>•-</sup> est moins réactif avec une courte demi-vie de 2-4 μs, il ne provoque donc pas de dommages importants par lui-même (**Dar et al., 2017; Gillet Tuteja, 2010**). Le radical super oxyde possède une distance

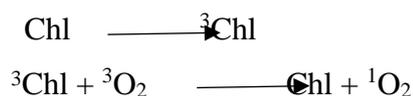
de migration environ 30 nm (Mittler, 2016).

### 1.2.2 L'oxygène singlet ( $^1\text{O}_2$ ) :

L'oxygène singlet,  $^1\text{O}_2$  est le premier état électronique excité de l' $\text{O}_2$  (Gill et Tuteja, 2010). Il est formé non pas par le transfert d'électrons vers l' $\text{O}_2$ , mais plutôt par la réaction de l'état triplet de la chlorophylle ( $^3\text{Chl}$ ) dans le système d'antenne du chloroplaste avec l' $\text{O}_2$  (Dar et al., 2017).

#### 1.2.2.1 Le site de production du l'oxygène singlet :

Les stress environnementaux qui ont un impact sur la fixation du  $\text{CO}_2$ , tels que la sécheresse et le stress salin, l'ozone et les températures élevées ou basses, réduisent la régénération du  $\text{NADP}^+$  pendant le cycle C-3, de sorte que la chaîne de transport des électrons photosynthétiques est sur-réduite, ce qui fait que les espèces d'oxygène singlet sont produits dans les chloroplastes (Tiwari et al., 2018). Un transfert d'énergie inefficace entraîne la production de chlorophylle à l'état de triplet ( $^3\text{Chl}$ ) qui réagit avec l'oxygène du triplet ( $^3\text{O}_2$ ) pour produire le  $^1\text{O}_2$  très réactif (Dar et al., 2017; Himabindu et al., 2016)



La chlorophylle les pigments associés au système de transport d'électrons (STE) sont la principale source de singlet l'oxygène ( $^1\text{O}_2$ ). Ce dernier peut également être un sous-produit de l'activité de la lipoxygénase (Tiwari et al., 2018).

La formation de l'oxygène singlet peut causer de graves dommages aux deux photosystèmes PSI et PSII (Das et Roychoudhury, 2014).

#### 1.2.2.2 Les propriétés du l'oxygène singlet :

Est un ROS inhabituel car il n'est pas lié au transfert d'électrons vers l' $\text{O}_2$  (Gill et Tuteja, 2010). Est un rare ERO (Dar et al., 2017). Comme d'autres réactif l'oxygène, le  $^1\text{O}_2$  est également très destructeur et réagit avec la plupart des molécules biologiques à des taux presque contrôlés de diffusion. Ceci est principalement dû à l'excitation de la chlorophylle (Tiwari et al., 2018). La durée de vie de  $^1\text{O}_2$  dans une cellule a été mesurée à est d'environ 3  $\mu\text{s}$  et dans ce temps, une fraction de  $^1\text{O}_2$  peut être capable de se diffuser sur des distances considérables de plusieurs centaines nanomètres (nm) (Himabindu et al., 2016).

Gill et Tuteja, 2010 ont été constatés que le  $^1\text{O}_2$  peut durer près de 4  $\mu\text{s}$  dans  $\text{H}_2\text{O}$  et 100 ms dans un solvant polaire. Il peut gérer et diffuser une centaine de nanomètres et cause des dommages à un large éventail de cibles, dont les molécules comme les protéines, les pigments, les acides nucléiques et les lipides (Das et Roychoudhury, 2014).

### 1.2.3 Le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) :

L'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est une puissante espèce d'oxygène réactif qui interagit avec les molécules organiques qui contiennent du Fe<sup>2+</sup>, ce qui entraîne la formation du radical OH, très réactif (Himabindu et al. ,2016).

#### 1.2.3.1 Le site de production (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

Il est généré par la réduction ou la protonation univalente de l'O<sub>2</sub><sup>•-</sup>. Il peut également se produire par la dismutation des radicaux superoxyde de manière non enzymatique en étant dissocié en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans des conditions de pH faible ou principalement par une réaction catalysée par la SOD :



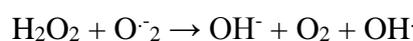
Les principales sources de génération d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans les cellules végétales sont le CTE dans le chloroplaste, les mitochondries, le réticulum endoplasmique (RE), les membranes cellulaires, β-oxydation des acides gras et la photorespiration. Dans les cellules foliaires, la catalase est exclusivement localisée dans les peroxysomes et n'a pas été trouvée dans les chloroplastes (Calero- Muñoz et al. ,2019; Dar et al. ,2017; Das et Roychoudhury, 2014; Tiwari et al. ,2018). Le peroxyde d'hydrogène dans les chloroplastes est éliminé par une réaction de peroxydase utilisant le photo- réducteur produit dans la thylacoïde comme donneur d'électrons (Tiwari et al. , 2018).

#### 1.2.3.2 Les propriétés du peroxyde d'hydrogène :

Le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, HOOH) est l'ERO le plus stable avec des fonctions physiologiques essentielles. Le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est un acide faible sans électrons non appariés ("non radicalaire"), et sa molécule est stable par rapport au superoxyde, l'hydroxyle et l'oxygène singulet. Néanmoins, la durée de vie de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans les tissus vivants est extrêmement longue (1 ms) par rapport aux autres ERO (Demidchik, 2015 ; Gill and Tuteja, 2010). Par conséquent, il peut se diffuser sur de plus longues distances dans les cellules et même traverser les membranes cellulaires des plantes à travers les aquaporines et induire des dommages oxydatifs.

### 1.2.4 Le radical hydroxyle (OH<sup>•</sup>) :

Il est généré à un pH neutre par la réaction de Fenton entre H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et O<sup>-2</sup> catalysée par les métaux de transition comme le Fe (Fe<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup>) :



Il a la capacité d'endommager différents composants cellulaires par peroxydation des lipides (LPO), par endommagement des protéines et par destruction des membranes. Comme il n'existe pas de système enzymatique pour éliminer ce radical toxique, l'accumulation excessive de

$\text{OH}^\cdot$  provoque la mort cellulaire (Dar et al. ,2017; Das et Roychoudhury, 2014; Gill et Tuteja, 2010). Comme les cellules n'ont pas de mécanisme enzymatique à éliminer  $\text{OH}^\cdot$ , son excès de production peut finalement conduire à la mort cellulaire (Tiwari et al. ,2018).

#### 1.2.4.1 Les propriétés du ( $\text{OH}^\cdot$ ) :

Parmi les membres de sa famille, le radical hydroxyle ( $\text{OH}^\cdot$ ) est le ROS le plus réactif et le plus toxique connu (Das et Roychoudhury, 2014; Gill et Tuteja ,2010). Il ne possède qu'un seul électron non apparié, et peut donc facilement se lier à l'oxygène à l'état de triplet (Tiwari et al. ,2018 ; Tableau 02).

**Tableau 02:** Production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) dans différentes conditions de stress et leurs effets sur les plantes (Das et Roychoudhury, 2014; Tiwari et al. ,2018)

ROS	T <sub>1/2</sub>	Distance de migration	Source	Effet néfaste	Système de défense
Superoxyde ( $\text{O}_2^\cdot$ )	1 - 4 $\mu\text{s}$	30nm	Membranes Mitochondrie Chloroplaste	- Réduire la fluorescence de la chlorophylle, la conductance stomatale chez <i>Ailanthus altissima</i> - Réagit avec des composés contenant une double liaison tels que les protéines (Fe-S)	Augmentation de l'activité du SOD, du CAT et de la teneur en Proline pour la détoxification
Peroxide d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )	1ms	1 $\mu\text{m}$	Membranes Mitochondrie Chloroplaste peroxisome	-Perte de viabilité des cellules racinaires chez <i>Cucumis sativus</i> - Oxydation des protéines and formation $\text{OH}^\cdot$ via $\text{O}_2^\cdot$	CAT, POXs et les flavonoides
Oxygène singulet ( $^1\text{O}_2$ )	1-4 $\mu\text{s}$	30nm	Membranes Mitochondrie Chloroplaste	-Oxydation des protéines et ADN	Caroténoïdes and $\alpha$ - Tocophérol
Radical hydroxyle ( $\text{OH}^\cdot$ )	1 $\mu\text{s}$	1nm	Membranes Mitochondrie Chloroplaste	-Extrêmement réactif avec tous les biomolécules	Flavonoïdes et proline

## 2. Les stress oxydants :

Les stress environnementaux comme la sécheresse, la salinité, la présence de métaux lourds, la chaleur, le froid, la toxicité des ions, ainsi que les stress biotiques (l'infection fongique et dommages causés par les insectes) induisent la production d'ERO générant alors un stress oxydant à l'origine de changements dans le fonctionnement cellulaire et tissulaire.

Le terme « stress oxydatif » désigne un état physiologique où la perte d'électrons (oxydation) dépasse le gain d'électrons (réduction) induisant une fuite électronique avec formation des ERO et/ou ERN (**Nemmiche ,2017**). De plus, le stress oxydatif est donc associé à un déséquilibre redox sévère entre la production d'ERO et le balayage entraîne une oxydation (**Raja et al., 2017**). Lorsque la quantité d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) générée dépasse les capacités antioxydants de l'organisme, la toxicité des ERO s'exprime par de nombreux aspects, et en particulier par la perturbation de nombreux processus physiologiques (**Junglee, 2016**).

### 2.1 La production de ROS dans différentes organelles :

Les ROS sont générés dans les cellules sous conditions normales et stressées à plusieurs endroits sous-cellulaires comme les chloroplastes, les mitochondries, les réticulum endoplasmique, les membranes plasmiques, les peroxysomes, les apoplastes et les parois cellulaires (**Dar et al ., 2017**). Tandis que la mitochondrie est le principal producteur d'ERO dans des conditions d'obscurité (**Das et Roychoudhury, 2014**).

D'autre part, les ERO peuvent être produits soit directement par ERO active des métaux par les réactions de Haber-Weiss/Fenton, ou indirectement, par la stimulation des NADPH oxydases (NOX), ou par l'inhibition d'enzymes par le déplacement de cations essentiels (**Berni et al. , 2019**).

#### 2.1.1 Mitochondries :

Les mitochondries, qui sont considérées comme le "centre énergétique" de la cellule, sont considérées comme les principaux sites de production d'ERO telles que  $H_2O_2$  et  $O_2^{\cdot-}$  lors de la photorespiration au niveau de la chaîne mitochondriale de transport des électrons (**Biniak , 2017**). **Tiwari et al. ,2018** ont été démontré que les ERO générés dans les mitochondries et l'oxydation des protéines sont des facteurs contribuant au syndrome de "stress oxydatif" chez les plantes. Il a également été prouvé que dans l'obscurité ou dans les tissus non verts des plantes, les mitochondries sont une source majeure d'ERO. La chaîne de transport d'électrons mitochondriale

(CTE) transporte des électrons avec une quantité suffisante d'énergie libre disponible qui conduit à la réduction directe de l' $O_2$  en eau et au cours de ce processus, 0,1 à 2 % de cette

énergie est partiellement réduite à mi-parcours de la production d'ERO (Raja et al. ,2017).

Plusieurs sites du CTE mitochondrial, comme la NADH déshydrogénase (complexe I) et la région ubiquinone-cytochrome (complexe III), sont impliqués dans la production d'ERO. De plus, Diverses enzymes présentes dans la matrice mitochondriale sont également à l'origine de la production d'ERO. Certaines enzymes telles que l'aconitase génèrent directement des ERO, tandis que d'autres comme la 1-galactono- $\gamma$ -lactone déshydrogénase (GAL) produisent indirectement des ERO en faisant passer des électrons au CTE (Dar et al. ,2017).

Bien que l' $O_2^{\cdot-}$  soit le principal ROS formé à l'intérieur des mitochondries, il est converti en  $H_2O_2$  par Mn-SOD relativement stable. L' $H_2O_2$  peut ensuite être converti en un radical hydroxyle ( $OH^{\cdot}$ ) extrêmement actif par la réaction de Fenton. Ces radicaux  $OH^{\cdot}$  sont capables de migrer des mitochondries par pénétration dans la membrane. Tout stress peut modifier la physiologie des plantes, et les mitochondries peuvent jouer un rôle majeur dans le contrôle de la production de ERO par les systèmes de dissipation d'énergie (Choudhary et al. ,2017; Dar et al. ,2017).

### 2.1.2 Chloroplastes :

Dans les plantes et les algues supérieures, la photosynthèse a lieu dans les chloroplastes, qui contiennent un système de membrane thylacoïde très organisé fournit toutes les propriétés structurales pour une récolte optimale de la lumière (Gill et Tuteja, 2010).

Ce système de thylacoïdes abrite l'appareil photosynthétique efficace de capture de la lumière. Le PSI et le PSII, qui forment le cœur des systèmes de récolte de la lumière dans les thylakoïdes sont les principales sources de production de ERO (Dar et al. ,2017). Dans des conditions normales, pendant la photosynthèse, l'oxygène généré dans les chloroplastes accepte les électrons, ces électrons passent des photosystèmes excités au  $NADP^+$ , le réduisant au NADPH, qui réduit ensuite l'accepteur d'électrons ultime, le  $CO_2$ , dans le cycle de Calvin-Benson.

Dans des conditions de stress, le transport des électrons passe par la ferrédoxine pour aboutir à l' $O_2$ , et ce flux d'électrons détourné conduit à l' $O_2^{\cdot-}$  formation par la réaction de Mehler. La formation de  $H_2O_2$  au niveau de la membrane stromale est le résultat de la dismutation de l' $O_2$  par Cu/Zn-SOD. De plus, l' $H_2O_2$  peut être transformé en  $OH^{\cdot}$  en fonction de la disponibilité du  $Fe^{2+}$  dans les centres Fe-S à l'aide de la réaction de Fenton. D'autre part, si l'état triplet de la chlorophylle ( $^3Chl$ ) est crée, il peut être quenche par les caroténoïdes voisins ou réagir avec l' $^3O_2$  pour donner l'oxygène singulet ( $^1O_2$ ) qui est un ROS. Le chloroplaste est la source primaire de  $^1O_2$  dans les cellules végétales (Biniek, 2017; Choudhury et al. ,2017; Raja et al. ,2017).

### 2.1.3 Peroxysomes :

Les peroxysomes sont des microorganismes sphériques liés à une seule membrane et sont les principaux sites de production intracellulaire de  $H_2O_2$  en raison de leur métabolisme oxydatif intégral (**Das et Roychoudhury, 2014**). Deux sites connus pour produire de l' $O_2$  dans les peroxysomes sont l'oxydation xanthine et l'hypoxanthine à l'acide urique via la xanthine oxydase dans la matrice et la seconde, la membrane peroxysome, où l' $O_2$  est libérée par la chaîne de transport d'électrons du peroxysome composée d'une flavoprotéine NADH et du cytochrome b (**Raja et al. ,2017**).

Il existe une autre voie par laquelle l' $H_2O_2$  peut être produit pendant la photosynthèse. Pendant l'assimilation du carbone, le ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase utilise le  $CO_2$  pour carboxyler le ribulose 1,5-bisphosphate. Cependant, la ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase peut également utiliser de l' $O_2$  pour oxygéner le ribulose 1,5-bisphosphate. L'oxygénation donne deux glycolates, qui sont ensuite transportés des chloroplastes vers les peroxysomes. L'oxydation des glycolates est donc catalysée par la glycolate oxydase, ce qui donne de l' $H_2O_2$  ce qui en fait le premier produit (**Tiwari et al. ,2018**). (**Himabindu et al. ,2016**) mentionnés que l'oxydation des acides gras  $\beta$ - est une autre source de formation de  $H_2O_2$  dans les peroxysomes par l'action de l'acyl-CoA oxydase.

### 2.1.4 Apoplast :

Les ERO tels que la production de  $H_2O_2$  dans les plantes se produisent également de manière extracellulaire dans les apoplastes (Dar et al., 2017). Parmi les nombreux mécanismes possibles suggérés pour la production de ERO dans l'apoplaste, les NADPH oxydases étant une protéine intrinsèque de la membrane plasmique, possèdent un domaine catalytique associé à la membrane plasmique sont une source bien étudiée de production de ERO (**Raja et al. ,2017**). Dans des conditions environnementales défavorables, Les signaux combinés à l'acide abscissique

(ABA) font de l'apoplaste un le lieu de production de  $H_2O_2$ . In addition, les amino-oxydases de l'apoplaste peuvent contribuer aux réactions de défense des plantes contre le stress biotique, principalement par la production accrue de  $H_2O_2$ , soit spontanément, soit par la dismutation du superoxyde en  $H_2O_2$  (**Dar et al. , 2017**). Parmi les autres enzymes apoplastiques participe à la formation des ROS, les enzymes liées à la paroi cellulaire oxydases, peroxydases (POX), et polyamines.

Les amino-oxydases catalysent la désamination oxydative des polyamines (c'est-à-dire la putrescine, la spermine et la spermidine) en utilisant la FAD comme cofacteur (**Himabindu et al. , 2016**).

### 2.1.5 Membrane plasmique :

La membrane plasmique qui entoure toute la cellule végétale joue un rôle important dans l'interaction avec l'environnement en constante évolution et fournit les informations nécessaires à la mise en œuvre de la survie continue de la cellule. Les NADPH-dépendants-oxydases qui sont localisés dans la membrane plasmique sont présents en différents homologues dans différentes conditions de stress, en raison de leur expression génétique.

In addition, les oxydases dépendantes du NADPH localisées dans la membrane plasmique catalysent le transfert d'électrons du NADPH cytoplasmique vers l'O<sub>2</sub> pour former de l'O<sub>2</sub><sup>-</sup> qui soit se dissocie directement en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, soit est catalysé par l'activité SOD. Enfin, le NADPH oxydase joue un rôle important dans la défense des plantes contre les pathogènes infections et les conditions de stress abiotiques (Dar et al. ,2017; Das et Roychoudhury, 2014).

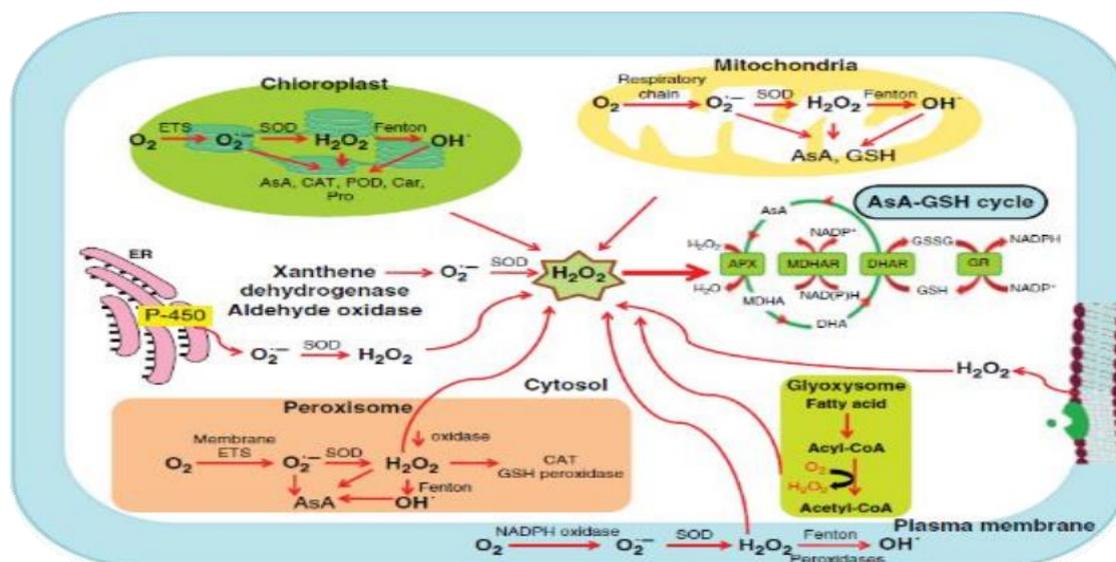
### 2.1.6 Paroi cellulaire :

L'enzyme peroxydase présente dans la paroi cellulaire est associée à la production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. En plus de leur activité antioxydante, les peroxydases peuvent également présenter une activité oxydase avec le transfert d'électrons des réducteurs (par exemple, NADH) vers l'oxygène moléculaire. Les peroxydases, qui sont caractéristiques de ce mécanisme d'action, sont généralement localisées dans les parois cellulaires à l'état lié avec leurs polymères par des liaisons ioniques ou covalentes. On considère qu'au "burst oxydatif", la peroxydase des parois cellulaires peut générer un grand nombre de radicaux anioniques superoxyde et, par conséquent, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

La sensibilité élevée de la génération du radical anion superoxyde dans les racines de blé aux inhibiteurs de la peroxydase est considéré par les auteurs comme la preuve de la participation des peroxydases indiquées à la génération d'ERO. D'autre part, les ERO et les peroxydases jouent un rôle crucial dans le déclenchement de la polymérisation des composés phénoliques et des glycoprotéines, qui rend les parois cellulaires rigides (Gautam et al. , 2017; Raja et al., 2017).

### 2.1.7 Réticulum endoplasmique :

Autres sources importantes de production de ERO dans les usines qui ont les réactions de détoxification catalysées par les le cytochrome P<sub>450</sub> dans le cytoplasme et le réticulum endoplasmique (Gill et Tuteja, 2010). Après l'interaction du substrat organique RH avec la Cyt P<sub>450</sub>, la réduction se produit par une flavoprotéine pour former un intermédiaire de radicaux libres (Cyt P<sub>450</sub> R<sup>-</sup>). Cet intermédiaire réagit spontanément avec l'oxygène triplet (<sup>3</sup>O<sub>2</sub>) pour former un complexe oxygéné (Cyt P<sub>450</sub>-ROO<sup>-</sup>) qui peut être réduit par la Cyt-b ou occasionnellement décomposé en Cyt P<sub>450</sub>-Rh générant de l'O<sub>2</sub><sup>-</sup> (Dar et al. , 2017 ; Figure 07).



**Figure 07:** Représentation schématique des principaux sites impliqués dans la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) et des différents mécanismes de balayage dans les cellules végétales.

Les stress abiotiques et biotiques provoquent la production d'espèces réactives toxiques de l'oxygène (ROS) telles que le radical superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ), l'oxygène singulet ( $^1O_2$ ), le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et le radical hydroxyle ( $OH^{\cdot}$ ) (Jajic et al., 2015) rapporté par Tiwari et al., (2018).

## 2.2 Les conséquences des ERO sur les macromoléculaires :

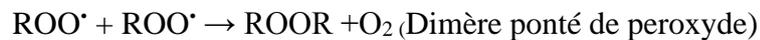
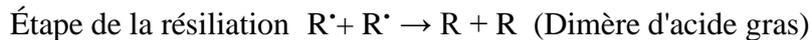
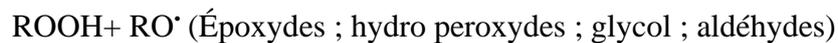
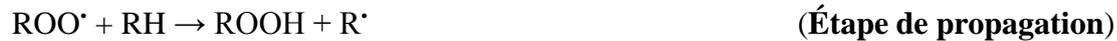
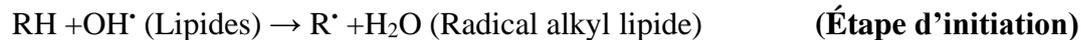
Le stress oxydatif entraîne la perte complète de certaines activités physiologiques. En concentration élevée, les ERO sont connus pour causer des dommages aux biomolécules constitutives des cellules telles que les lipides, les protéines et l'ADN. Les dommages causés à ces molécules conduisent inévitablement à la mort cellulaire.

### 2.2.1 Peroxydation des lipides (LPO) :

Les lipides forment la majeure partie de la membrane plasmique. Une accumulation accrue de ROS entraîne une peroxydation des lipides (LPO) pendant le stress. L'oxydation des lipides (également connue sous le nom de peroxydation des lipides) est largement considérée comme une "marque de fabrique" du stress oxydatif. (AGPI) (AGPI) de la membrane plasmique, comme les acides linoléique sont très sensibles à l'oxydation par l'oxygène singulet et les radicaux hydroxyles (Banerjee et Roychoudhury, 2017; Demidchik, 2015).

La peroxydation des lipides comprend généralement trois étapes séquentielles : l'initiation, la propagation et la terminaison. L'initiation de la peroxydation des lipides (étape d'initiation) est déclenchée par l'abstraction de l'atome d'hydrogène de la molécule de lipide. Cela peut être dû à des radicaux hydroxyles, alcoxydes, peroxydes, ainsi qu'à en tant que peroxydinitrites, mais pas en

tant que peroxydes d'hydrogène ou superoxydes (**Demidchik, 2015 ; Gill et Tuteja, 2010**) :



L'étape limitant le taux de l'ensemble du processus est l'initiation. Elle stimule l'O<sub>2</sub> pour produire des radicaux superoxydes et hydroxyle. Ces ERO réagissent ensuite avec les groupes méthylène des AGPI, produisant des diènes conjugués, des radicaux peroxyde lipidiques et des hydro peroxydes (**Banerjee et Roychoudhury, 2017**).

De plus, **Dar et al. (2017)** déclarent que cette peroxydation accrue de l'AGPI diminue la fluidité de la membrane, augmente sa fuite vers des matériaux qui, autrement, ne peuvent la traverser que par des canaux spécifiques et entraîne des dommages secondaires aux protéines de la membrane.

### 2.2.2 Oxydation des protéines :

Divers types d'altérations directes ou indirectes peuvent avoir lieu dans une protéine de cellule végétale dans des conditions de stress. Les protéines sont également des cibles majeures des ERO, notamment l'HO• et l'•O<sub>2</sub>. Leur oxydation est associée au stress oxydant, au vieillissement et à certaines maladies (**Dar et al. ,2017; Gautam et al. ,2017**).

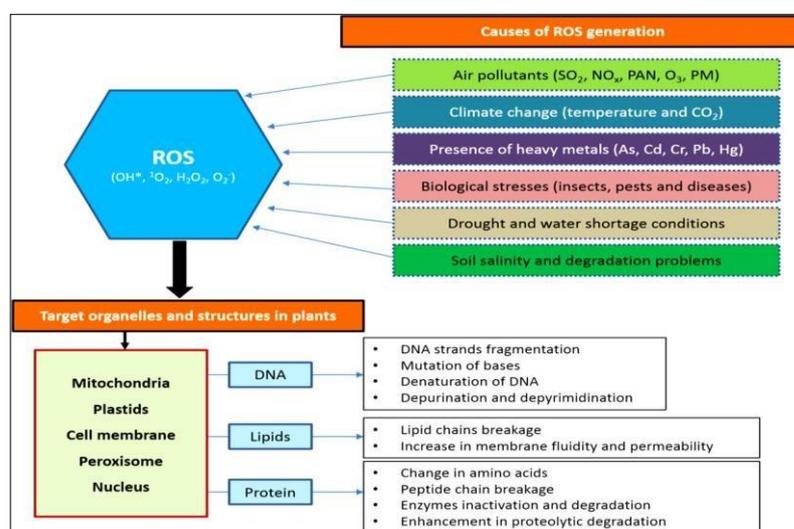
Les protéines subissent des différents types de modifications qui peuvent être directes ou indirectes. Au cours de modification post-traductionnelle directe, l'activité de la protéine varie en raison de différentes modifications chimiques telles que la nitrosylation, la carboxylation, la formation de liaisons disulfure et la glutathionylation. Une modification indirecte des protéines peut se produire à la suite d'une interaction avec les produits de la LPO.

La concentration en ROS, lorsqu'elle dépasse sa valeur seuil, entraîne une modification spécifique au site des acides aminés comme Arg, Lys, Pro, Thr et Trp, et une plus grande sensibilité à la dégradation protéolytique (**Daset Roychoudhury, 2014 ; Tiwari et al. ,2018**).

**Tiwari et al. ,(2018)** montrent que l'oxygène singulet et le radical hydroxyle attaquent

inévitamment les résidus modifiés tels que Cys et Met contenant des groupes thiol et soufre. Le radical superoxyde inactive de manière irréversible les enzymes contenant des centres Fe-S. Enfin, La carbonylation des protéines aurait été plus élevée dans les mitochondries que dans d'autres organites sous-cellulaires comme les chloroplastes et les peroxysomes, ce qui suggère que les mitochondries sont plus vulnérables aux dommages causés par une attaque de ROS (Dar et al. , 2017).

Le traitement au  $Cd_2^+$  a augmenté le niveau de carbonylation 4 à 5,6 nmol/mg des protéines dans les plants de pois. Les protéines peuvent être endommagées dans des conditions d'oxydation par leur les réactions avec les produits LPO, tels que le 4-hydroxy-2-nonéanal (HNE) (Gill et Tuteja ,2010 ; Figure 08).



**Figure 08:** Les différentes causes de génération des ERO et leurs conséquences sur les macromolécules (Gupta et al. ,2019).

### 2.2.3 Modification d'ADN :

L'ADN est le matériel génétique de la cellule et tout dommage à l'ADN peut entraîner des changements dans les protéines codées, ce qui peut conduire à des dysfonctionnements ou à une inactivation complète des protéines codées (Singh et al. ,2017) .Les ERO peuvent endommager l'ADN en oxydant son résidu de sucre désoxyribose, en modifiant la séquence des bases nucléotidiques, la dimérisation des bases purine et pyrimidine, des délétions de base, des cassures de brin, des liaisons ADN-protéines et des modifications de base telles que l'alkylation et l'oxydation (Choudhary et al. ,2017; Dar et al., 2017; Gautam et al. ,2017).

Les radicaux hydroxyles sont un des principaux facteurs de dégradation des acides polynucléiques, réagissant avec eux par addition aux doubles liaisons des bases nucléotidiques et par abstraction de  $H^+$  de chacune des liaisons C-H du 2 désoxyribose et du groupe méthyle de la thymine (Demidchik, 2015). L'abstraction par ROS de l'atome H du C-4 du sucre désoxyribose due à l'attaque par ROS entraîne la formation d'un radical désoxyribose qui réagit encore pour produire des cassures simple brin dans l'ADN. L'oxydation des bases génère divers produits

endommagés, notamment la 8-hydroxyquinine, l'hydroxyméthylurée, la déshydro-20 désoxyguanosine, le thymine glycol et le cycle thymine et adénine ouvert (Dar et al. ,2017).

Les liaisons transversales ne sont pas facilement réparables et peuvent être mortelles pour la cellule végétale, si elles ne sont pas réparées à temps avant le début de processus cellulaires critiques comme la réplication ou la transcription (Das et Roychoudhury, 2014).

Dans l'addition, Les ROS peuvent également cibler directement les molécules d'ARN. Selon les cellules de mammifères, l'ARN semble être plus vulnérable au stress oxydatif que l'ADN, plus précisément à la formation de 8-hydroxyguanosine (8-oxo-G) (ou 8-hydroxyguanosine [8-oxo-dG] pour l'ADN). L'oxydation de l'ARN peut provoquer des erreurs de traduction par la formation de protéines malcodées, car la 8-oxoG peut s'associer aux résidus C et A, ou par le blocage des ribosomes, ce qui entraîne des protéines tronquées en raison d'une terminaison prématurée de la traduction (Ruyskensvelde ,2018).

### **2.3 Le rôle des espèces réactives d'oxygène (ERO) dans la signalisation :**

En général, les ERO jouent un double rôle, c'est-à-dire un rôle positif et un rôle négatif, en fonction de leur concentration. Le terme biologie « redox » désigne les ERO agissant comme des molécules de signalisation pour réguler et maintenir les fonctions physiologiques normales qui participent au développement et à la croissance de la plante ainsi qu'être impliqués dans les mécanismes de défense principalement par l'interaction avec les résidus de cystéine (Cys) des protéines. In addition, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> interagit, par exemple, avec les anions thiolates de Cys (Cys-S) au pH physiologique et les oxyde en leur forme sulfénique (Cys-SOH), provoquant des changements structurels au sein de la protéine cible et altérant sa fonction. Les niveaux de ERO sont maintenus via la production d'antioxydants dans différentes organelles (Mittler ,2016; Singh et al. ,2017)

### **2.4 Les mécanismes antioxydants de défenses :**

Le stress oxydatif survient lorsqu'il y a un grave déséquilibre dans un compartiment cellulaire entre la production d'ERO et la défense antioxydant, ce qui entraîne des dommages cellulaires. Pour gérer ce problème, les plantes se sont adaptées aux états physiologiques, biochimiques et moléculaires prometteurs pour éviter les effets létaux des ERO et pour les présenter comme des molécules de signalisation (Raja et al. ,2017; Singh et al. ,2017).

#### **2.4.1 Les systèmes antioxydants enzymatiques**

Les plantes possèdent un mécanisme de défense unique et incroyable pour la détoxification des radicaux libres. Ces mécanismes comprennent essentiellement des enzymes localisées dans les différents compartiments sous-cellulaires et comprenant le Superoxyde Dismutase (AGPI) Catalase (CAT), Ascorbate Peroxidase (APX), Mono déhydroascorbate réductase (MDHAR), Déhydroascorbate réductase (DHAR), Glutathion Réductase (GR) et Guaiacol Peroxidase

(GPX) (Das et Roychoudhury, 2014; Mehla et al., 2017).

#### 2.4.1.1 Systèmes enzymatiques :

##### 2.4.1.1.1 Superoxyde dismutase (SOD) (EC.1.15.1.1) :

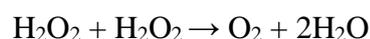
Est une métalloenzyme que l'on trouve dans tous les organismes aérobies, elle est considérée comme une première ligne de défense et est une enzyme clé dans la défense de la plante contre les dommages oxydatifs (Singh et al., 2018 ; Banerjee and Roychoudhury, 2018). Elle catalyse la dismutation d'un superoxyde en O<sub>2</sub> et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ce qui élimine la possibilité de formation de radical hydroxyle par la réaction de Haber-Weiss. Elle catalyse selon la réaction



Les SOD sont classées selon leurs cofacteurs métalliques en trois isoenzymes, qui sont localisés dans différents compartiments cellulaires : Mn-SOD (dans les mitochondries), Fe-SOD (dans les chloroplastes) et Cu/Zn-SOD (dans le cytoplasme, les peroxysomes et les chloroplastes) (Banerjee & Roychoudhury, 2017; Gill & Tuteja, 2010). Toutes les isoformes de la SOD sont codées par le noyau et ciblées sur leurs compartiments sous-cellulaires respectifs par une séquence de ciblage amino-terminale (Abouzari et Fakheri, 2015).

##### 2.4.1.1.2 Catalase (CAT) (E.C.1.11.1.6)

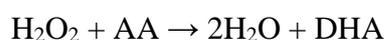
A été la première enzyme antioxydante à être découverte et caractérisée. C'est une tétramérique enzyme contenant un hème. Elle possède une grande affinité pour H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mais une moindre spécificité pour les peroxydes organiques (R-O-O-R). Il a un taux de renouvellement très élevé (6 × 10<sup>6</sup> molécules de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à H<sub>2</sub>O et O<sub>2</sub> min<sup>-1</sup>) et exceptionnel parmi les enzymes antioxydantes car il peut fonctionner sans équivalent de réduction cellulaire. Elle catalyse la conversion de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> selon la réaction :



Les peroxysomes sont les points chauds de la production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en raison de β-oxydation des acides gras, de la photorespiration, du catabolisme des purines et du stress oxydatif (Dar et al., 2017; Das et Roychoudhury, 2014; Junglee, 2016).

##### 2.4.1.1.3 Ascorbate peroxydase (E.C. 1.1.11.1)

Est un composant intégral du cycle ascorbate-glutathion (AsA-GSH). Elle appartient à la famille des peroxydases de classe I, qui contient l'hème comme groupe prothétique. L'APX utilise l'acide ascorbique (AA) comme agent réducteur pour réduire le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en eau et en déshydroascorbate (DHA) de la manière suivante :

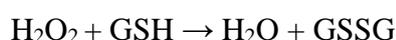


La famille APX comprend au moins cinq isoformes différentes y compris les formes de membrane thylacoïde (tAPX) et glyoxisomique (gmAPX), ainsi que la forme soluble dans le

stromal du chloroplaste (sAPX), forme cytosolique (cAPX). On estime que l'APX joue le rôle le plus essentiel dans en piégeant les ROS et en protégeant les cellules des plantes supérieures, des algues et d'autres organismes (Abouzari et Fakheri, 2015; Gill et Tuteja, 2010; Tiwari et al. , 2018).

#### 2.4.1.1.4 Guaiacol peroxydase (GPX) :

Le GPX (E.C.1.11.1.7) est une enzyme hémique composée de 40-50 kDa de monomères, Le GPX préfère les composés aromatiques comme le gaïacol et le pyragallol comme donneurs d'électrons. Comme le GPX est actif au niveau intracellulaire (cytosol, vacuole), dans la paroi cellulaire et extra-cellulaire au niveau cellulaire, elle est considérée comme l'enzyme clé dans l'élimination des H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> selon la réaction suivante :



En plus, elle joue un rôle vital dans la biosynthèse de la lignine. L'activité du GPX est différente selon les plantes et avec des conditions de stress variables (Das et Roychoudhury, 2014; Mehla et al. ,2017; Tiwari et al. ,2018).

#### 2.4.1.1.5 Monodéshydroascorbate réductase (MDHAR) :

Le MDHAR (EC.1.6.5.4) est une enzyme flavine-adénine-dinucléotide (FAD). Cette enzyme appartient à la famille des oxydoréductases, est un produit d'oxydation primaire de l'ascorbate qui est réduit en ascorbate par le MDHAR en utilisant le NADPH comme donneur d'électrons spécifique :



Elle est principalement présente dans les chloroplastes, les mitochondries, les peroxyosomes et le cytosol des cellules végétales. La MDHA produite après la réaction APX a une durée de vie très courte ; si elle n'est pas réduite rapidement, elle sera transformée en ASA et DHA. C'est la seule enzyme connue qui utilise MDA (radical organique) comme substrat et réduit également les radicaux phénoxyles produits après H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et la réaction à la peroxydase du raifort. Enfin, le MDHAR dans les chloroplastes à deux rôles principaux ; le premier est la génération d'AsA à partir du MDHA, et le second est la réduction de l'O<sub>2</sub> en O<sub>2</sub>.-en l'absence de MDHA (Choudhary et al. ,2017; Gill et Tuteja, 2010; Himabindu et al. ,2016).

#### 2.4.1.1.6 Dehydroascorbate Reductase (DHAR)

La DHAR (E.C. 1.8.5.1) joue un rôle important dans la régulation et la régénération de l'ASH (Mehla et al. ,2017). Elle réduit le déshydro-ascorbate (DHA) en AA en utilisant le glutathion réduit (GSH) comme donneur d'électrons :

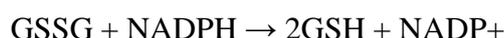


Ainsi, avec le MDHAR, il reconstitue également le pool cellulaire d'AA et régule

notamment la taille du pool d'AA dans le symplast et l'apoplast. Cela permet de maintenir l'homéostasie redox dans la cellule. Les isozymes DHAR se trouvent en abondance dans les graines, les racines, et les cellules vertes et étiolées (**Banerjee et Roychoudhury, 2017; Das et Roychoudhury, 2014**).

#### **2.4.1.1.7 Glutathion réductase (GR) :**

GR (E.C.1.6.4.2) est une flavoprotéine oxydoréductase qui utilise le NADPH comme donneur d'électrons pour réduire le GSSG en GSH. Glutathion réduit (GSH) est ensuite utilisé pour régénérer l'AA à partir de MDHA et de DHA, et il se transforme en son forme oxydée (GSSG) :



Généralement, la GR est présent dans les chloroplastes des tissus foliaires. Cependant, on en trouve également de petites quantités dans le cytosol, les mitochondries, les glyoxysomes et les peroxysomes. Comme l'APX, le GR est l'un des principaux dans le cycle ascorbate-glutathion, par lequel le recyclage efficace de glutathion est assuré par le GR et joue un rôle clé dans la protection des chloroplastes pendant le stress oxydatif en maintenant un taux élevé de glutathion réduit/oxydé (GSH/GSSG) dans une cellule (**Dar et al., 2017 ; Tiwari et al., 2018**).

#### **2.4.1.1.8 Glutathion S-transférases :**

GST (EC 2.5.1.18) est un groupe important et diversifié d'enzymes qui catalysent la conjugaison de xénobiotiques électrophiles des substrats avec le glutathion tripeptidique (GSH ; g-glu-cys-gly). Les GST des plantes sont connus pour leur fonction de détoxication des composés endogènes et xénobiotiques (herbicides) par l'ajout nucléophile de GSH. D'autre part, ils participent dans différents mécanismes tels que l'homéostasie hormonale, séquestration vacuolaire de l'anthocyanine, métabolisme de tyrosine, détoxification de l'hydroxypéroxyde, régulation de l'apoptose et dans les réponses des plantes aux stress biotiques et abiotiques (**Gill et Tuteja, 2010; Talukdar, 2017**).

### **2.4.2 Le système antioxydants non enzymatique :**

Les antioxydants non enzymatiques peuvent également être divisés en antioxydants nutritifs et en antioxydants métaboliques. Les antioxydants métaboliques sont produits par l'organisme comme la bilirubine, les protéines chélatrices de métaux et l'acide urique. Les antioxydants nutritifs sont fournis par l'alimentation ou par des suppléments comme les vitamines E et C et les oligo-éléments (**Mehla et al., 2017**).

#### **2.4.2.1 Acide ascorbique :**

L'acide ascorbique (ascorbate/AsA) est une molécule omniprésente dans les eucaryotes. Est un antioxydant de faible poids moléculaire, puissant et hydrosoluble, qui joue un rôle clé dans

la défense contre le stress oxydatif causé par un niveau élevé de ROS, potentiellement en raison de sa capacité à donner des électrons dans un certain nombre de réactions enzymatiques et non enzymatiques. Cependant, l'AsA n'est pas synthétisé par les humains et, par conséquent, il doit être incorporé dans le régime alimentaire sous forme de "vitamine C". Dans les plantes, qui sont la principale source de l'AsA, il est synthétisé dans les mitochondries par la voie de Smirnoff-Wheeler catalysée par la L-galactono- $\gamma$ -lactone déshydrogénase joue un rôle important dans de nombreux aspects du contrôle, non seulement de l'activité cellulaire, mais aussi de l'activité physique. Aussi, il participe à l'état redox et l'activité antioxydante des cellules végétales, mais aussi de la division et de l'expansion, le développement et la croissance des plantes en tant que cofacteur enzymatique (**Yoshimura et Ishikawa, 2018**).

L'acide ascorbique est connu pour piéger les ROS formés à la fois les processus photosynthétiques et respiratoires. L'acide ascorbique éteint l'O<sub>2</sub> -- et 1O<sub>2</sub>, élimine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et réduit les radicaux thiol par la conversion du monodéhydroascorbate (MDHA) ou du déshydroascorbate (DHA) en ascorbate par l'action du GR dans une réaction dépendante du NADPH. Il est également nécessaire à la régénération de  $\alpha$ -tocophérol (**Dar et al. ,2017**) du radical tocophéroxyle (**Yadav et Atri, 2017**).

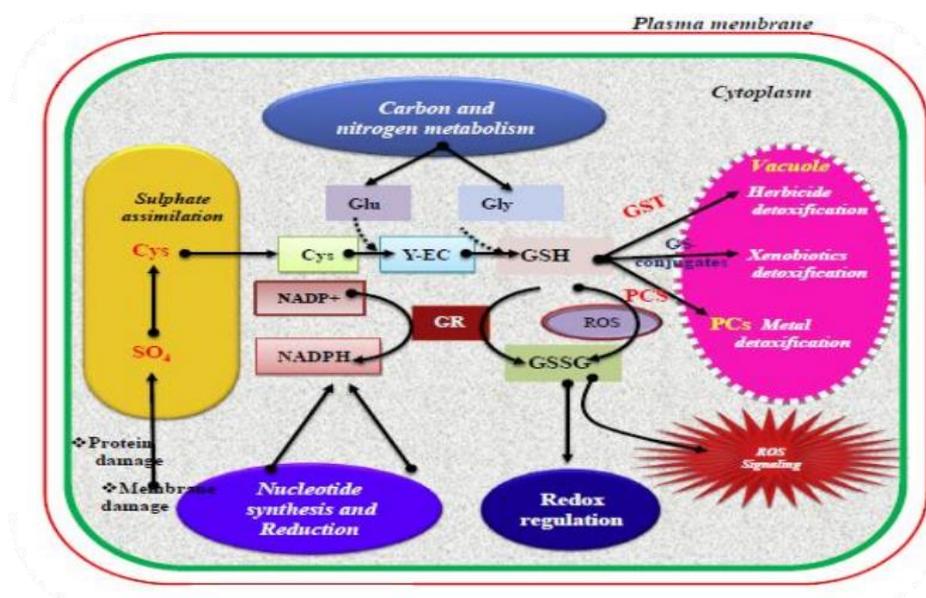
#### 2.4.2.2 Glutathion (GSH) :

Un tripeptide thiol de faible poids moléculaire ( $\gamma$ -glutamyl-cysteinyl- glycine) et l'un des les métabolites des plantes qui sont considérés comme les plus importants dans la défense intracellulaire contre les dommages oxydatifs induits par les ROS. Il est largement distribué dans tous les compartiments cellulaires sous forme réduite (GSH) comme le cytosol, le réticulum endoplasmique, vacuole, les mitochondries, les chloroplastes, les peroxysomes ainsi que dans l'apoplaste. Le GSH joue un rôle central dans plusieurs les processus, y compris la régulation du transport des sulfates, la transduction des signaux, conjugaison des métabolites, détoxification des xénobiotiques et l'expression de gènes sensibles au stress (**Gill et Tuteja, 2010 ; Dar et al. ,2017**). Un résidu central de cystéine à caractère nucléophile est la source de son pouvoir réducteur.

Le GSH capte l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, <sup>1</sup>O<sub>2</sub>, OH<sup>\*</sup> , et O<sub>2</sub><sup>•-</sup> et protège les différentes biomolécules en formant des produits d'addition (glutathiolés) ou en les réduisant en la présence de ROS ou de radicaux libres organiques et la production de GSSG comme sous-produit. Le GSH joue également un rôle essentiel dans la régénération des AA pour donner le GSSG.

Le GSSG ainsi généré est reconverti en GSH, soit par synthèse de novo ou enzymatique par GR. Ce permet finalement de reconstituer le pool de GSH cellulaire. Le GSH aide également dans la formation des phytochélatines via la phytochélatine synthase, qui aide à chélater les ions

métalliques et donc élimine une autre source potentielle de ROS formation dans les plantes. Par conséquent, l'équilibre délicat entre le GSH et le GSSG est nécessaire pour maintenir l'état redox de la cellule (Das et Roychoudhury, 2014 ; Figure 09).



**Figure 09.** Le rôle potentiel du glutathion et des phytochelatines (synthèse, renouvellement redox, métabolisme, signalisation) dans la tolérance au stress abiotique chez les plantes (Noctor et al. ,2012; Zagorchev et al. ,2013) rapporté par (Singh et al. ,2015).

### 2.4.2.3 Les caroténoïdes :

Les caroténoïdes sont des pigments solubles dans les lipides et que l'on trouve généralement dans les plantes et les microorganismes. On trouve plus de 600 caroténoïdes dans les plantes (Mehla et al. ,2017).

Les caroténoïdes peuvent contenir de l'oxygène (xanthophylles) ou non ( $\beta$ -carotène) :

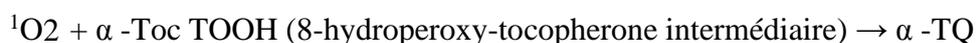
**1.  $\beta$ -Carotène :** le  $\beta$ -Carotène est l'extincteur efficace de l'oxygène singulet, formé dans le complexed'antenne centrale du photosystème II (PSII) et le centre de réaction du PSII.

**2. Les xanthophylles :** peuvent éteindre très efficacement l'oxygène singulet formé dans le complexe de récolte de la lumière II (LHCII).  $\alpha$ -Xanthophylle (lutéine) et  $\beta$ -xanthophylle (zéaxanthine et néoxanthine) éteignent respectivement la chlorophylle triplet et  $^1O_2$ . La violaxanthine se transforme en zéaxanthine par élimination des groupes époxy en présence de violaxanthine de l'époxydase. Cette conversion est réversible, et la conversion de la zéaxanthine en violaxanthine a lieu en présence de zéaxanthine époxydase (Yadav et Atri, 2017).

### 2.4.2.4 Tocophérols :

Les tocophérols sont des antioxydants lipophiles et un composant important des membranes biologiques. Ils protègent la stabilité de la membrane en éteignant ou en piégeant les

ERO, bien qu'ils aient certaines fonctions non antioxydants. Dans les plantes, les tocophérols sont principalement localisés dans la membrane thylakoïde des chloroplastes.  $\alpha$ -Tocophérol est un antioxydant briseur de chaîne, c'est-à-dire qu'il possède la capacité de réparer directement les radicaux oxydants, inhibant ainsi l'étape de propagation de la chaîne lors de l'auto-oxydation des lipides. L'oxydation irréversible des  $\alpha$ -tocophérols par l' $O_2$  est la suivante :



Le cycle chromanol de  $\alpha$ -tocophérol devrait être situé près du bord de la membrane ; par conséquent,  $\alpha$ -tocophérol est efficace pour éteindre ces  $O_2$ . Enfin, elle peut réparer directement les radicaux oxydants et empêcher l'étape de propagation de la chaîne pendant l'auto-oxydation des lipides (Jeena et al. ,2017 ;Yadav et Atri, 2017).

#### 2.4.2.5 Proline :

La proline, essentiellement agit comme un osmoprotecteur, un stabilisateur de protéines, un chélateur de métaux, un inhibiteur de peroxydation des lipides, de la mort cellulaire programmée, un stabilisateur de protéines et un piègeur efficace de  $OH\cdot$  et  $^1O_2$ . La pro s'accumule dans les conditions de stress tels la sécheresse, la salinité et aux métaux, en raison d'une synthèse accrue, soit d'une dégradation réduite (Mehla et al. ,2017 ; Dar et al. , 2017). Chez les plantes, la proline est synthétisée soit par la voie du glutamate, soit par celle de l'ornithine. La voie de l'ornithine se fait par désamination de l'ornithine qui est ensuite transaminée en P5C par l'ornithine-delta-aminotransférase (OAT).

#### 2.4.2.6 Les composés phénoliques :

Les phénols sont largement dispersés et constituent les métabolites secondaires les plus abondants du règne végétal. Les flavonoïdes, les acides phénoliques et les tannins sont des substances phénoliques courantes présentes dans les plantes. Les substances phénoliques végétales sont principalement des dérivés de l'acide cinnamique et de l'acide benzoïque (Choudhury et al. ,2017).

#### 2.4.2.7 Flavonoïdes :

Chez les plantes, les flavonoïdes sont les métabolites secondaires les plus actifs et certains ont montré une activité antioxydante plus efficace que l'ascorbate et les tocophérols (Romarin, 2017). Les flavonoïdes des plantes ont été détectés dans les feuilles, les organes floraux et les pollens. Sur la base de variations structurelles (Figure 10), ils ont été classés en flavonols, isoflavones, flavones et anthocyanines. Les flavonoïdes sont a suggéré d'avoir de nombreuses fonctions comme la pigmentation des fleurs, les fruits et les graines, protection contre les rayons UV ; défense contre les phytopathogènes (microorganismes pathogènes, insectes, animaux) ; rôle

dans la fertilité des plantes et la germination du pollen et ; agissant comme molécules du signal dans les interactions plantes-microbes. Enfin, Ces molécules pigmentées jouent leur rôle antioxydant en empêchant les dommages causés par les ERO à l'appareil photosynthétique (Banerjee et Roychoudhury ,2017; Choudhury et al. ,2017 ; Figure 11)

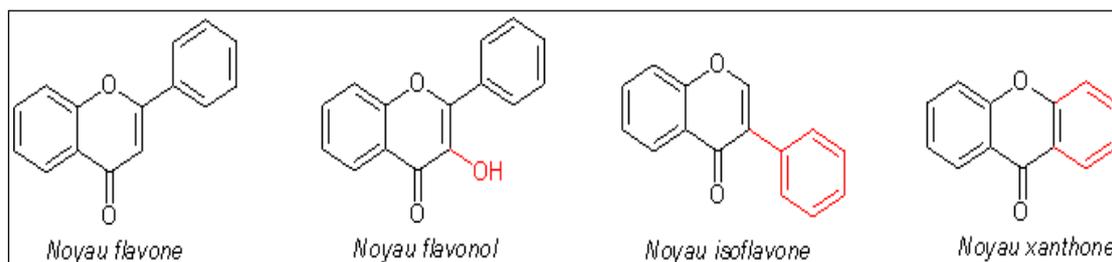


Figure 10. Les différentes structures des flavonoïdes (Biniek, 2017)

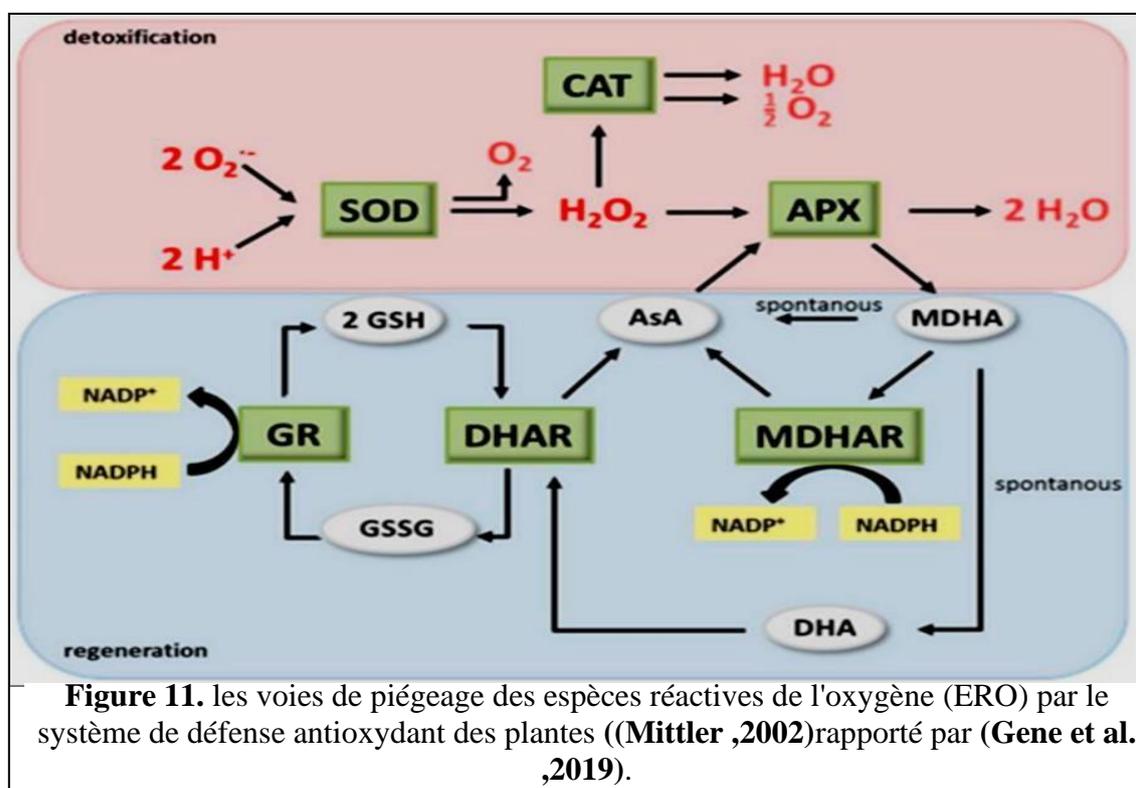


Figure 11. les voies de piégeage des espèces réactives de l'oxygène (ERO) par le système de défense antioxydant des plantes ((Mittler ,2002)rapporté par (Gene et al. ,2019).

CHAPITRE III :  
LE SOJA

## 1 Le soja (*Glycine max* (L.) Merr):

### 1.1 Origine et diffusion :

Le Soja (*Glycine max* (L.) Mer.) est une plante subtropicale originaire de l'Asie et plus précisément des régions Nord et Centre de la Chine. Le soja est un aliment de base dans les pays asiatiques depuis au moins 5000 ans (**Badole et Bodhankar ,2013**). La majorité des espèces de *Glycine* ne se trouvent qu'en Australie, et le soja est originaire d'Asie de l'Est. Quelques espèces s'étendent de l'Australie à l'Asie de l'Est (par exemple, *G. tomentella* et *G. tabacina*).

La culture étant largement concentrée en Amérique latine et en Amérique du Nord (**Azooz et Ahmad, 2015**). Le soja a connu une importante dissémination dans le reste du monde. Son introduction en Europe eut lieu au 18<sup>ème</sup> siècle par les missionnaires, autour des années 1740 et au début du 19<sup>ème</sup> siècle en Afrique (**Nignan et al. ,2017**). Le soja (*Glycine max*), désigné sous le nom de "haricot doré", a établi son potentiel en tant que culture oléagineuse vitale sur le plan industriel et viable en Inde (**Srinivasarao et al. ,2013**).

### 1.2 Classification et description botanique :

La classification phylogénétique *Angiosperm phylogeny Group III* (APG III) du Soja cultivé, *Glycine max*, indique qu'il appartient à la classe des Magnoliopsida, à l'ordre des Fabales, à la famille des Fabaceae, la sous famille des Faboideae, la tribu des Phaseoleae, et la sous tribu des *Glyciminae*. Il comprend une quarantaine d'espèces avec près de 4000 variétés (**Nignan, 2017 ; Badole et Bodhankar ,2013**).

#### ✓ Classification scientifique :

**Royaume :** Plantae

**Phylum :** Magnoliophyta

**Classe** Magnoliopsida

**Ordre :** Fabales

**La famille** Fabaceae

**Sous-famille :** Faboideae

**Genre :** *Glycine*

**Espèces :** *G. max*

**Nom botanique :** *Glycine max* (L.) Mer.

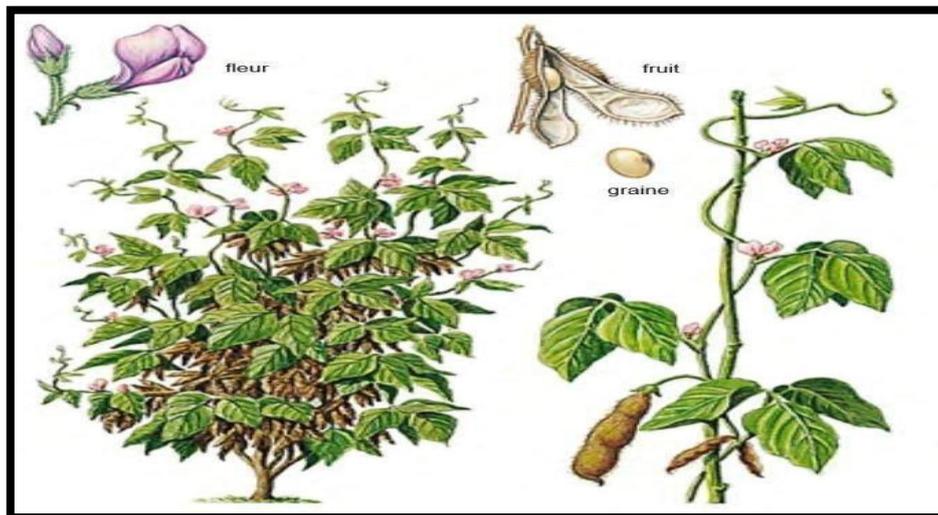
**Synonymes :** *G. gracilis*, *G. soja*

- ✓ **La plante :** Elle ne doit pas dépasser 20 cm de large ou 2 m de haut. Le site Les gousses, les tiges et les feuilles sont recouvertes de fins poils bruns ou gris (**Figure12**).
- ✓ **Feuilles :** Trifoliolée, ayant 3-4 folioles par feuille. Les folioles ont une longueur de 6 à 15 cm. et de 2 à 7 cm de large. Les feuilles tombent avant que les graines ne soient mures.
- ✓ **Fleurs :** Grandes, discrètes, auto fertiles, les fleurs sont portées à l'aisselle de la feuille et

sont blancs, roses ou violets.

- ✓ **Fruits** : Gousse poilue qui pousse en grappes de 3 à 5 ; chaque gousse mesure 3 à 8 cm de long et contient généralement 2 à 4 graines (rarement plus).
- ✓ **Graines** : 5-11 mm de diamètre. Le soja se présente sous différentes formes et dans de nombreuses coques ou graines les couleurs du pelage, notamment le noir, le marron, le bleu, le jaune, le vert et les taches. La coque du haricot mature est dur, résistant à l'eau et protège le cotylédon et l'hypocotyle (ou "germe") de dommages.

Si le tégument de la graine est fissuré, la graine ne germera pas. La cicatrice, visible sur le tégument de la graine, est appelé le hile (les couleurs comprennent le noir, le brun, le chamois, le gris et le jaune), et à une extrémité du hile se trouve le micropyle, ou petite ouverture dans le tégument de la graine, qui permet l'absorption d'eau pour la germination. (**Badole et Bodhankar, 2013**).



**Figure 12.** Le soja, *Glycine max*, légumineuse herbacée (**Archives Larousse**).

#### ✓ **La consommation du Soja**

Le soja est une légumineuse qui est cultivée depuis des milliers d'années en Asie du Nord et du Sud-est et qui est actuellement cultivée dans de nombreuses régions du monde, notamment aux États-Unis, en Amérique du Sud et en Europe. Étant donné que le soja a une teneur élevée en protéines et en huile (les graines sont composées d'environ 40 % de protéines et 20 % d'acides gras) et qu'il contient également de nombreux composants bioactifs, la consommation mondiale de soja devrait continuer à augmenter en raison de son utilisation dans l'alimentation animale, l'huile végétale et le biodiesel, ainsi que dans l'alimentation humaine.

Les nombreux avantages pour la santé des aliments à base de soja comprennent la prévention des maladies cardiovasculaires, la protection contre le cancer du sein, la réduction du cholestérol

sanguin et le soulagement des symptômes de la ménopause (**Hashiguchi et Komatsu, 2017**).

En plus de sa consommation pour l'alimentation, l'huile de soja est considérée comme une future source de carburant, et des efforts sont faits pour augmenter la production de diesel à partir de soja (**Feng et al. ,2019**).

### **1.3 Développement et culture du soja :**

#### **1.3.1 Maturation des semences :**

Le développement des semences végétales comprend une série de changements morphologiques, physiologiques et biochimiques et peut être divisé en trois phases principales : l'embryogenèse, y compris la division et l'expansion cellulaire, la maturation des semences et la dessiccation. La phase de maturation est caractérisée par une augmentation significative de la taille des graines, la formation d'organites de stockage, y compris les vacuoles de stockage des protéines (PSV) et les corps oléagineux, et l'accumulation de réserves de glucides, qui sont reçus de la plante mère et sont également directement synthétisés par les graines en développement (**Hashiguchi et Komatsu, 2017**).

#### **1.3.2 Germination :**

La germination des graines est une phase critique du cycle de reproduction des plantes et affecte la productivité du soja. La germination commence par l'absorption rapide d'eau et le lancement de processus métaboliques, suivis par l'émergence de la racine en phase III et l'établissement du plant. La reprise du métabolisme s'effectue selon un processus presque inverse à celui du remplissage de la graine. Pour établir rapidement des semis qui peuvent tolérer les fluctuations des conditions environnementales, le changement physiologique de la dormance des graines à la germination est contrôlé à la fois au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel.

#### **1.3.3 Symbiose**

Les plantes légumineuses, y compris le soja, forment des relations symbiotiques avec les bactéries rhizobiennes, dans lesquelles la plante fournit des formes réduites de carbone comme source d'énergie pour les bactéries, et les bactéries fournissent à la plante des composés azotés générés par la fixation d'azote. La symbiose entre le soja et la rhizobie implique des interactions complexes à plusieurs niveaux et permet aux plantes de pousser dans un sol dépourvu d'azote. Au cours des premières étapes de l'interaction, la racine exsude des flavonoïdes, une classe de produits naturels des plantes, qui attirent et stimulent les rhizobies à libérer des molécules de signalisation appelées nodulation (**Hashiguchi et Komatsu, 2017**).

### 1.3.4 Réponses au stress

Parmi les divers produits abiotiques les stress, la sécheresse, la chaleur et la salinité sont les principales contraintes qui affectent la croissance des espèces cultivées comme le soja ; ces stress peuvent provoquer des pénuries d'eau dans les cellules. La sécheresse et le stress salin ont des effets similaires les effets sur les cellules végétales, comme l'altération de la régulation osmotique des cellules, et la plupart des métabolites augmentent à ces tensions. En revanche, la température élevée fait que les niveaux de nombreux métabolites diminuent à des degrés divers (**Feng et al. ,2019**). De plus, ces tensions provoquent souvent des frisottis, des jaunissements et le flétrissement des feuilles des plantes, et dans les cas graves, ils peuvent provoquer un manque d'eau et la mort.

(**Basal et al. ,2020**) déclarent que dans des conditions de sécheresse, les pigments de chlorophylle et le système de transport des électrons photosynthétiques pourraient être endommagés, entraînant la production d'espèces réactives d'oxygène (ERO) et provoquant une diffusion rapide à travers la membrane cellulaire et, finalement, la mort des cellules. Les propriétés des plantes sont fortement influencées par le génotype ou la combinaison génétique des plantes de plantes. Dans différentes conditions, y compris le stress, les plantes se comportent selon la séquence de leurs protéines. Chaque génotype de plante peut se comporter plus efficacement sous conditions spécifiques.

La présence, les actions et les interactions entre les microbes du sol peuvent également déterminer la disponibilité et donc l'absorption des nutriments par la plante hôte. Dans le cas des champignons mycorhiziens et les rhizobiums, l'association tripartite entre la plante hôte et les microbes peuvent augmenter l'absorption de N et P par la plante hôte. De telles associations peuvent (**Miransari, 2016**).

### 1.4 Qualités alimentaires

Le soja est un constituant majeur dans l'alimentation humaine et animale. Le soja (*Glycinemax* (L.) Merrill) est la légumineuse à graines la plus cultivée, fournissant une source de protéines peu coûteuse, et est également la culture d'oléagineux la plus répandue dans le monde (**Basal et al., 2020**).

Le soja est principalement semé dans le cadre d'un programme d'irrigation pluviale. Le soja est non seulement riche en matières grasses, en hydrates de carbone, en vitamine C et en minéraux, mais il a également fait l'objet d'une attention particulière en raison de ses propriétés anticancéreuses. En plus de sa consommation pour l'alimentation, l'huile de soja est considérée comme une future source de carburant, et des efforts sont faits pour augmenter la production de diesel à partir de *soja* (**Feng et al. ,2019**).

### 1.4.1 Protéines

Dans le monde entier, le *soja* (*Glycine max* (L.) Mer.) est une culture importante qui contient des niveaux élevés de source d'huile et de protéines comestibles pour l'homme et le bétail (Feng et al. ,2019) et joue un rôle clé dans la contribution à la fertilité des sols par la fixation de N<sub>2</sub>, ce qui a des implications économiques importantes (Pérez Chaca et al. ,2014). Les principales protéines de stockage dans le soja sont  $\beta$ -conglycinin et glycinin, qui représentent respectivement 25% et 40% de la protéine totale de la graine. L'accumulation de ces protéines de stockage a été bien étudiée et est influencée par la synthèse temporelle et tissulaire spécifique de leurs sous-unités.

La protéine homéobox GmSBH1, qui a été identifiée parmi les protéines du soja régulées par le stress de la température et de l'humidité, peut améliorer la tolérance des graines lorsqu'elle est surexprimée chez *Arabidopsis* (Hashiguchi et Komatsu, 2017). La protéine de soja est disponible sous de multiples formes pour être utilisée dans les aliments transformés. Les produits commerciaux de protéines de soja sont disponibles sous forme de farine de soja, de concentré de protéines de soja et d'isolat de protéines de soja, et la teneur en protéines de chaque produit dépend de la méthode de production. La farine de soja est plus riche en protéines et plus faible en glucides que la farine de blé (Whent, 2013).

In addition, la protéine de soja est constituée d'une proportion équilibrée des neuf acides aminés essentiels dont le corps humain a besoin. Ainsi, elle est considérée comme une protéine saine car elle est la seule source végétale qui contient des protéines complètes. D'autre part, les flocons de *soja* peuvent être obtenus après que la graine ait subi l'extraction de l'huile. Les flocons sont ensuite transformés en isolats de protéines et en repas pour la consommation humaine. Ce sont les raisons pour lesquelles les graines de soja sont privilégiées pour la fabrication de boissons fonctionnelles. Néanmoins, il existe quelques sujets de controverse concernant le *soja* vis-à-vis de la santé humaine.

La substance présente dans le *soja* a été étudiée et il a été conclu qu'elle avait des effets négatifs sur l'homme. Cependant, le soja est considéré comme l'un des produits agricoles les plus économiques et les plus précieux, qui présente plus d'avantages que d'inconvénients (Naresh et al. ,2019).

### 1.4.2 Lipides

Les lipides sont les principaux substrats dans la production de différents aldéhydes et cétones qui conduisent à alcools différents. Les différents lipides conduisent à différents composés volatils. (Fischer et al. ,2019). La teneur en lipides du soja est d'environ 20 %. Les acides gras les plus importants du soja sont l'acide linoléique, l'acide oléique et l'acide

linoléinique.

### **1.5 L'intérêt économique**

Le soja est une légumineuse alimentaire économiquement importante car ses grains et ses précieux sous-produits alimentaires sont riches en protéines (Armendariz et al. ,2019) et la cinquième culture mondiale en termes de production (Yusefi-tanha et al. ,2020). Le soja fournit environ 64% de l'offre mondiale de farines d'oléagineux et est la principale source d'huile, représentant environ 28% de la production totale. En effet, la majeure partie de la production mondiale de soja est transformée par trituration, opération qui permet l'extraction d'huile de soja et la production de tourteaux, utilisées massivement dans l'alimentation animale (Nignan et al. , 2017).

### **1.6 Les modifications structurelles anatomiques des organes et tissus végétaux par les métaux et les metalloïdes dans l'environnement :**

La biochimie, la génomique, la métabolique, et anatomie de la plante fournit un grand ensemble de données qui ouvrent la voie à une compréhension globale dans la croissance, le développement, la défense et la productivité des plantes sous le stress des métaux lourds et des éléments toxiques.

La compréhension des adaptations anatomiques de divers organes et tissus végétaux aux métaux lourds et aux metalloïdes pourrait grandement contribuer à une approche intégrale et moderne pour l'étude des plantes dans des conditions environnementales changeantes (Yadav et al. ,2020).

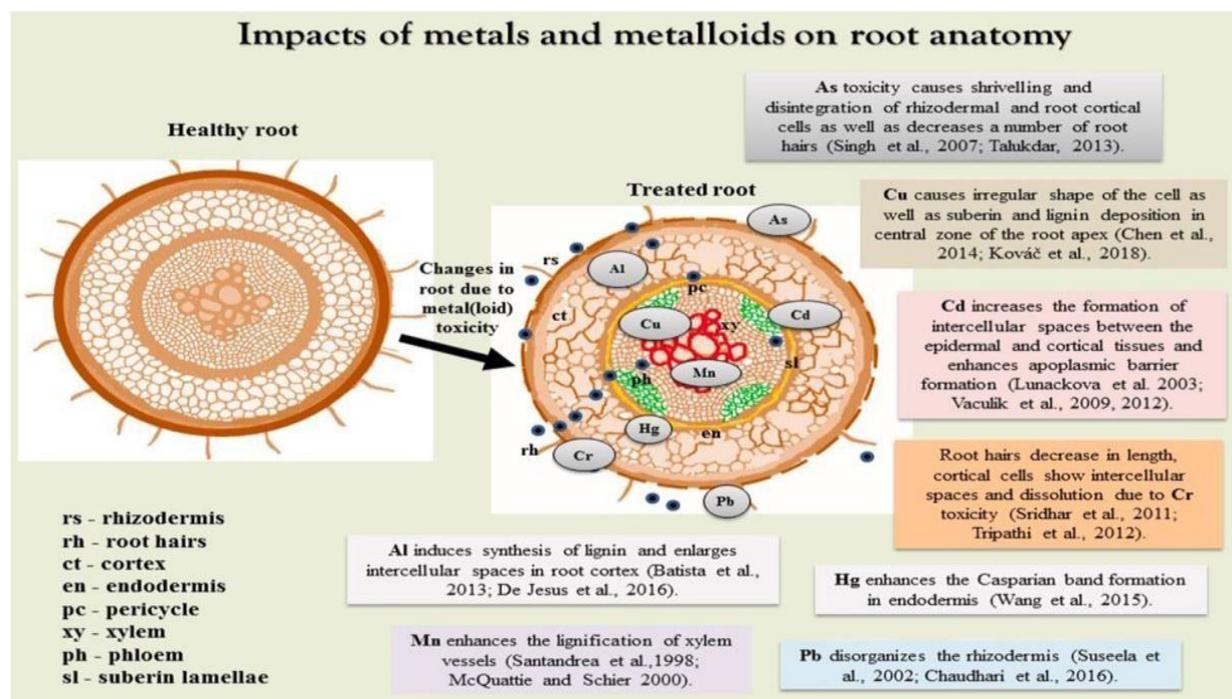
Lorsque leur concentration dépasse un certain niveau, des effets négatifs apparaissent sous forme de réponses morphologiques, anatomiques et biochimiques, parmi lesquelles les changements anatomiques montrent les effets les plus pertinents du stress des métaux lourds sur les plantes (Hogan et al. ,2010).

De plus, les réponses des plantes aux métaux au niveau anatomique sont nécessaires pour améliorer la gestion des cultures et les techniques de sélection car elle révèle comment les plantes réagissent aux conditions de stress et altèrent leurs tissus, ce qui est auparavant modifié en atteignant le pouvoir et la tendance de la différenciation et de l'organisation cellulaires à exercer des fonctions physiologiques différentes. Elle affecte également l'accès des plantes aux ressources de l'environnement via la mise en forme des tissus végétaux (Yadav et al. ,2020).

### 1.6.1 Altérations anatomiques des tissus radiculaires dues aux métaux et aux metalloïdes :

Les racines sont les premiers organes en contact avec les métaux et les metalloïdes du sol (**Figure.13**), on peut donc prévoir plusieurs altérations anatomiques des tissus racinaires. De manière générale, l'inhibition de la croissance et de l'architecture des racines a été observée chez plusieurs espèces de plantes cultivées en présence d'une forte concentration de métaux et de metalloïdes. Par exemple, Une concentration élevée d'As ( $2 \text{ mg L}^{-1}$ ) a entraîné une absence totale de racines latérales avec seulement un petit nombre de primordiales de racines latérales retenues dans le cortex (**Pita- Barbosa et al. ,2015**). Le nombre de racines latérales a diminué, et elles ont été localisées près de la partie basale de la racine avec un assombrissement des racines dans les plantes de soja traitées au As (*Glycine max*) (**Armendariz et al. ,2016**).

En revanche, le nombre de racines latérales a augmenté et elles ont été déplacées plus près de l'extrémité de la racine dans les racines de *Raphanus sativus* traitées au Cu (**Kovacic et al. ,2018**). Une étude similaire sur les racines de maïs (*Zea mays*) suggère qu'une concentration plus élevée ( $300 \mu\text{M}$ ) de Al a fortement réduit la biomasse des racines en raison de la formation plus faible de racines latérales et de la division cellulaire réduite (**Batista et al. ,2013**).



**Figure 13.** Schéma des réactions les plus courantes des tissus racinaires à un excès de métaux et de metalloïdes dans l'environnement. (**Vaishali Yadav ,2021**).

### 1.6.1.1 Effet des métaux (loid) sur le méristème apical de la racine :

Le méristème apical, protégé par le chapeau de la racine, soit le site crucial qui détermine la croissance, l'anatomie, la morphologie et la fonctionnalité futures de la racine (par exemple, **Shishkova et al.2008 ; Rots, 2011**), il s'agit de la première partie de la racine en contact direct avec des conditions de sol toxiques, et donc potentiellement susceptible d'être exposée à des métaux (loid). En outre, l'extrémité des racines est un site principal d'absorption des métaux (loid) et leur éventuelle toxicité. On constate qu'une concentration plus élevée de Cd avait un impact sur la taille et le dessin du méristème racinaire chez *Arabidopsis*, et affectait également négativement l'organisation du centre de quiescence (QC) de la racine, qui était à peine détectable. Cependant, ce n'est pas seulement l'activité mitotique limitée qui est responsable de la réduction globale de la croissance des racines.

Par exemple, chez le riz, un retard de croissance des racines était lié à une diminution du taux d'élongation, plutôt qu'à une diminution de la division cellulaire dans la RAM de (**Macedo et al. ,2009**). Même l'activité méristématique et le potentiel de division de la zone méristématique des plants d'*Arabidopsis* traités au Cd étaient comparables à ceux du témoin, la taille réduite des méristèmes ayant entraîné une diminution de la croissance des racines (**Yuan et Huang, 2016**).

Une diminution de la longueur du méristème racinaire et une augmentation de la largeur des racines ont également été observées dans les racines exposées à Al. La structure endommagée de la racine, le réarrangement cellulaire et l'agrandissement des cellules **Ronzan et al. (2018)** ont constaté que l'As et le Cd favorisaient la formation de racines latérales dont l'organisation du méristème était endommagée et altérée. En outre, de nombreux primordia de racines latérales ne pouvaient pas se développer à partir de la racine pivot en raison de divisions cellulaires anormales dans la RAM combinées à une formation irrégulière du centre de quiescence. Par conséquent, il est important de garder à l'esprit que les premiers effets primaires des métaux (loids) sur la RAM (par exemple, suppression de l'activité méristématique, allongement altéré, organisation modifiée du QC, etc.

La formation et la croissance des racines latérales peuvent influencer de manière significative la morphologie globale du système racinaire et conduire à diverses modifications observées ultérieurement au niveau anatomique dans les tissus plus anciens.

### 1.6.1.2 Effet des métaux et des metalloïdes sur le rhizoderme :

Le rhizoderme est un tissu clé dans l'absorption de l'eau et des nutriments. En tant que première couche cellulaire entourant les tissus racinaires et faisant face à l'environnement du

sol, l'effet de la contamination du sol sur le rhizoderme est immédiat. La désintégration du rhizoderme après un stress au Cd a également été observée dans les racines de radis (*Raphanus sativus*) (Vitoria et al., 2003).

Une autre caractéristique importante du tissu rhizodermal est le processus de formation des poils de la racine qui a été observé comme étant influencé par divers métaux et metalloïdes, également. En outre, la densité et le schéma de formation des poils de la racine sont des caractéristiques importants de la racine qui participe à l'absorption des métaux lourds par d'autres tissus végétaux par exemple (Kohanova et al., 2018). La désintégration du rhizoderme dans les plants de radis traités au Cd est liée à l'augmentation du nombre de poils racinaires (Vitoria et al., 2003). Un effet similaire, une augmentation de la densité des poils racinaires a été observée dans les racines de *Medicago truncatula* traitées au Cd (Rahoui et al., 2017) ou de *Scirpus lacustris* exposées au Cr (Suseela et al., 2002). De plus, la formation de poils racinaires a été induite beaucoup plus près de l'extrémité de la racine dans les racines d'orge (*Hordeum vulgare*) traitées au Cd (Durcekova et al., 2007). Une augmentation de la densité des poils racinaires a également été observée dans les racines de *Sorghum bicolor* traitées au Cd, mais la densité des poils racinaires a diminué seulement à 0,5 mM de Cd, à des concentrations plus élevées de Cd (2 et 3 mM de Cd). Les auteurs ont expliqué que l'augmentation de la densité à 0,5 mM était liée à une diminution de l'élongation des cellules. Des concentrations plus élevées ont entraîné l'arrêt de l'élongation cellulaire et de la croissance des poils de racine (Kur-iakose et Prasad, 2008).

Le cadmium et l'As dans l'expérience avec *l'Arabi-dopsis* ont augmenté la densité des poils de la racine probablement en changeant le destin des cellules rhizodermiques non poilues en cellules poilues (Bahmani et al., 2016). L'augmentation de la densité des poils des racines du riz (*Oryza sativa*) exposé au Cd. Tripathi et al. (2012) ont expliquée une stratégie adaptative pour maintenir l'absorption et l'assimilation des minéraux et les processus physiologiques normaux. Dans une fougère, *Pteris vittata*, l'Arsénique a modifié le développement des poils de racine en termes d'augmentation de la densité et de la longueur des poils de racine, et ils ont été localisés plus près de l'extrémité de la racine. De plus, un développement normal a été modifié lorsque des poils de racine, généralement localisés au-dessus du point de jonction de deux cellules corticales, ont été développés de manière ectopique à côté d'une seule cellule corticale.

De plus, à l'extrémité de la racine, des cellules ressemblant à des bordures se sont formées

plus tard et ont été libérées sous la forme d'une couche cellulaire continue. Des dommages relativement faibles de l'As sur l'anatomie de *P. vittata* peut s'expliquer par la tolérance de cette espèce de fougère à l'As et sa capacité à hyperaccumuler cet élément toxique (**Forino et al., 2012**). Moins courante, elle semble diminuer l'abondance des poils de racine après un stress métallique. .

En fonction de la concentration en As, la diminution de l'abondance des poils de racine ou leur absence totale est une réaction du faisceau de *mung* (*Phaseolus aureus*) (**Singh et al., 2007**). L'absence de poils de racine due à la toxicité de l'As a également été observée chez le haricot commun (*P. vulgare*) (**Talukdar, 2013**). Un raccourcissement des poils racinaires accompagné d'une formation épaisse de l'extrémité des poils racinaires a été observé chez les plantes de blé (*Triticum aestivum*) exposées au Cr (**Tripathi et al., 2015**).

#### 1.6.1.3 Effet des métaux et des métalloïdes sur le cortex racinaire :

Les tissus corticaux composent de l'exoderme, du mésoderme et de l'endoderme présentent une variabilité structurelle et fonctionnelle en fonction de divers stress environnementaux (**Lux et al., 2004**), et peuvent être fortement influencés par des doses toxiques de métaux et de métalloïdes. En raison de la fonction de barrière de l'exoderme et de l'endoderme ou de la proportion relativement importante de cortex dans la racine, l'effet des métaux (loïdes) sur le cortex de la racine est souvent très clairement visible. Une augmentation de l'épaisseur du cortex due à la présence de métal (loïds) est relativement moins fréquente et beaucoup moins dommageable, comme cela a été observé dans les racines de maïs (*Z. mays*) traitées au Cd. L'épaississement du cortex racinaire n'était pas lié à l'augmentation du nombre de couches corticales mais à la présence de cellules parenchyma plus grandes, probablement en raison de la diminution de l'élongation des racines comme le suggèrent **Maksimovic et al. (2007)**. De même, l'accumulation de Cr dans *Pteris vittata* a induit une dégradation des cellules corticales et endodermiques des racines (**Sridhar et al., 2011**).

La réduction visible du diamètre des racines des plantes *Glycine max* traitées à l'As Traitement a également été causée par la dégradation des cellules corticales, la diminution de l'épaisseur du parenchyme et de l'ensemble des cellules dommages.

En général, on pense que le développement accru des barrières apoplasmiques protège les tissus racinaires contre l'absorption incontrôlée d'éléments. Par exemple, une formation accrue de bandes Cas- parian dans l'endoderme due à la présence de Hg a également été observée chez le riz

(Wang et al. ,2015). En outre, il a été démontré que la bande de Casparian ou les lamelles subérines dans l'exoderme et l'endoderme des racines se développent plus près de l'apex des racines chez diverses espèces végétales après exposition au Cd (par exemple, Lunackova et al. , 2003 ; Martinka et Lux 2004 ; Zelko et Lux, 2004 ; Vaculík et al., 2009; Vatehov'a et al., 2012 ; Lukačova 'et al., 2013 ; Tao et al., 2017).

Il a également été observé que la culture dans différents milieux a un impact sur le développement des barrières apoplasmiques des racines, ce qui influence consécutivement l'absorption de Cd par les plantes (Redjala et al. ,2011 ; Lux et al. , 2011 et Líška et al ,2016) ont observé un dépôt intensif de subérine et de lignine dans la partie de la racine qui était exposée à la toxicité du Cd, par rapport au côté opposé de la racine qui poussait dans des conditions de contrôle. Des preuves supplémentaires de l'importance des dépôts de subérine en réponse au stress du Cd ont été trouvées dans les racines de l'espèce bulbeuse *Merwillia plumbea*. Bien que ce monocotylédone ne fait pas un périderme régulier, en raison de l'absence de méristèmes secondaires, après exposition au Cd, les plantes ont présenté une formation ectopique de périderme subérisé dans les zones périphériques du cortex racinaire (Lux et al. ,2011).

#### **1.6.1.4 Effet des métaux et des metalloïdes sur le cylindre central et de système vasculaire des racines :**

Le cylindre central de la racine, qui recouvre les tissus conducteurs et les cellules parénétiques de la moelle, est responsable du transport des solutés de la racine à la pousse. Les cellules parenchymatiques susceptibles d'être endommagées et de perdre leur intégrité peuvent, chez certaines espèces, former une zone de protection. Chez *Brassica oleracea*, une diminution significative du diamètre du cylindre central était un signe d'exposition à l'As, contrairement à l'augmentation du diamètre du cylindre central chez *B. juncea* (Freitas-Silva et al. ,2016).

Chez *Trigonella foecum graecum* après un stress au Cd et le stress Pb, une proportion moindre de tissus vasculaires était liée à la diminution de la longueur et de la largeur des fibres du xylème et à la réduction du diamètre des vaisseaux du xylème. De plus, la densité des vaisseaux était significativement plus faible que dans le groupe témoin (Ahmad et al. , 2005).

Une augmentation du diamètre et le passage d'une section transversale ronde à une section transversale ovale du xylème ont été observés chez les jeunes plants de maïs traités à l'Al (75 µM). En conséquence, le diamètre du protoxyle et la surface de la moelle ont été réduits. Si la concentration d'Al augmentait (300 µM), les vaisseaux du méta- xylème étaient dépourvus de

parois cellulaires secondaires, avec un diamètre non uniforme et une forme variable (**Batista et al. ,2013**).

### **1.6.2 Altérations anatomiques des tissus de la tige dues aux métaux et aux métalloïdes :**

La tige est l'organe de la plante qui relie les racines aux principaux organes photosynthétiques. L'une des principales fonctions de la tige est de porter les feuilles et les fleurs. La tige est également impliquée dans le transport des solutés et la translocation de la racine à la pousse. Par conséquent, les métaux et les métalloïdes absorbés par les racines peuvent également affecter négativement l'organisation des tissus de la tige plusieurs rapports documentent les divers effets négatifs des métaux (loids) sur les cellules épidermiques et corticales de la tige. Par exemple, (**Chaudhari et al (2016)**) ont trouvé diverses anomalies comme la rupture de l'épiderme, l'agrandissement anormal des cellules corticales dû à une division cellulaire irrégulière causée parla présence de Cd.

Les métaux et les métalloïdes sont transportés vers les organes de surface par les tissus vasculaires ; c'est pourquoi le système vasculaire et ses environs sont le site d'altérations anatomiques fréquemment observées dans les tissus de la tige. **Konarska (2010)** a observé une réduction du diamètre de l'hypocotyle, du nombre de faisceaux vasculaires et de l'épaisseur des vaisseaux du xylème en pousse de poivron rouge (*Capsicum annuum*). **Ahmad et al. (2005)** ont également révélé que le stress du Cd entraînait une réduction du tissu vasculaire et de la zone de moelle de la tige de *Trigonella foenum graecum*, tandis que les cellules corticales augmentaient avec l'augmentation de la concentration du Cd.

### **1.6.3 Altérations anatomiques des tissus foliaires dues aux métaux et aux métalloïdes :**

La feuille est l'organe principal de la photosynthèse, un processus essentiel important par l'énergie pour maintenir les processus physiologiques en cours dans tous les tissus végétaux est assuré. Par conséquent, la stratégie principale de la plupart des plantes consiste à limiter l'absorption et la translocation des métaux lourds et des métalloïdes vers ces organes de surface, et à protéger les tissus photosynthétiquement actifs contre les effets néfastes des éléments

dangereux. Bien que plusieurs études n'aient fait état que d'une translocation limitée des racines aux pousses, il a été démontré que des doses déjà faibles de métaux et de métalloïdes provoquent de graves altérations anatomiques des feuilles. Plusieurs rapports indiquent que l'épaisseur des feuilles a diminué en raison de la présence de ions métalliques. Par exemple, cela a été observé comme la conséquence de la présence d'As (**Freitas-Silva et al. ,2016 ; Vezza et al. ,2018**).

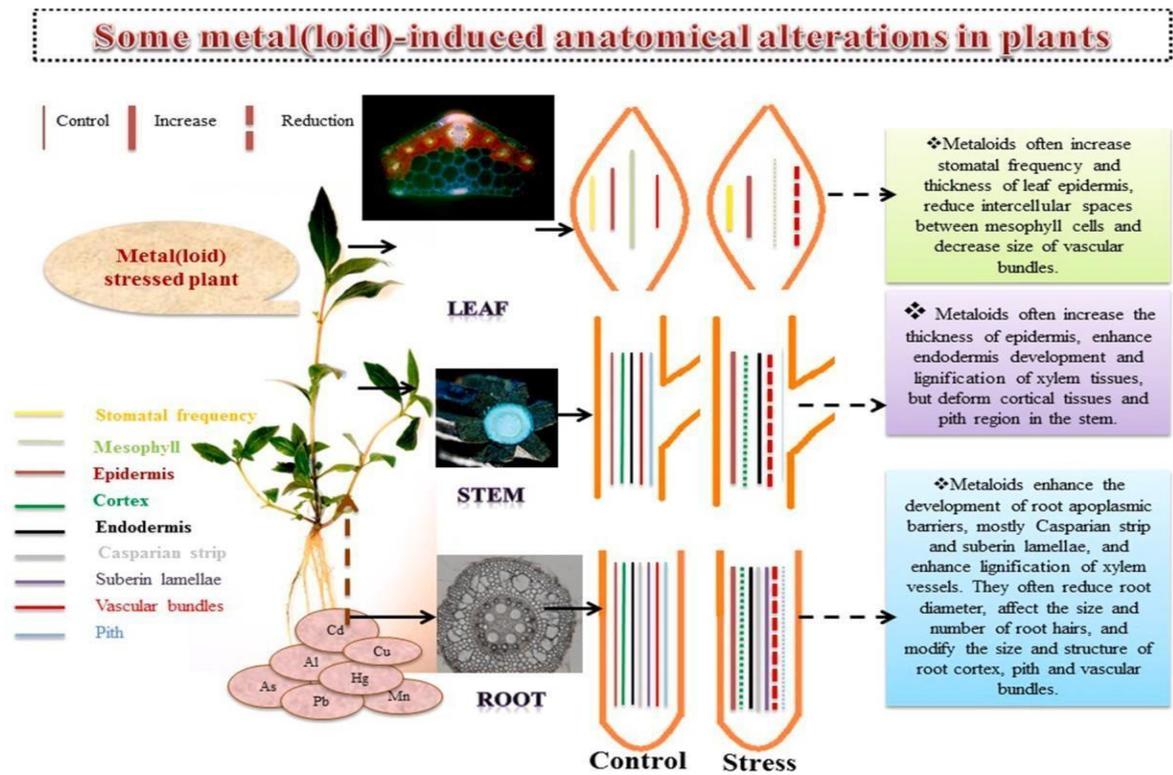
**Ozykiet al. (2013)** ont signalé une diminution significative de l'épaisseur de la feuille de coton en cas de toxicité du Cd et *Vaculíketal. (2015b)* ont également enregistré une diminution de l'épaisseur de la feuille de maïs chez les plantes exposées au Cd.

En outre, une diminution de l'épaisseur des feuilles due à l'aplatissement des cellules épidermiques et à la réduction des espaces intercellulaires entre les cellules mésophylles, ainsi qu'un dépôt de callose plus important ont été observés en raison de la toxicité du Mn (**Wissemeier et al. ,1992 ; Doncheva et al. ,2009**).

Le Ni a également eu des effets néfastes sur les feuilles, comme la réduction de la surface du limbe des feuilles chez *Brassica oleracea* (**Molas, 1997**).

Par contre, une augmentation de l'épaisseur du limbe a été observée sur diverses espèces végétales exposées aux métaux et aux métalloïdes. Par exemple, De **Jesus et al (2016)** ont signalé une augmentation de l'épaisseur du limbe après l'application d'Al. **Panou-Filotheou et al (2001)** ont décrit un épaissement de la feuille de l'origan (*Origanum vulgare*) exposé au Cu, et **Shi et Cai (2008)** ont observé une augmentation de la taille de la feuille des feuilles d'arachide exposées au Cd.

Ces résultats ont donc montré que la réponse des tissus foliaires n'est pas toujours uniforme et peut varier en fonction du métal (loïd) et d'autres conditions, comme la durée du traitement, la concentration en métaux, l'âge de la feuille de la plante, etc. (**Figure 14**).



**Figure 14.** Aperçu général de l'impact du métal (loid) sur les altérations structurelles des racines, des tiges et des feuilles (Vaishali Yadav, 2021).

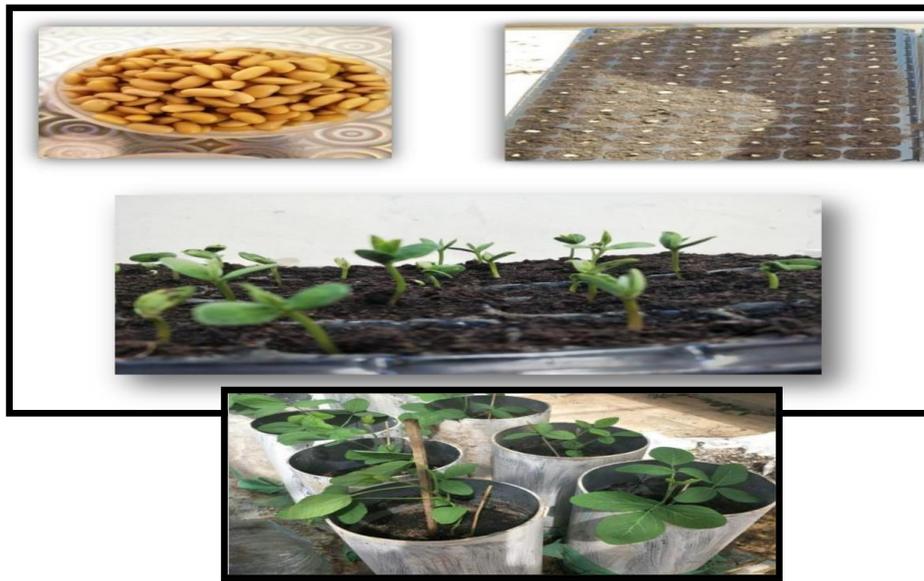
DEUXIEME PARTIE  
ÉTUDE EXPERIMENTALE

**CHAPITRE I :**  
**MATERIELS ET METHODE**

## 1 Matériel végétal et traitement métallique au cadmium :

Le modèle végétal utilisé est la plante de soja (*Glycine max* cv. *Merr*). Les graines de soja ont été triées et stérilisées en surface avec de l'hypochlorite de sodium (5 %) pendant 5 minutes, puis rincées plusieurs fois à l'eau distillée. Les graines stérilisées ont été ensuite semées dans un mélange de sable et de terreau (9 :1, v : v) dans différents pots cylindriques de 50 cm de hauteur et 20 cm de diamètre. La culture du soja a été menée dans des conditions contrôlées sous serre (température  $24 \pm 2$  °C, humidité relative 60-70 % et une photopériode de 14h/10 h (jour/nuit). Après un mois de germination, des plants de 15 à 20 cm de long ont été transplantés dans des cylindres et cultivés pendant 90 jours dans les mêmes conditions que pour la germination

(Figure15).



**Figure 15.** Plantes de Soja après un mois de germination, repiquées dans des cylindres (Tadjouri H,2019).



**Figure 16.** Les plantes du Soja (*Glycine max* L.) traités au Cd cultivées sous serre.

Les plantules de (*Glycine max cv. Merr*) âgées de 4 mois ont été traitées et arrosées par le cadmium ajouté dans la solution nutritive sous forme de Cd Cl<sub>2</sub>, à quatre doses différentes, 0, 50, 150 et 300 ppm. Pour chaque traitement, 4 répliquâtes ont été réalisés (**Figure 16**).

## 2. Récolte des plantules :

Lors de la récolte, les plantules ont été fractionnées en deux parties : racines et parties aériennes. Afin d'éliminer le cadmium non absorbé par la plante, les racines ont été rincées trois fois successifs par l'eau distillée puis séchées entre deux couches de papier filtre (**Figure 17**).



**Figure 17.** La partie racinaire du soja (*Glycine max L.*) des différentes doses de Cd Cl<sub>2</sub>,

## 3. Détermination des paramètres physiologiques :

### 3.1 Paramètres de croissance :

Les masses de matière fraîche des parties aériennes et des racines ont été déterminées à l'aide d'une balance de précision immédiatement après la récolte. Les échantillons ont été ensuite placés dans des tubes thermorésistants et ont été soumis à dessiccation à l'étuve pendant 48 h à 70°C. La matière sèche des différents échantillons (parties aériennes et racines) est ensuite pesée.

### 3.2 Quantification des pigments (chlorophylles et caroténoïdes) :

Les teneurs en chlorophylles (a, b) et en caroténoïdes ont été déterminées selon la méthode de **Francis (1970)**. Une quantité d'environ 0,1g de matière fraîche de l'échantillon est prélevée, et déposée dans des tubes pré pesés. Les feuilles ont été immergées dans 10 ml d'un mélange d'acétone à 80% et éthanol à 20% avec un rapport de volume (3v :1v), suivi d'une incubation à 4°C pendant 48h dans l'obscurité.

La densité optique des extraits est ensuite mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à 663, 645 et 480 nm. Les concentrations en chlorophylles a et b et en caroténoïdes sont déterminées à

l'aide des équations de **Lichtenthaler (1987)**. Les résultats sont exprimés en  $\mu\text{g/g MF}$ .

### 3.3 Estimation de la teneur relative en eau des feuilles (LRWC) :

La teneur relative en eau des feuilles a été obtenue selon **Barrs et Weatherley (1962)**. Des disques des feuilles de 10 mm de diamètre ont été flottés sur l'eau distillée pendant 4h pour déterminer le poids turgide (TW). Enfin, les disques étaient séchés au four à  $80^\circ\text{C}$  pendant 48 h pour estimer le poids sec (DW). Le LRWC a été calculé selon l'équation :

$$\text{LRWC (\%)} = [(\text{FW} - \text{DW}) / (\text{TW} - \text{DW})] \times 100$$

## 4. Estimation des indicatifs du stress oxydatif :

### 4.1 Estimation la teneur en malondialdéhyde (MDA) :

Les radicaux libres génèrent le processus de la peroxydation des lipides chez un organisme. Le malondialdéhyde (MDA) est l'un des produits finaux de la peroxydation des acides gras polyinsaturés dans les cellules. La peroxydation des lipides a été déterminée en mesurant la formation du MDA avec la réaction de l'acide thiobarbiturique (TBA) selon la méthode décrite par **Heath et Packer (1968)**. Environ 100 mg de tissus végétaux fraîches (Racines et feuilles) ont été broyés dans 3 ml de solution 5 % d'acide trichloroacétique (TCA).

Le broyat a été centrifugé à  $10\,000 \times g$  pendant 15 min. Après la centrifugation, 1 ml de surnageant a été mélangé avec 4 ml d'une solution formé de 0.5% d'acide thiobarbiturique (TBA) et 20% d'acide trichloroacétique (TCA) (m/v: 1/10). Le mélange a été incubé dans un bain-marie bouillant à  $95^\circ\text{C}$  pendant 30 minutes. Pendant cette incubation, un complexe se forme entre le TBA et les composés aldéhydiques, essentiellement le malondialdéhyde (MDA) : TBA-MDA. La réaction a été arrêtée par un refroidissement immédiat dans un bain de glace. L'absorbance du surnageant a été mesurée à 532 nm.

Les valeurs ont été corrigées pour tenir compte de l'absorption non spécifique en soustrayant l'absorbance lue à 600 nm. La quantité du MDA a été calculée à partir du coefficient d'extinction molaire ( $\epsilon=155 \text{ m M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) et exprimée en  $\mu\text{mol/g MF}$ .

$$\text{MDA } (\mu\text{mol/g MF}) = \frac{(A_{532} - A_{600}) \times V \times 1000}{155 \times MF}$$

**A:** Absorbance

**V :** Volume de l'extrait en (ml)

**MF :** Matière fraîche en (g)

#### **4.2 Estimation de la teneur en peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) :**

L'accumulation du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans les feuilles et les racines a été détectée mesurée par une méthode spectrophotométrique selon **Velikova et al. (2000)**. Des tissus frais (0,1g) ont été broyés dans un bain glacé à l'aide d'un mortier et un pilon avec 3 ml de TCA (acide trichloracétique) à 0,1 % (p/v). L'homogénat a été centrifugé à 12 000×g pendant 15 min à 4 °C. À 0,5 ml du surnageant, 0,5 ml de tampon de phosphate (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ; pH 7) et 1,0 ml d'iodure de potassium (1 M) ont été ajoutés. La densité optique du mélange a été lue à 390 nm, tandis que la teneur finale en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a été déterminée à l'aide d'une courbe standard et exprimée en μmol g<sup>-1</sup> MF.

#### **5. Détermination de l'activité des enzymes antioxydants :**

##### **5.1 Extraction :**

En conditions froides, environ 0,3g de matériel végétale a été homogénéisé dans un tampon d'extraction contenant 50mM de tampon de phosphate de potassium (pH 7,0), 1mM d'EDTA et 1% de polyvinylpyrrolidone (p/v). Le mélange a été centrifugé pendant 12 minutes à 13 000×g, 4 °C et le surnageant a été utilisé pour déterminer les activités enzymatiques et pour déterminer la teneur en protéines totaux.

##### **5.2 Dosage des protéines :**

Le dosage des protéines a été effectué par spectrophotométrie d'après la méthode de **Bradford (1976)**. Une quantité de l'extrait est additionnée à 2.5 ml du réactif de Bradford. La coloration se développe dans un temps minimum de 5 min mais ne dépassant pas 30 min. L'absorbance est lue à 595 nm. La gamme étalon est réalisée avec des concentrations croissantes de sérum albumine bovine (BSA).

Préparation du réactif de Bradford Le bleu brillant de Coomassie G-250 (100 mg) a été dissous dans 50 ml d'éthanol à 95 %. À cette solution 100 ml 85% (p/v) de l'acide phosphorique a été ajouté. La solution obtenue a été diluée jusqu'à un volume final de 1 litre. La solution conservée à froid (4°C).

##### **5.2.1 Détermination de l'activité de catalase (CAT, EC 1.11.1.6) :**

L'enzyme catalase catalyse la conversion du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en H<sub>2</sub>O et O<sub>2</sub>. L'activité de l'enzyme a été déterminée selon la méthode **d'Aebi (1984)**. Elle est mesurée par la diminution de la densité

optique à 240 nm ( $\epsilon = 0.036 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) en raison de la décomposition du  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Le mélange réactionnel contenait 50 mM de tampon Na- phosphate (pH 7,0) dont 30 mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

### 5.2.2 Détermination de l'activité de l'ascorbate peroxydase (APX, EC1.11.1.1) :

Selon la méthode de **Nakano et Asada (1981)**, l'activité de l'APX a été mesurée à 290 nm. Le mélange réactionnel contenait 50 mM de Na-phosphate tampon (pH 7,0) comprenant 50 mM d'ascorbate, 0,1 mM  $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ , 1,2 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ . L'APX a été calculé en utilisant le coefficient d'extinction ( $\epsilon = 2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

### 5.2.3 Détermination de l'activité du gaïacol peroxydase (GPx, EC 1.11.1.7) :

L'activité du GPX a été déterminée à 470 nm selon la méthode du **Cakmak et Marschner (1992)**. Le milieu réactionnel (volume final égal à 1 mL) est composé de tampon phosphate (25 mM, pH 7), de gaïacol (0,05 % v/v), de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (10 mM) et de l'extrait enzymatique (50  $\mu\text{L}$ ). L'activité a été calculée en utilisant le coefficient d'extinction molaire ( $\epsilon = 26,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

### 5.2.4 Détermination de l'activité du Glutathione-S-transferase (EC 2.5.1.18)

L'activité de la GST a été déterminée par spectrophotométrie en utilisant un substrat artificiel, le 1-chloro-2,4-dinitrobenzène (CDNB), selon la méthode du **Habig et al. (1974)**. Dans 1 ml de milieu réactionnel contenant 100 mM de tampon phosphate pH 7, 0,5 mM de GSH, 1 mM de CDNB et 50 mg d'extrait protéique. L'augmentation de l'absorbance à 340 nm due au complexe GSH-CDNB. La synthèse des adduits a été surveillée suivie pendant 1 minute. L'activité de la GST a été calculée en utilisant le coefficient d'extinction de l'adduit du GSH-CDNB ( $\epsilon = 9,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

### 5.2.5 Détermination de l'activité du L-Phénylalanine ammonia lyase (PAL, EC4.3.1.5) :

L'activité du PAL a été déterminée par spectrophotométrie à 290 nm par la formation d'acide trans-cinnamique d'après la méthode du **Gerasimova et al. (2005)**. L'activité du PAL a été déterminée dans un 1 ml de mélange réactionnel contenant 100 mM de tampon phosphate pH 7,0, 13 mM de phénylalanine et l'extrait protéique.

Les échantillons ont été incubés à 37°C pendant 1 h. L'augmentation de l'absorbance, due à l'accumulation d'acide cinnamique, a été suivie à 290 nm pendant 45 minutes. L'activité du PAL a été calculée à l'aide du coefficient d'extinction de l'acide cinnamique ( $\epsilon = 17,4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

## 6 Détermination de l'activité des antioxydants non enzymatiques :

### 6.1 Estimation de la teneur en proline :

Le contenu en proline libre a été estimé selon la méthode de **Bates et al. (1973)**. Un

échantillon de feuilles fraîches (0,5) g est homogénéisé avec 5 ml d'acide sulfosalicylique à 3% (m/v) et l'homogénat a été centrifugé à 12 000×g pendant 12 min. 2 ml d'acide acétique glacial et 2 ml de réactif à la ninhydrine (0,1% ninhydrine (m/v) dans 60 % acide acétique 100% et 40 % d'acide orthophosphorique 6 M) ont été additionnés à 2 ml du surnageant. Après 1 h au bain-marie bouillant, la réaction est arrêtée par refroidissement dans de la glace. Puis 2 ml de toluène sont ajoutés et l'ensemble est agité pendant 1 min avant incubation à température ambiante. La densité optique du chromophore est lue à 520 nm. Ensuite, le calcul a été effectué à l'aide d'une courbe étalon, selon l'équation :

$$[(\mu\text{g proline/ml} * X \text{ ml de toluène})/115,5 \mu\text{g}/\mu\text{mol}] / [\text{g échantillon}/5] = \mu\text{mol de proline} / \text{g de poids frais.}$$

## 6.2 Détermination de l'acide ascorbique :

La teneur en acide ascorbique a été mesurée selon la méthode de **Kampfenkel et al. (1995)**. En conditions froides, des tissus de feuilles fraîches (0,1 g) ont été homogénéisés avec 3 ml de TCA à 6 % (v/m) à l'aide d'un mortier et d'un pilon réfrigérés. L'homogénat a été centrifugé à 12 000 g pendant 5 minutes à 4 °C. Le surnageant est ensuite collecté pour mesurer la densité optique par spectrophotométrie à 520 nm. La quantité d'acide ascorbique a été exprimée en  $\mu\text{M. g}^{-1}\text{MF}$ .

## 7. Détermination de la teneur en glutathion (GSH), thiols non-protéiques (NPT) et lesphytochelatines (PCs) :

### 7.1 Extraction :

Dans des conditions de froid, 100 mg de feuilles et de racines fraîches ont été homogénéisées dans 3 ml d'acide sulfosalicylique à 5 %. L'homogénat a été centrifugé à 10000×g à 4 °C pendant 20 min et le surnageant a été recueilli pour la détermination du contenu en NPT et en GSH.

#### 7.1.1 Détermination de la teneur en glutathion réduit (GSH) :

La teneur en GSH a été analysée selon le protocole d'**Anderson et al. , (1985)**. Le milieu réactionnel contenant 0,6 ml de tampon phosphate 100 mM (pH 7,0) et 40  $\mu\text{l}$  de DTNB ont été ajoutés à 0,5 ml de surnageant. L'absorbance a été enregistrée à 412 nm.

#### 7.1.2 Dosage des thiols non-protéiques :

Les teneuses racinaires en NPT ont été déterminés à l'aide du réactif d'Ellman (DTNB) d'après la méthode du **Ric De Vos et al. (1992)**. Un volume de 630  $\mu\text{l}$  de tampon phosphate  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0,5 M et 25  $\mu\text{L}$  de 5,5'-dithiobis (acide 2-nitrobenzoïque) à pH 7 ont été additionnés et

mélangés avec 300  $\mu$ l de surnageant. Le milieu a été agité et l'absorbance a été lue à 412 nm. Le DTNB (extemporanément préparés dans un tampon stock (143mM

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> contenant 6.3mM DTAP, pH 7.5). L'augmentation de l'absorbance de l'échantillon avant et après l'addition du DTNB est corrigée par l'absorbance du réactif DTNB lui-même. Les concentrations ont été calculés en utilisant le coefficient d'extinction molaire du DTNB ( $\epsilon = 13600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ).

### 7.1.3 Estimation des teneurs en phytochélatines :

La teneur en phytochélamine-SH a été calculée en soustrayant la quantité de GSH de la quantité totale de composés SH solubles dans l'acide selon la méthode d'Hartley- Whitaker et al. (2002).

$$\text{PC} = \text{NPT} - \text{GSH}$$

## 8. Détermination des métabolites secondaires :

### 8.1 Extraction :

Environ 100 mg de feuilles fraîches ont été broyées et homogénéisés avec 3 ml méthanol à 80 %. L'homogénat est ensuite centrifugé à 10 000×g pendant 10 min à 4 °C. Le surnageant recueilli a servi pour la détermination de la teneur en phénols et en flavonoïdes

### 8.2 Dosage des phénols :

Selon Singleton et al. (1999), le dosage des phénols est effectué par l'utilisation du réactif Folin-Ciocalteu. Ce réactif est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique. L'oxydation des phénols réduit ce réactif en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène. L'intensité de la couleur est proportionnelle au taux de composés phénoliques oxydés. L'absorbance est lue à 720 nm. La teneur des phénols est exprimée en mg. Equivalent d'acide gallique / g de poids frais en utilisant l'acidegallique comme étalon.

### 8.3 Dosage des flavonoïdes :

La teneur des flavonoïdes a été déterminée à l'aide d'une méthode colorimétrique au chlorure d'aluminium décrite par Zhishen et al. (1999). À 0,5 ml d'extrait, 4 ml d'eau distillée, 0,3 ml de Na NO<sub>2</sub> à 5% ont été ajoutés. Ensuite 3 ml d'Al Cl<sub>3</sub> à 10% a été ajouté 5 min plus tard. Après 6 min d'incubation, 2 ml de NaOH à 4% a été additionné. L'homogénat obtenu a développé une coloration rose et l'absorbance est mesurée à 510 nm. La teneur en flavonoïdes a été calculée par une courbe d'étalonnage réalisé par la quercétine.

#### 8.4 Estimation du pouvoir antioxydant (Test DPPH) :

Le pouvoir antioxydant a été estimé en utilisant l'activité de piégeage des radicaux libres du DPPH selon la méthode décrite par **Tadolini et al. (2000)**. L'absorbance du test est déterminée à 517 nm.

#### 8.5 Évaluation des risques :

Le risque d'ingestion de légumes contaminés pour la santé humaine a été estimé par un indice du risque sanitaire (HRI : Health Risk Index) (**U.S. EPA, 2000**), calculé selon la formule suivante (**Peng et al. 2018 ; U.S. EPA 2017 ; Pennisi et al. 2016**) :

$$\text{HRI} = A \times C \times D / \text{BW} \times \text{RfD}$$

Où :

**A** = concentration du métal dans les plantes ( $\text{mg kg}^{-1}$ ),

**C** = facteur de conversion,

**D** = dose journalière de légumes ( $\text{kg/jour}$ ),

**BW** = poids corporel,

**RfD** = dose orale de référence du toxique ( $\text{mg kg}^{-1} \text{ jour}^{-1}$ ).

La dose chronique de référence pour le cadmium est de 0,001  $\text{mg/kg/jour}$  pour les aliments (**U.S. EPA 2000**). La valeur du HRI inférieure ou égale à 1 indique que les effets négatifs ne sont pas susceptibles et la population exposée peut être considérée comme sûre.

### 9 Dosage de la teneur en cadmium et des éléments nutritifs :

Elles se rapportent aux expériences suivantes :

Ce procédé fournit la digestion acide des poudres de plantes dans un dispositif de récipient fermé chauffé sous une température contrôlée dans une étuve, pour la détermination du Magnésium (Mg), et du sodium (Na) par spectrophotométrie d'absorption atomique (SAA Flamme). La minéralisation de la poudre végétale a porté sur 36 échantillons, dans des flacons stérilisés en verre (**Figure 18**).



**Figure 18.** Les plantes en poudre (Tadjouri ; 2019).

### 9.1 Protocole expérimentale :

- **Instrumentations :**

- ✓ Une étuve.
- ✓ Des godets en téflon fermés hermétiquement.
- ✓ Balance analytique.

- **Les réactifs utilisés :**

- ✓ 06 ml de  $\text{HNO}_3$  à 69%.
- ✓ 02 ml de  $\text{H}_2\text{O}_2$  à 30%.

#### a. Minéralisation de la poudre végétale :

La minéralisation a lieu sous une hotte aspirante dans un godet en téflon, des masses de 0.5g de chaque échantillon ont été pesées dans des godets à téflon, puis des volumes de 6 ml d'acide nitrique ( $\text{HNO}_3$ ) concentré à 69% et de 2 ml d'eau oxygénée ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) à 30 % ont été ajoutés, les godets sont fermés hermétiquement avec des pinces et laissés à la température ambiante pendant une heure, par la suite les godets ont été placés dans une étuve réglée à une température de 110 °C pendant 120 min.

Après refroidissement les échantillons ont été filtrés dans des fioles jaugées de 100 ml, préparées au préalable, les godets sont rincés plusieurs fois avec de l'eau bi- distillée, les fioles sont complétées ensuite au trait de jauge par l'eau bidistillée.

#### b. Stockage des échantillons minéralisés et le blanc

Les fioles sont ensuite conservées dans un réfrigérateur à 4°C pour éviter toute perte et contamination jusqu'au moment d'analyse par spectrophotométrie d'absorption atomique.

## 10 L'anatomie de la plante :

### 10.1 Technique de double coloration :

#### a. Réalisation d'une coupe végétale à main levée :

- Matériel pour réaliser et observer les coupes : bâtons de moelle de sureau – lame de rasoir/rasoir de coupe face plane – lames, lamelles.
- Matériel pour colorer les coupes : allumette taillée en biseau – 6 verres de montre – eau et eau de javel, eau acétique à 1 % vert de Méthyle - rouge Congo.
- Réalisation de coupes transversales (racines, tiges ou feuilles).
- Inclusion de l'organe - Fendre le bâton de moelle de sureau en deux dans le sens de la longueur. - Creuser dans chaque demi-cylindre obtenu une cavité de dimensions convenables (ni trop grandes ni trop étroites) pour loger l'objet à couper - Placer l'objet dans ces cavités.
- Réaliser une première coupe perpendiculaire à l'axe (ou plan) de symétrie de l'organe pour déterminer le plan de coupe ; prendre le rasoir d'une main et l'appuyer sur l'index de l'autre main puis le tirer à soi d'un rapide mouvement de faux.
- Exécution des coupes, coloration des coupes et montage entre lame et lamelle.
- Matériel pour colorer les coupes : allumette taillée en biseau – 6 verres de montre – eau et eau de javel, eau acétique à 1 % vert de Méthyle - rouge Congo (**Chaker, 2003 ; Figure19**).

#### b. Réalisation d'une coupe transversale racinaire

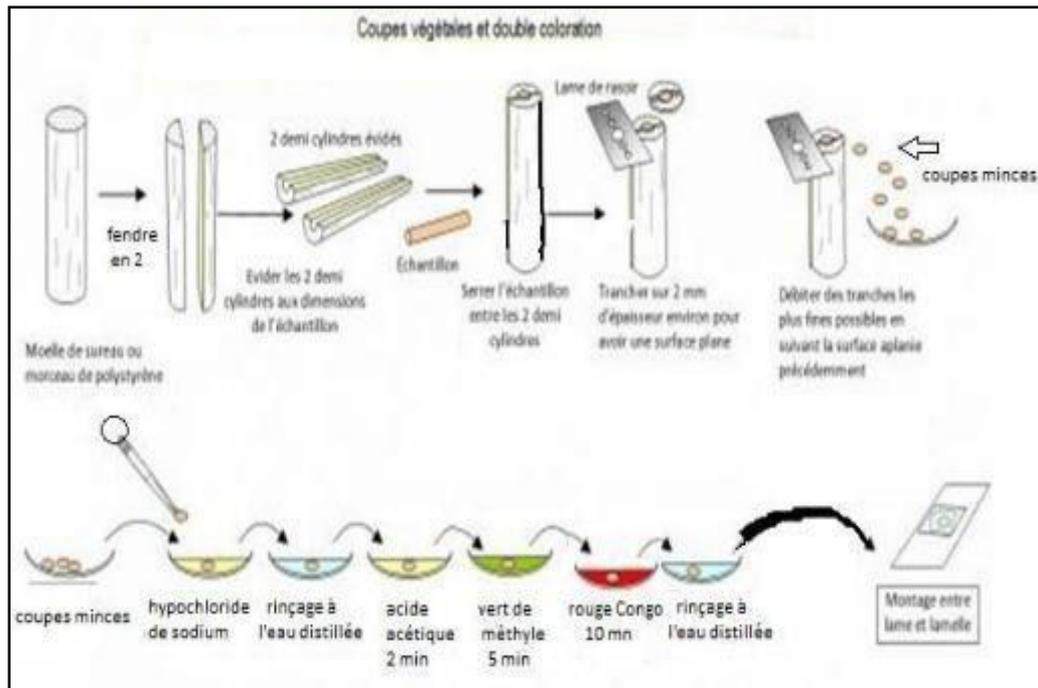
- Inclusion de l'organe - Fendre le bâton de moelle de sureau en deux dans le sens de la longueur. - Creuser dans chaque demi-cylindre obtenu une cavité de dimensions convenables (ni trop grandes ni trop étroites) pour loger l'objet à couper - Placer l'objet dans ces cavités.
- Réaliser une première coupe perpendiculaire à l'axe (ou plan) de symétrie de l'organe pour déterminer le plan de coupe ; prendre le rasoir d'une main et l'appuyer sur l'index de l'autre main puis le tirer à soi d'un rapide mouvement de faux.
- Exécution des coupes, coloration des coupes et montage entre lame et lamelle.
- Réaliser plusieurs coupes en respectant le plan de coupe précédent et en utilisant la même technique.
- Faire des coupes les plus fins possibles tout en sachant qu'un fragment de coupe peut permettre une bonne observation.
- Porter les coupes à l'aide de l'allumette taillée en biseau, dans un verre de montre rempli

d'eau.

- Transférer ensuite les coupes dans les différents verres de montre en respectant les temps indiqués.

### c. La technique de coloration

- Eau de Javel 15-20 min
  - Lavage à l'Eau distillée 1 min.
  - Eau acétique : 2 à 5 min.
  - Vert de Méthyle : 5 min.
  - Lavage à l'eau distillée.
  - Rouge Congo 10 à 15 min.
  - Dernier lavage à l'eau distillée.
- Monter les coupes entre lame et lamelle dans une goutte d'eau.
- Déposer délicatement la lamelle sur la préparation en s'aidant éventuellement d'une aiguille montée.
- Réalisation de coupes transversales de racine.
  - Réaliser des coupes très fines et transparentes, transversalement à l'axe de l'organe (tige ou racine), les déposer sur un des côtés, au fur et à mesure, sur une lame dans une goutte d'eau. La tige étant cylindrique, la coupe transversale montrera au microscope les différents tissus existants.
  - Sélectionner les coupes les plus fines et transparentes et recouvrir d'une lamelle.
  - Ajouter de l'eau si nécessaire en déposant délicatement une goutte en bordure de la lamelle (**Figure 19**).



**Figure19.** Méthodologie de reconnaissance des tissus différenciés des spermaphytes au moyen de la double coloration (Vert de Méthyle / Rouge Congo) (Chaker, 2003).

### 11. Analyse statistique :

Les données ont été analysées à l'aide d'une analyse de variance (ANOVA), suivie d'un post-hoc de Tu key pour comparer les moyennes. Toutes les analyses statistiques ont été effectuées avec le logiciel statistique SPSS (ver.22.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

**CHAPITRE II :**  
**RESULTATS ET DISCUSSIONS**

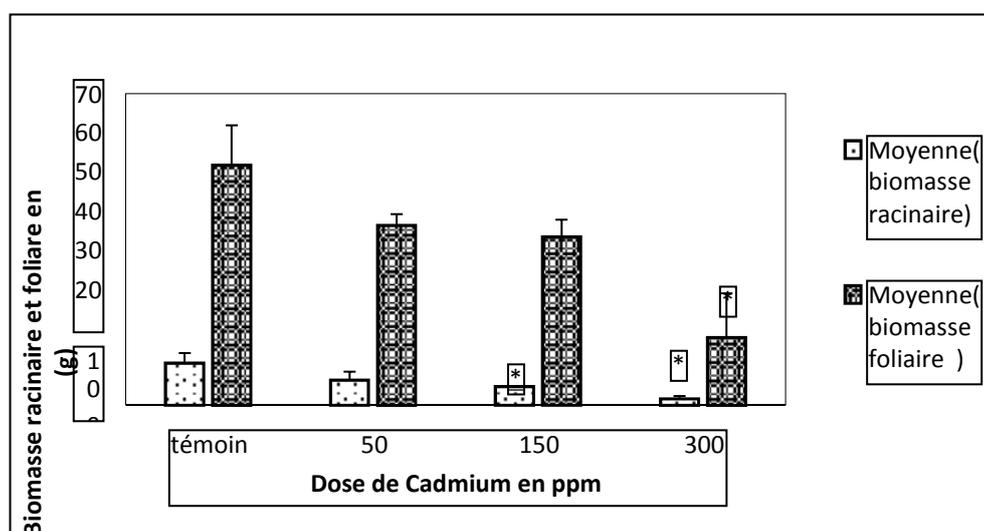
## 1 Résultats :

### 1.1 Effet du traitement au Cd sur la croissance du soja:

La comparaison des moyennes (Test de Tu key) montre qu'une différence significative de la moyenne de biomasse racinaire et la longueur aérienne aux concentrations 150 ppm et 300 ppm par rapport au témoin ; par contre pour la biomasse foliaire et la longueur racinaire ce même résultat était constaté que pour la concentration de 300 ppm (**Figure 20 ,21**).

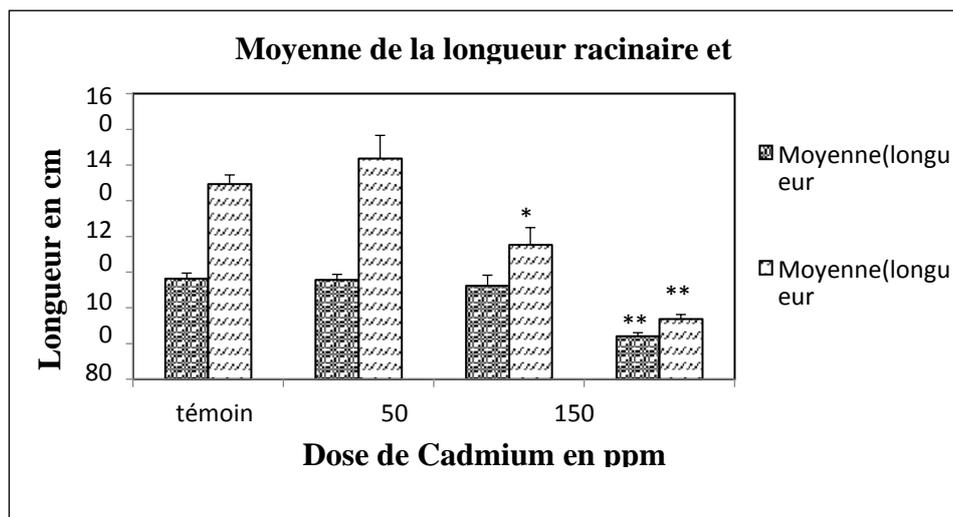
**Tableau 3.** Impact du Cd sur le poids frais et la longueur des pousses et des racines de (*Glycine max L.*) traitées avec différentes concentrations (50, 150 et 300 ppm) de CdCl<sub>2</sub> après 10 jours de croissance dans sol.

Traitements	Poids fraîche de biomasse (g)	Poids fraîche des racines (g)	Longueur de partie aérienne (cm)	Longueur des racines (cm)
Contrôle	53,79 ± 9,09	9,24 ± 2,42	109,33 ± 5,03	56,33 ± 3,05
50 ppm	40,23 ± 2,69	5,37 ± 2,10	123,66 ± 12,89	55,66 ± 3,05
150 ppm	37,59 ± 4,08	3,98 ± 0,36 *	75,33 ± 9,50 **	52,33 ± 5,85
300 ppm	14,94 ± 10,15 ***	1,20 ± 0,81 **	33,66 ± 2,51 ***	24 ± 2 ***



**Figure 20.** Effet de Cd (50, 150, 300 ppm) sur la biomasse racinaire et foliaire.

Les valeurs sont des moyennes ± (SD) de 3 répétitions. Les nombres suivis de \*, \*\* et \*\*\* sont statistiquement différents du contrôle à  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  et  $p < 0,001$ , respectivement, selon le test de Tukey.



**Figure 21.** Effet de Cd (50, 150, 300 ppm) sur la longueur racinaire et foliaire.

Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  (SD) de 3 répétitions. Les nombres suivis de \*, \*\* et \*\*\* sont statistiquement différents du contrôle à  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  et  $p < 0,001$ , respectivement, selon le test de Tu key.

## 1.2 Effets du traitement du Cd sur le contenu des pigments photosynthétiques

La chlorophylle totale et les caroténoïdes ont tous deux présenté une tendance similaire lors de l'exposition au Cd. La teneur totale en chlorophylle et en caroténoïdes du soja a diminué avec l'augmentation des niveaux de Cd après 10 jours de traitement (**Tableau 4**).

La chlorophylle totale a diminué de 34 %, 52 % et 71 % avec 50, 150 et 300 ppm de Cd, respectivement, par rapport au témoin. Les caroténoïdes ont diminué avec l'augmentation de la concentration de Cd et une baisse maximale de 65 % a été enregistrée avec un traitement à 150 ppm de Cd par rapport au témoin.

Nous avons noté une réduction hautement significative de la chlorophylle *a* et *b* en fonction des concentrations appliquées du Cadmium avec une forte corrélation négative ( $r = -0,942$ ) pour la chlorophylle *a* et ( $r = -0,916$ ) pour la chlorophylle *b*, ( $r = -0,954$ ) (**Figure 22**) pour la chlorophylle totale (**Figure 23**) et enfin une réduction significative du caroténoïde avec ( $r = -0,816$ ) (**Figure 24**).

Le stress appliqué a provoqué une diminution en teneur des pigments photorécepteurs soit 88,8 % pour la chlorophylle *a* et de 82,2 % pour la chlorophylle *b*. 90,9 % pour la chlorophylle totale, une diminution en teneur du caroténoïde soit 66,5 %.

La comparaison des moyennes (test de Tu key) montre qu'une différence significative de la moyenne de la chlorophylle *a*, *b* et chlorophylle totale aux différentes concentrations par rapport

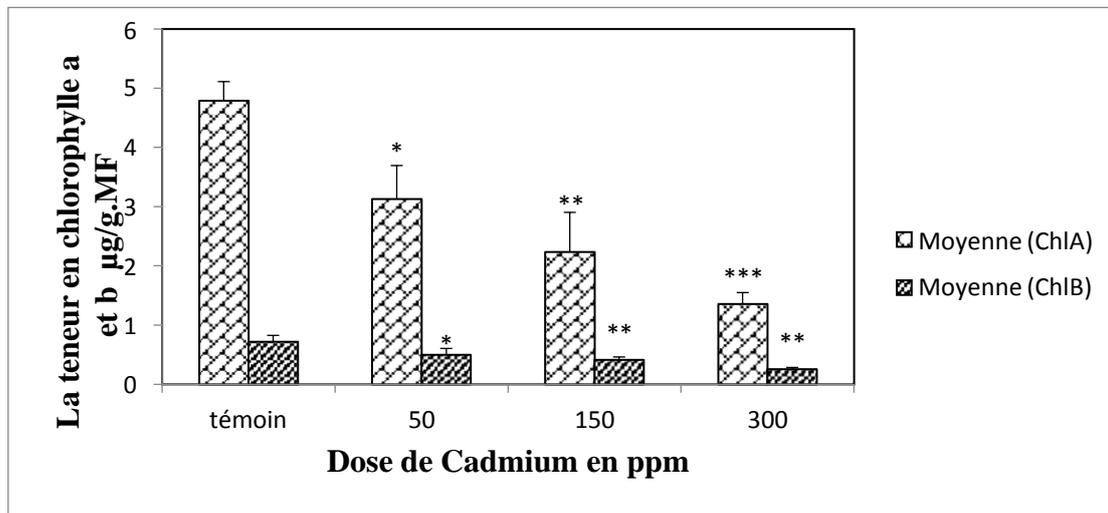
au témoin.

Tandis qu'une différence significative de la moyenne du caroténoïde aux concentrations (150 et 300 ppm) par rapport au témoin.

**Tableau 4:** Impact du Cd sur les contenus des pigments photosynthétiques Chl a, b et des caroténoïdes de (*Glycine max L.*) traités avec différentes concentrations (50, 150 et 300 ppm) de CdCl<sub>2</sub> après 10 jours de croissance dans le sol.

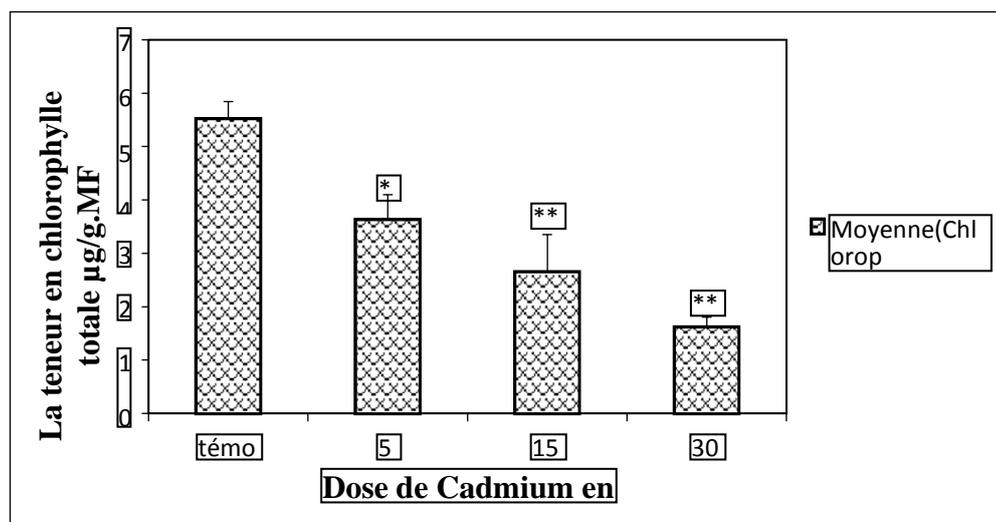
Teneur en pigments $\mu\text{g/g.MF}$	300 ppm	Contrôle	50 ppm	150 ppm
<b>Chlorophylle a</b> ***	4,79 $\pm$ 0,32	3,12 $\pm$ 0,56 *	2,23 $\pm$ 0,67 ***	1,35 $\pm$ 0,19
<b>Chlorophylle b</b> ***	0,72 $\pm$ 0,10	0,49 $\pm$ 0,10 *	0,41 $\pm$ 0,04 **	0,25 $\pm$ 0,03
<b>Total chlorophylle</b> ***	5,51 $\pm$ 0,33	3,62 $\pm$ 0,47 **	2,64 $\pm$ 0,70 ***	1,61 $\pm$ 0,19
<b>Carotenoids</b>	1,18 $\pm$ 0,21	1,04 $\pm$ 0,26	0,41 $\pm$ 0,25 *	0,44 $\pm$ 0,11 *

Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  (SD) de 3 répétitions. Les nombres suivis de \*, \*\* et \*\*\* sont statistiquement différents du contrôle à  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  et  $p < 0,001$ , respectivement, selon le test de Tu key.



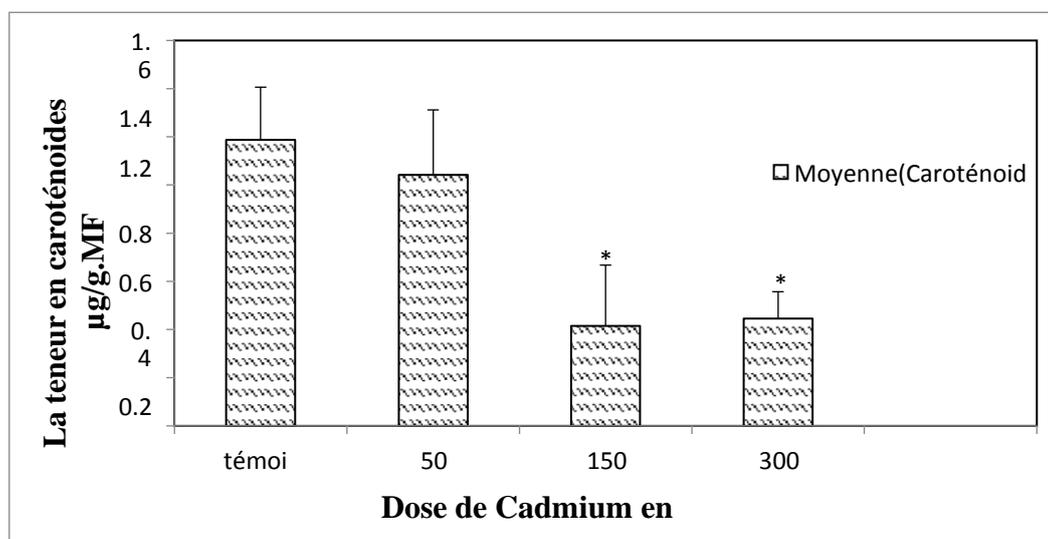
**Figure 22.** Effet de Cd (50, 150, 300 ppm) sur la teneur en chlorophylle a et b.

Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  (SD) de 3 répétitions. Les nombres suivis de \*, \*\* et \*\*\* sont statistiquement différents du contrôle à  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  et  $p < 0,001$ , respectivement, selon le test de Tukey.



**Figure 23.** Effet de Cd (50, 150, 300 ppm) sur la teneur en chlorophylle totale.

Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  (SD) de 3 répétitions. Les nombres suivis de \*, \*\* et \*\*\* sont statistiquement différents du contrôle à  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  et  $p < 0,001$ , respectivement, selon le test de Tukey.



**Figure 24.** Effet de Cd (50, 150, 300 ppm) sur la teneur en caroténoïdes.

Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  (SD) de 3 répétitions. Les nombres suivis de \*, \*\* et \*\*\* sont statistiquement différents du contrôle à  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  et  $p < 0,001$ , respectivement, selon le test de Tukey.

### 1.3 Effet du traitement au Cd sur la teneur relative en eau des feuilles (TRE)

Comme l'indique les résultats, le stress du Cd a affecté la teneur relative en eau de manière dose-dépendante. Le TRE a diminué de 24,34 % à 300 ppm de Cd par rapport au contrôle. Les résultats statistiques concluent que le stress lié au Cadmium sur la teneur relative en eau (RWC)

de notre écotype est non significatif (Sig = 0,452) avec une faible corrélation négative ( $r = -0,436$ ).

Une légère diminution des moyennes de la teneur relative en eau et estimé à 19%, ce qui confirme que la partie foliaire de la plante stressée n'a pas été perturbé dans l'absorption de l'eau.

#### 1.4 Effets du traitement au Cd sur les teneurs en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et en MDA

La teneur en malondialdéhyde (MDA) résultant de la dégradation des acides gras polyinsaturés dans la membrane plasmique est déterminée à l'aide de l'acide thiobarbiturique. L'accumulation de malondialdéhyde a été surveillée pendant la période de traitement au Cd sur les racines et les feuilles de *Glycine max* L.

Les résultats obtenus sont présentés dans les (Figures 25 et 26). Sur la pousse, l'exposition du soja au stress du Cd a augmenté les teneurs en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et en MDA à toutes les concentrations de stress du Cd. Dans les feuilles, la production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et de MDA a été fortement induite par le Cd même à la plus faible concentration testée, atteignant une augmentation de 417 % et 310 %, respectivement, dans le traitement avec 300 ppm de Cd. La teneur en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et en MDA était significativement plus élevée dans les racines que dans les feuilles du soja traité au Cd.

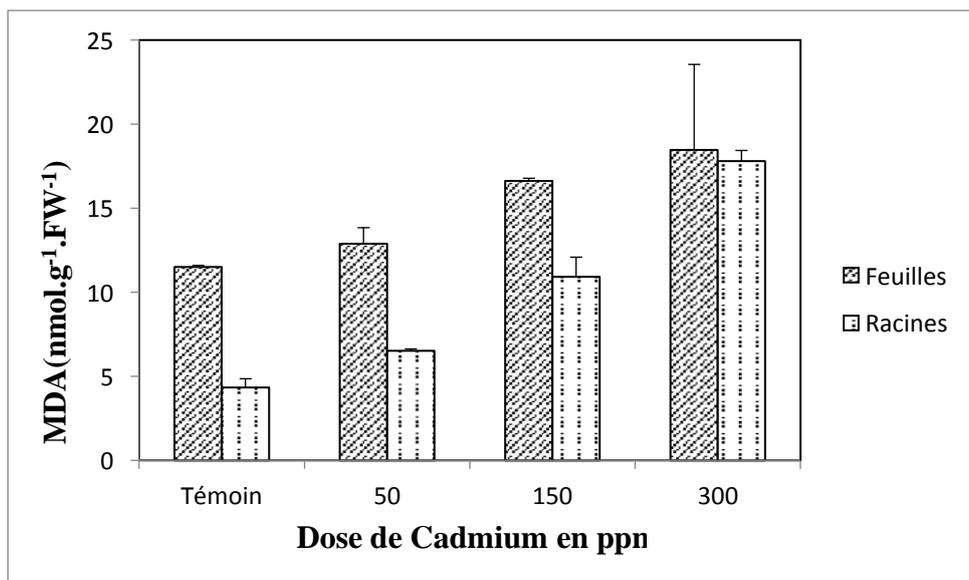
La teneur en malondialdéhyde dans les feuilles et les racines croit proportionnellement avec les concentrations du stress appliqué.

Le taux de la teneur en malondialdéhyde en feuilles passe de 112% pour la dose de 50 ppm à 144% pour 150 ppm pour afficher un taux de 155% pour la dose de 300 ppm. Au niveau des racines passe de 150% pour la dose de 50 ppm à 252% pour 150 ppm pour afficher un taux de 410% pour la dose de 300 ppm.

Respectivement, le taux de la production de peroxyde d'hydrogène en feuilles passe de 125% pour la dose de 50 ppm à 167% pour 150 ppm pour afficher un taux de 197% pour la dose de 300ppm. Dans les racines passe de 167% pour la dose de 50 ppm à 381% pour 150 ppm pour afficher un taux de 517% pour la dose de 300 ppm.

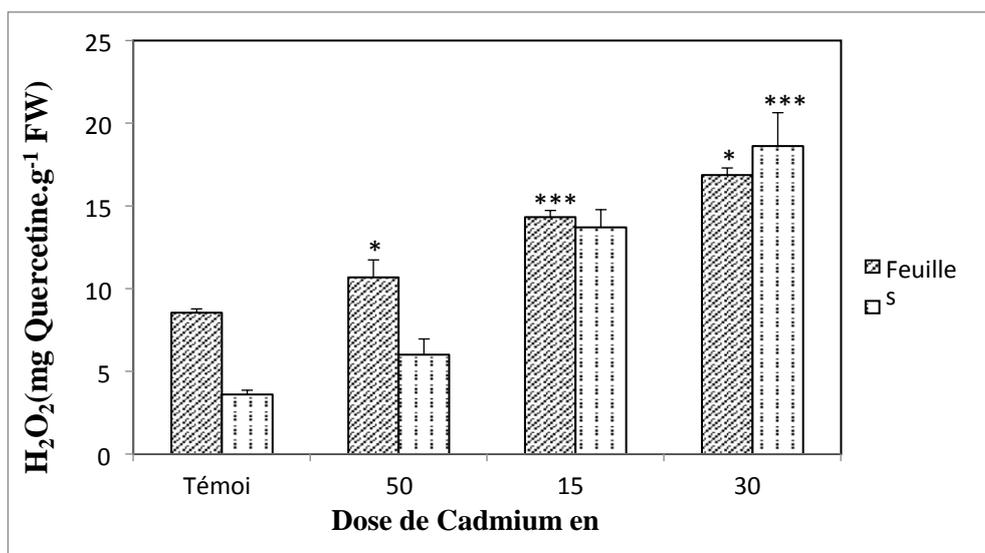
Nous avons enregistré une augmentation significative en teneur de la malondialdéhyde MDA et peroxyde d'hydrogène H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> avec une forte corrélation positive ( $r = 0,785$ ), ( $r = 0,785$ ) pour lesfeuilles et très forte corrélation positive ( $r = 0,963$ ) pour les racines, respectivement.

La comparaison des moyennes de la teneur en malondialdéhyde et peroxyde d'hydrogène en feuilles (test de Tukey) montre qu'une différence significative de la moyenne à la concentration 300 ppm par rapport au témoin. Par contre dans les racines cette comparaison est hautement significative pour l'ensemble des concentrations par rapport au témoin.



**Figure 25.** Effet de Cd (50, 150, 300 ppm) sur la teneur en malondialdéhyde (MDA).

Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  (SD) de 3 répétitions. Les nombres suivis de \*, \*\* et \*\*\* sont statistiquement différents du contrôle à  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  et  $p < 0,001$ , respectivement, selon le test de Tukey.



**Figure 26.** Effet de Cd (50, 150, 300 ppm) sur la teneur en peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  (SD) de 3 répétitions. Les nombres suivis de \*, \*\* et \*\*\* sont statistiquement différents du contrôle à  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  et  $p < 0,001$ , respectivement, selon le test de Tukey.

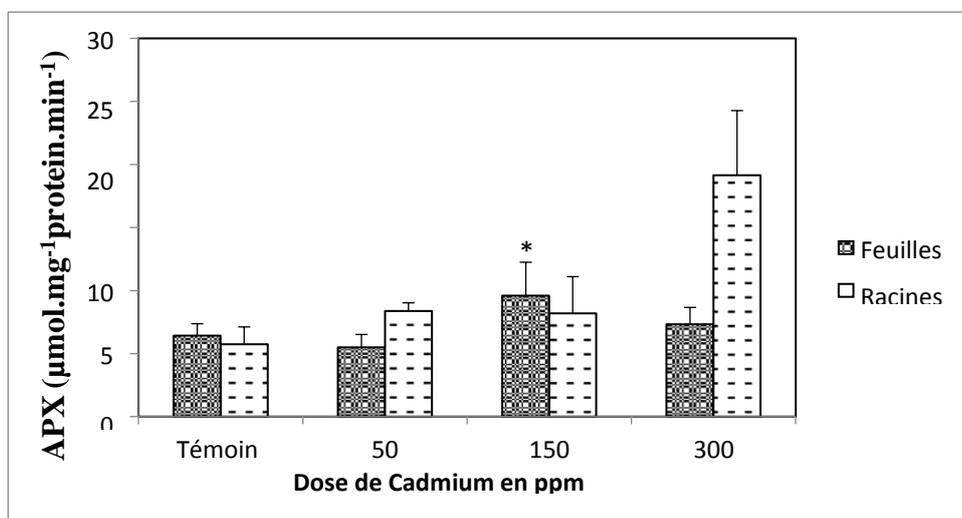
## 1.5 Effets du traitement au Cd sur l'activité des enzymes antioxydants :

### 1.5.1 Effets du traitement au Cd sur l'activité d'ascorbate peroxydase :

Le stress dû au Cd a eu un effet significatif sur les activités des enzymes antioxydants dans les feuilles et les racines du soja. Dans l'ensemble, l'activité de l'APX a augmenté de manière

dose-dépendante, le maximum de l'activité de l'APX dans les feuilles et les racines ayant été enregistré avec l'application de 150 et 300 ppm de Cd, respectivement (**Figure 27**). Avec une faible corrélation positive ( $r = 0,489$ ) pour les feuilles et une moyenne corrélation positive ( $r = 0,606$ ) pour les racines.

La teneur en Ascorbate peroxydase varie positivement aux concentrations appliquées, la variation globale est déterminée de 23,9 % de l'ensemble de nos échantillons pour les feuilles contre une variation importante de 36,7% pour les racines. La comparaison des moyennes de L'Ascorbate peroxydase en racines (test de Tukey) qui montre qu'une différence significative de la moyenne de l'Ascorbate peroxydase à la concentration 300 ppm par rapport au témoin. Par contre la comparaison des autres moyennes par rapport au témoin était non significative.

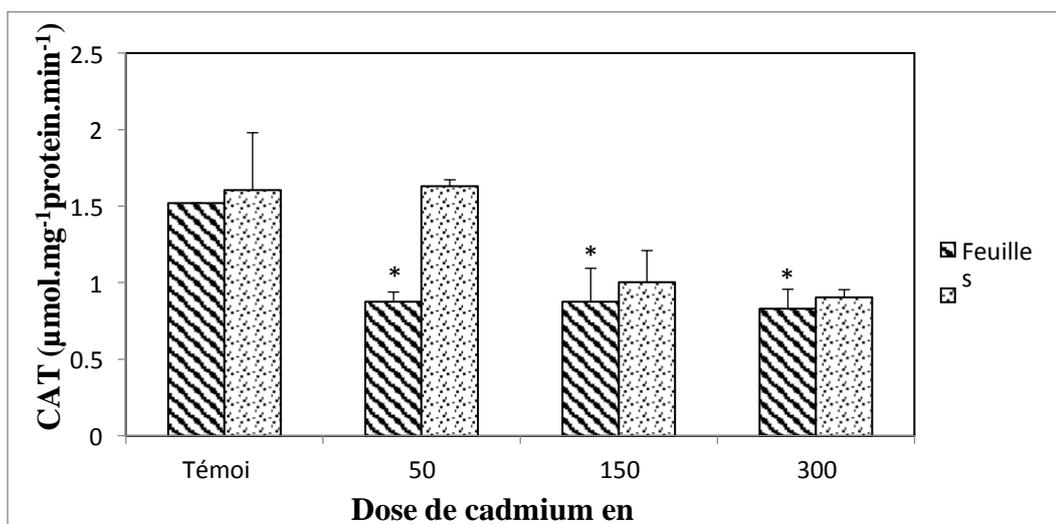


**Figure 27.** Effet de Cd (50, 150, 300 ppm) sur l'activité de l'APX.

Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  (SD) de 3 répétitions. Les nombres suivis de \*, \*\* et \*\*\* sont statistiquement différents du contrôle à  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  et  $p < 0,001$ , respectivement, selon le test de Tukey.

### 1.5.2 Effets du traitement au Cd sur l'activité de catalase :

Cependant, CAT est une enzyme clé pour l'élimination de l' $H_2O_2$  générés dans les peroxysomes par les oxydases impliquées dans la  $\beta$ -oxydation des acides gras, la photorespiration et le catabolisme des purines. L'activité de catalase a diminué dans les feuilles et les racines. 58% ont été enregistré sous concentrations 50, 150 ppm et 55% sous 300 ppm, respectivement. Pour les racines l'activité de CAT diminué pour atteindre 63, 58 % sous 150, 300 ppm. La diminution maximale ayant été enregistrée à moins de 300 ppm Cd (**Figure 28**)



**Figure 28.** Effet de Cd (50, 150, 300 ppm) sur l'activité de catalase.

Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  (SD) de 3 répétitions. Les nombres suivis de \*, \*\* et \*\*\* sont statistiquement différents du contrôle à  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  et  $p < 0,001$ , respectivement, selon le test de Tukey.

### 1.5.3 Effets du traitement au Cd sur l'activité de peroxydase :

Une augmentation significative de l'activité POD des feuilles a été observée en réponse au stress du Cd et l'augmentation maximale a été enregistrée lorsque le soja a été exposé à 300 ppm de Cd. L'activité du POD dans les racines a diminué de manière significative de 50 et 150 ppm de Cd (**Figure 29**).

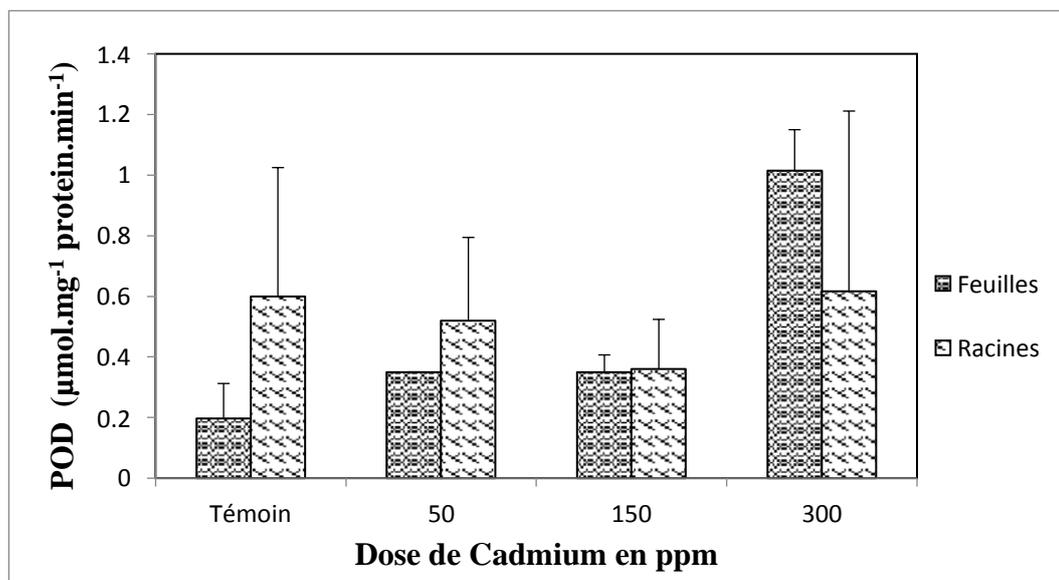
Les résultats statistiques obtenus montrent une variation non significative de la peroxydase en fonction des concentrations appliquées du Cadmium avec une moyenne corrélation positive ( $r = 0,785$ ) pour les feuilles et très faible corrélation positive ( $r = 0,011$ ) pour les racines.

La teneur en peroxydase varie légèrement aux concentrations appliquées, la variation globale est déterminée de 33,1 % de l'ensemble de nos échantillons, par contre aucun changement important n'est noté au niveau des racines.

Le taux de la peroxydase en feuilles chute de 307 % pour la dose de 50 ppm à 146 % pour 150 ppm pour croître de nouveau à 814 % pour la dose de 300 ppm, qui signifie que la teneur peroxydase dans les feuilles ne croît pas proportionnellement avec les concentrations du stress appliqué.

Le taux de la peroxydase en racines chute de 87% pour la dose de 50 ppm à 60% pour 150 ppm pour afficher un taux de 103 % pour la dose de 300 ppm, qui signifie que la peroxydase dans

les racines ne croit pas proportionnellement avec les concentrations du stress appliqué.



**Figure29.** Effet de Cd (50, 150, 300 ppm) sur l'activité de peroxyde.

Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  (SD) de 3 répétitions. Les nombres suivis de \*, \*\* et \*\*\* sont statistiquement différents du contrôle à  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  et  $p < 0,001$ , respectivement, selon le test de Tukey.

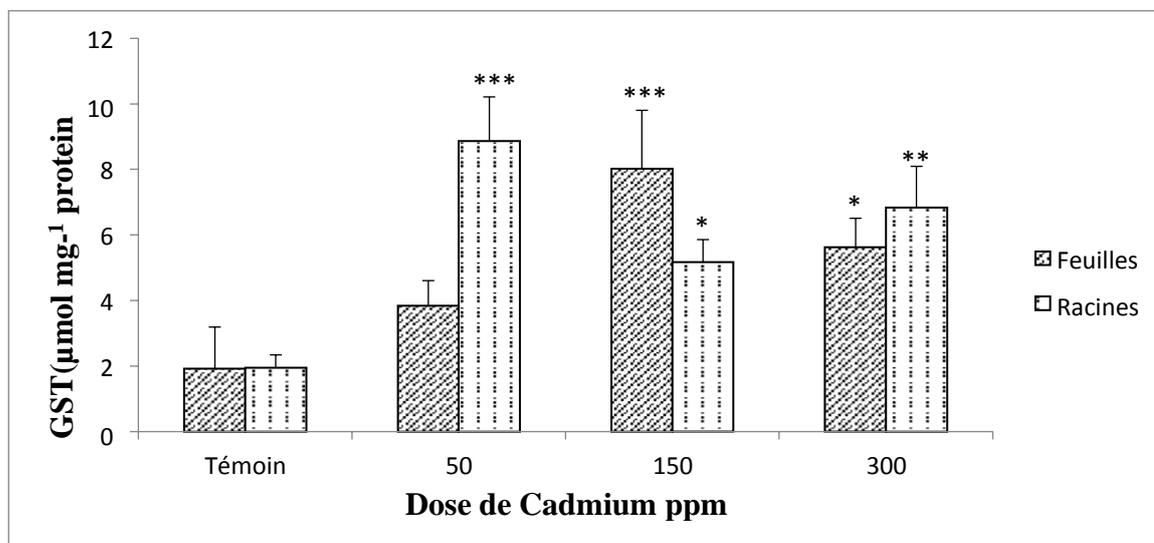
#### 1.5.4 Effets du traitement au Cd sur l'activité de Glutathion S- transférases

Le traitement au Cd a provoqué une augmentation significative de l'activité de l'enzyme GST dans les deux tissus du soja (**Figure.30**).

La teneur de la Glutathion S-transférase varie positivement aux concentrations appliquées, la variation globale est déterminée de 48 % de l'ensemble de nos échantillons pour les feuilles contre une variation importante de 12,2 % pour les racines.

La comparaison des moyennes de la Glutathion S-transférase en feuilles (Test de Tukey) montre qu'une différence significative de la moyenne de la Glutathion S-transférase aux concentrations 150 et 300 ppm par rapport au témoin. Par contre dans les racines cette comparaison était significative uniquement pour la concentration de 50 ppm par rapport au témoin.

L'augmentation maximale des feuilles et des racines a été enregistrée lorsque le soja a été traité avec 150 et 50 ppm de Cd, respectivement. Malgré la diminution de l'activité de la GST dans les racines en dessous de 150 et 300 ppm, elle est restée supérieure à celle du témoin.

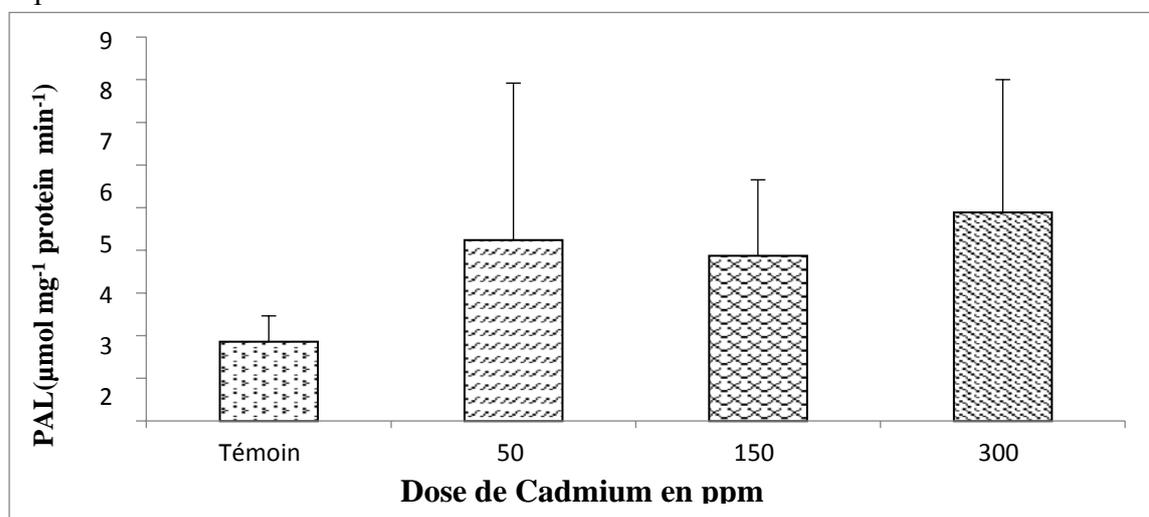


**Figure 30.** Effet de Cd (50, 150, 300 ppm) sur l'activité de la Glutathion S-transférases.

Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  (SD) de 3 répétitions. Les nombres suivis de \*, \*\* et \*\*\* sont statistiquement différents du contrôle à  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  et  $p < 0,001$ , respectivement, selon le test de Tukey.

### 1.5.5 Effets du traitement au Cd sur l'activité de phénylalanine amonalyse :

D'autre part, l'activité du PAL a été déterminée dans le surnageant des feuilles. Elle a augmenté de manière significative ( $p < 0,05$ ) de 128%, 108% ou 163% après 10 jours de traitement avec 50, 150 ou 300 ppm de Cd, respectivement (**Figure 31**). Les résultats statistiques concluent que le stress lié au Cadmium sur la (PAL) de notre écotype est non significatif ( $\text{Sig} = 0,188$ ) avec une faible corrélation positive ( $r = 0,408$ ). Une augmentation des moyennes de PAL est estimée à 16%, ce qui confirme que la partie foliaire de la plante stressée n'a pas été perturbée dans l'absorption de l'eau.



**Figure 31.** Effet de Cd (50, 150, 300 ppm) sur l'activité de phénylalanine ammonia lyse.

Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  (SD) de 3 répétitions. Les nombres suivis de \*, \*\* et \*\*\* sont statistiquement différents du contrôle à  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  et  $p < 0,001$ , respectivement, selon le test de Tukey.

## 1.6 Effets du traitement au Cd sur les métabolites antioxydants

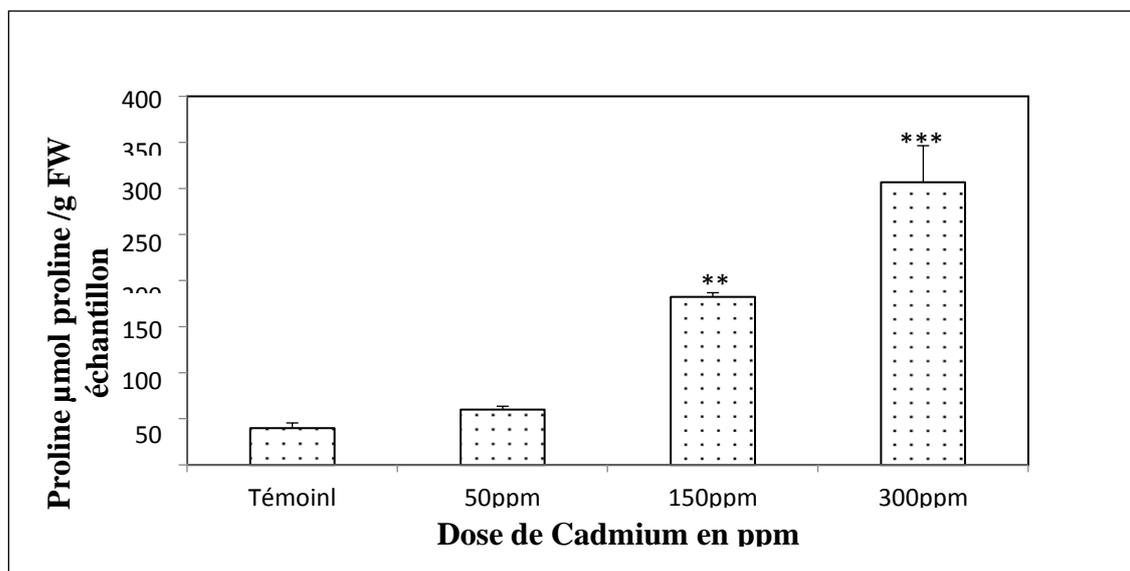
### 1.6.1 Effets du traitement au Cd sur la teneur en proline

Il ressort du (**Figure.32**) que l'exposition au Cd a entraîné une augmentation significative avec une forte corrélation positive ( $r = 0,951$ ) de la teneur en proline dans les feuilles de soja. L'augmentation maximale a été de 668% enregistrée à la concentration maximale de 300 ppm de Cd par rapport aux plantes non traitées.

La teneur en proline varie positivement aux concentrations appliquées, la variation globale en teneur de proline est déterminée de 90,9 % de l'ensemble de nos échantillons.

Le taux de la teneur en proline passe de 150% pour la dose de 50 ppm à 456% pour 150 ppm pour afficher un taux de 668% pour la dose de 300 ppm, qui signifie que la teneur en proline croît proportionnellement avec les concentrations du stress appliqué.

La comparaison des moyennes (test de Tukey) montre qu'une différence hautement significative de la moyenne de la proline aux concentrations (150 et 300 ppm) par rapport au témoin.



**Figure 32.** Effet de Cd (50, 150, 300 ppm) sur la teneur en proline.

Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  (SD) de 3 répétitions. Les nombres suivis de \*, \*\* et \*\*\* sont statistiquement différents du contrôle à  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  et  $p < 0,001$ , respectivement, selon le tukey.

### 1.6.2 Effets du traitement au Cd sur la teneur en ascorbate (AsA)

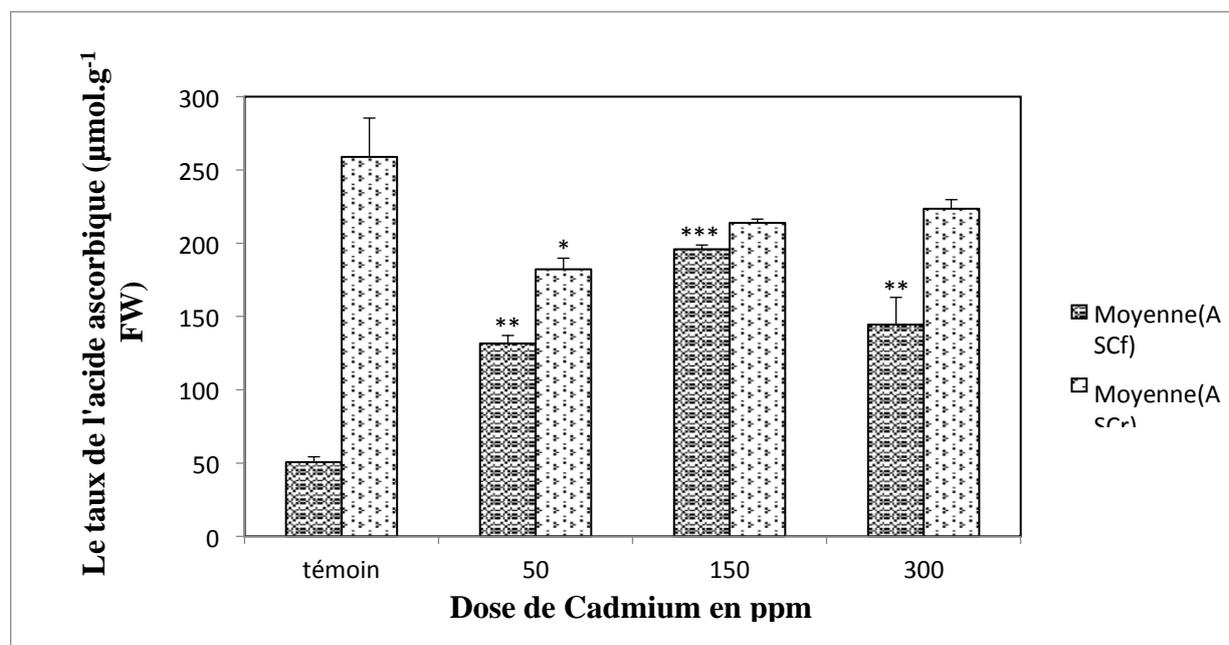
Nos résultats ont révélé que le stress du Cd affecte les teneurs en AsA dans les deux organes du soja (**Figure 33**). Dans les racines, la teneur en AsA a diminué d'une façon significative de 30

%,17 % et 14 % avec 50, 150 et 300 ppm de Cd, respectivement, par rapport au témoin, avec une faible corrélation négative ( $r = -0,285$ ).

L'exposition aux concentrations de Cd a augmenté significativement les teneurs en AsA dans les feuilles de soja avec une forte corrélation positive ( $r = 0,736$ ). Des concentrations de Cd de 50, 150 et 300 ppm augmentent le niveau d'AsA de 160, 287 et 185 %, respectivement, par rapport au témoin.

Le taux de la production du AsA en feuilles croît de 260 % pour la dose de 50 ppm à 313 % pour 150 ppm pour chuter à un taux de 285 % pour la dose de 300 ppm, qui signifie que la production du AsA dans les feuilles augmente proportionnellement avec les concentrations du stress appliqué, sauf que notre écotype n'a pu s'adapter avec la dose de 300 ppm.

Le taux de la production de l'AsA en racines décroît à 70 % pour la dose de 50 ppm par rapport au témoin, pour atteindre (83 % ,86%) pour (150 et 300ppm) respectivement, qui signifie que la production de l'AsA dans les racines ne varie pas proportionnellement avec les concentrations du stress appliqué.



**Figure 33.** Effet de Cd (50, 150, 300 ppm) sur le taux de l'acide ascorbique.

Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  (SD) de 3 répétitions. Les nombres suivis de \*, \*\* et \*\*\* sont statistiquement différents du contrôle à  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  et  $p < 0,001$ , respectivement, selon le test de Tukey.

## 1.7 Effets du traitement au Cd sur les thiols (GSH ; NPTH et PC)

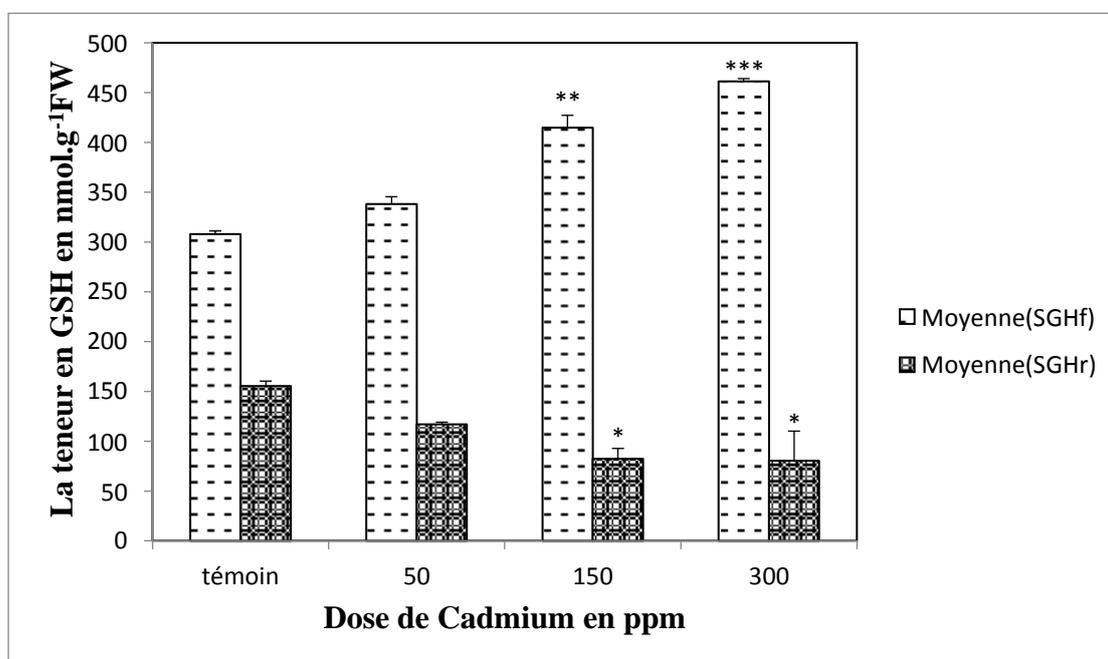
### 1.7.1 Effets du traitement au Cd sur la teneur en GSH

La teneur en GSH dans les deux organes du soja exposé au Cd (Fig.29a-c) a présenté une tendance contrastée.

Par rapport au témoin, la teneur en GSH a augmenté significativement de 25, 47 et 48 % à 50, 150 et 300 ppm de Cd dans les feuilles après 10 jours de traitement, respectivement (**Figure 34**) avec une forte corrélation positive ( $r = 0,890$ ). Qui signifie que la production du SGH dans les feuilles augmente proportionnellement avec les concentrations du stress appliqué.

Les teneurs en GSH dans les racines ont diminué de manière significative en même temps que les teneurs en Cd ont augmenté, avec une baisse maximale de 48 % lorsque les plantes ont été exposées à 300 ppm de Cd. Cette diminution a une forte corrélation négative ( $r = - 0,984$ ) pour les racines.

La teneur en GSH varie positivement aux concentrations appliquées, la variation globale est déterminée de 79,2% de l'ensemble de nos échantillons pour les feuilles contre un changement inverse important de 96,3% pour les racines.



**Figure 34.** Effet de Cd (50, 150, 300 ppm) sur la teneur en GSH.

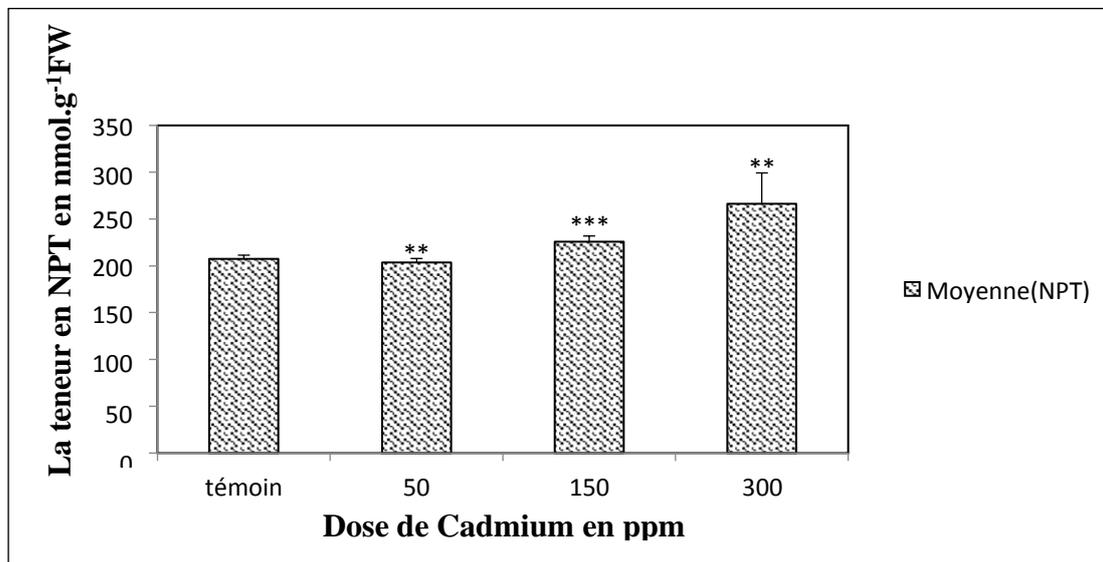
Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  (SD) de 3 répétitions. Les nombres suivis de \*, \*\* et \*\*\* sont statistiquement différents du contrôle à  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  et  $p < 0,001$ , respectivement, selon le test de Tukey.

### 1.7.2 Effets du traitement au Cd sur la teneur en NP-TH

La **Figure 35** montre que la concentration de TNP-SH dans les racines de soja a augmenté de 28 % à 300 ppm de Cd, par rapport au témoin. Une augmentation significative en teneur du NPT en fonction des concentrations appliquées du Cadmium avec une forte corrélation positive ( $r = 0,736$ ). La teneur en NPT varie légèrement aux concentrations appliquées, la variation globale en teneur du NPT est déterminée de 54,1 % de l'ensemble de nos échantillons.

Le taux de la teneur en NPT passe de 98 % pour la dose de 50 ppm à 108 % pour 150 ppm

pour afficher un taux de 128 % pour la dose de 300 ppm, qui signifie que la teneur en NPT croit proportionnellement avec les concentrations du stress appliqué. La comparaison des moyennes (test de Tukey) montre qu'une différence hautement significative de la moyenne du NPT aux différentes concentrations par rapport au témoin.



**Figure 35.** Effet de Cd (50, 150, 300 ppm) sur la teneur en NPT.

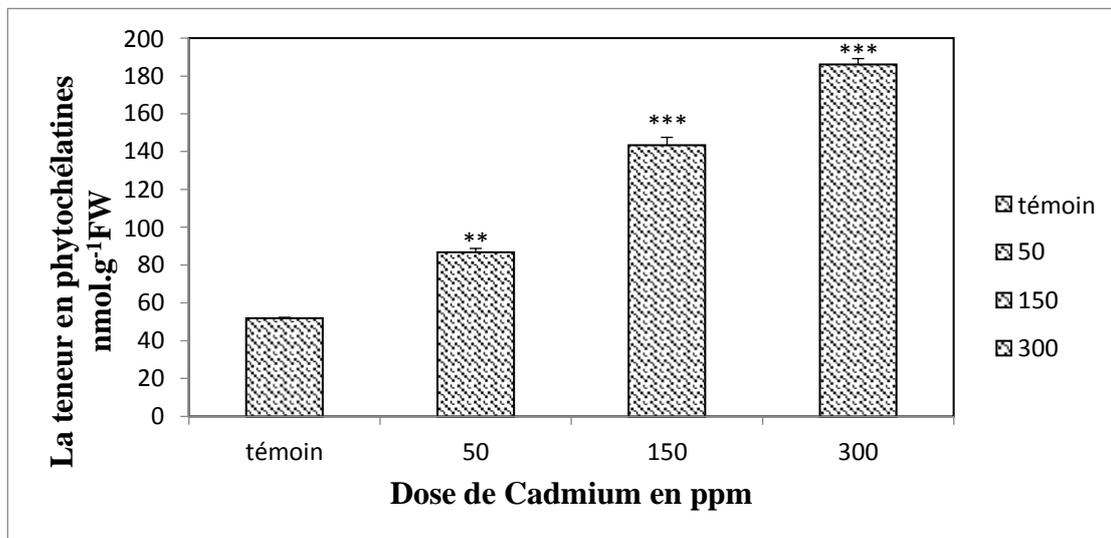
Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  (SD) de 3 répétitions. Les nombres suivis de \*, \*\* et \*\*\* sont statistiquement différents du contrôle à  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  et  $p < 0,001$ , respectivement, selon le test de Tukey

### 1.7.3 Effets du traitement au Cd sur la teneur en phytochélatines :

Le traitement au Cd a induit une accumulation massive (**Figure 36**) hautement significative en teneur du PC par rapport au témoin, avec une forte corrélation positive ( $r = 0,996$ ).

Les niveaux de PC dans les racines étaient 359 % plus élevés que ceux du témoin lorsque les plantes étaient traitées avec 300 ppm de Cd. La teneur en PC varie positivement aux concentrations appliquées, la variation globale en teneur du PC est déterminée de 99,1 % de l'ensemble de nos échantillons.

Le taux de la teneur en PC passe de 167% pour la dose de 50 ppm à 276 % pour 150 ppm pour afficher un taux de 359 % pour la dose de 300 ppm, qui signifie que la teneur en PC croit proportionnellement avec les concentrations du stress appliqué. La comparaison des moyennes (Test de Tukey) montre qu'une différence hautement significative de la moyenne du PC aux différentes concentrations par rapport au témoin.



**Figure 36.** Effet de Cd (50, 150, 300 ppm) sur la teneur en PC.

Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  (SD) de 3 répétitions. Les nombres suivis de \*, \*\* et \*\*\* sont statistiquement différents du contrôle à  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  et  $p < 0,001$ , respectivement, selon le test de Tukey.

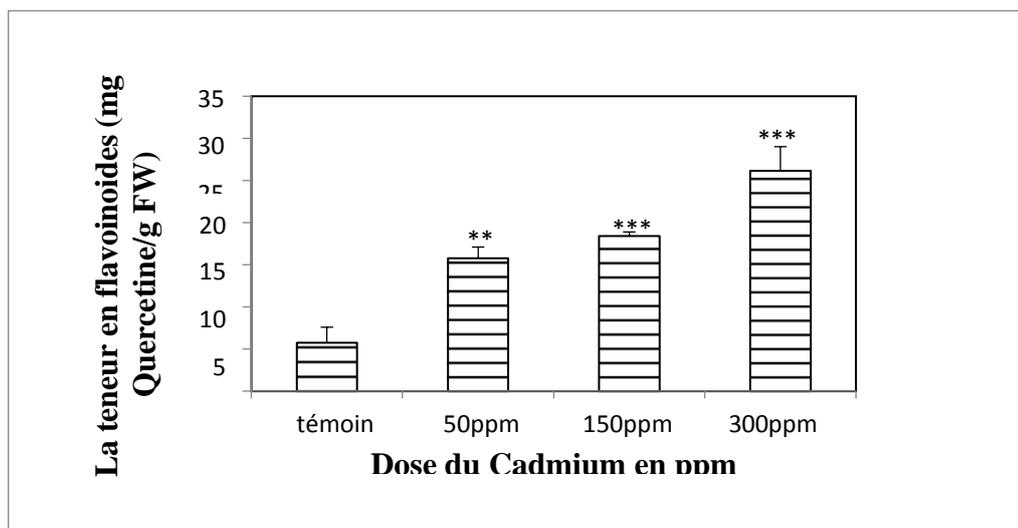
## 1.8 Effets du traitement au Cd sur les flavonoïdes, le phénol total et la DPPH :

### 1.8.1 Effets du traitement au Cd sur les flavonoïdes

Les résultats statistiques présentent une augmentation hautement significative en teneur du flavonoïde en fonction des concentrations appliquées du cadmium avec une forte corrélation positive ( $r = 0,958$ ). Le stress du Cd a augmenté la teneur en flavonoïdes de 174 %, 219 % et 354 % avec 50 ppm, 150 ppm et 300 ppm par rapport aux plantes témoins (**Figure 37**).

La teneur en flavonoïde varie positivement aux concentrations appliquées, la variation globale en teneur de flavonoïde est déterminée de 91,8 % de l'ensemble de nos échantillons. Le taux de la teneur en flavonoïde passe de 274% pour la dose de 50 ppm à 319% pour 150 ppm pour afficher un taux de 435 % pour la dose de 300 ppm, qui signifie que la teneur en proline croît proportionnellement avec les concentrations du stress appliqué.

La comparaison des moyennes (Test de Tukey) montre qu'une différence hautement significative de la moyenne du flavonoïde aux différentes concentrations par rapport au témoin.



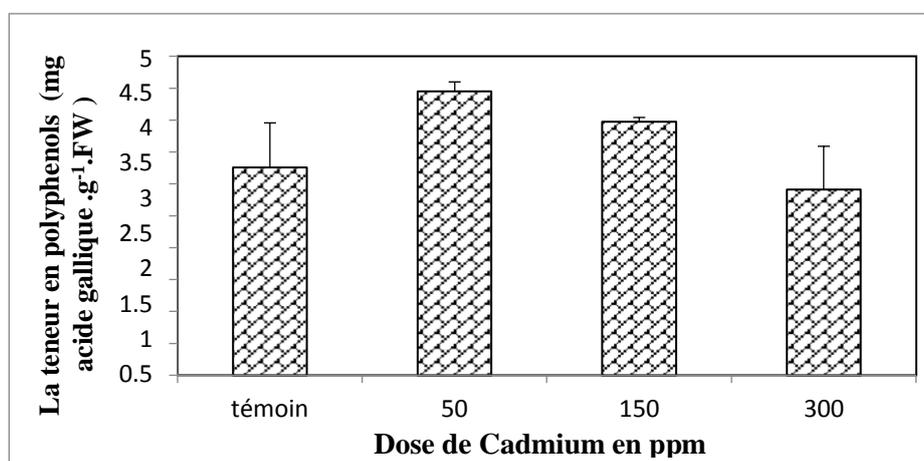
**Figure 37.** Effet de Cd (50, 150, 300 ppm) sur la teneur en flavonoïdes.

Les valeurs sont des moyennes  $\pm$ (SD) de 3 répétitions. Les nombres suivis de \*, \*\* et \*\*\* sont statistiquement différents du contrôle à  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  et  $p < 0,001$ , respectivement, selon le test de Tukey.

### 1.8.2 Effets du traitement au Cd sur les phénols

De même, la teneur totale en phénols a augmenté de 37, 22 % avec 50 et 150 ppm de traitement au Cd, mais a diminué de 11 % avec 300 ppm de Cd par rapport aux plantes témoins (Figure 38).

L'augmentation de la teneur en phénols est une variation non significative des polyphénols en fonction des concentrations appliquées du Cadmium avec une faible corrélation négative ( $r = -0,369$ ). Le stress appliqué a provoqué une diminution des polyphénols soit 13,6%. La comparaison des moyennes (test de Tukey) montre qu'une différence significative de la moyenne des polyphénols aux différentes concentrations par rapport au témoin.



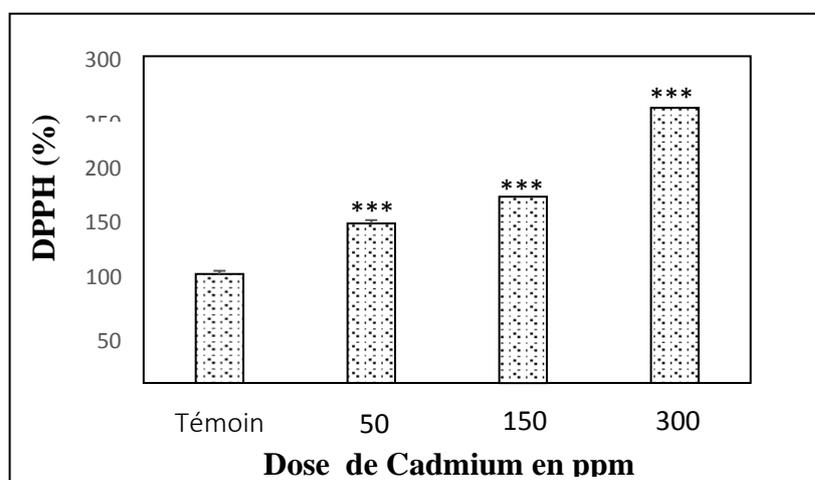
**Figure 38.** Effet de Cd (50, 150, 300 ppm) sur la teneur en phénols.

Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  (SD) de 3 répétitions. Les nombres suivis de \*, \*\* et \*\*\* sont statistiquement différents du contrôle à  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  et  $p < 0,001$ , respectivement, selon le test de Tukey.

**1.9 Effets du traitement au Cd sur DPPH :**

L'exposition au Cd a induit une plus grande capacité antioxydant, exprimée en activité DPPH dans les feuilles de soja (**Figure 39**). Le traitement au Cd augmente l'activité de la DPPH de 46 %, 71 % et 152 % avec 50, 150 et 300 ppm de Cd, respectivement, par rapport au contrôle.

Nous avons noté une augmentation hautement significative du DPPH en fonction des concentrations appliquées du Cadmium. La comparaison des moyennes (Test de Tukey) montre qu'une différence significative de la moyenne de DPPH aux différentes concentrations par rapport au témoin.

**Figure 39.** Effet de Cd (50, 150, 300 ppm) sur la capacité antioxydante (DPPH).

Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  (SD) de 3 répétitions. Les nombres suivis de \*, \*\* et \*\*\* sont statistiquement différents du contrôle à  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  et  $p < 0,001$ , respectivement, selon le test de Tukey.

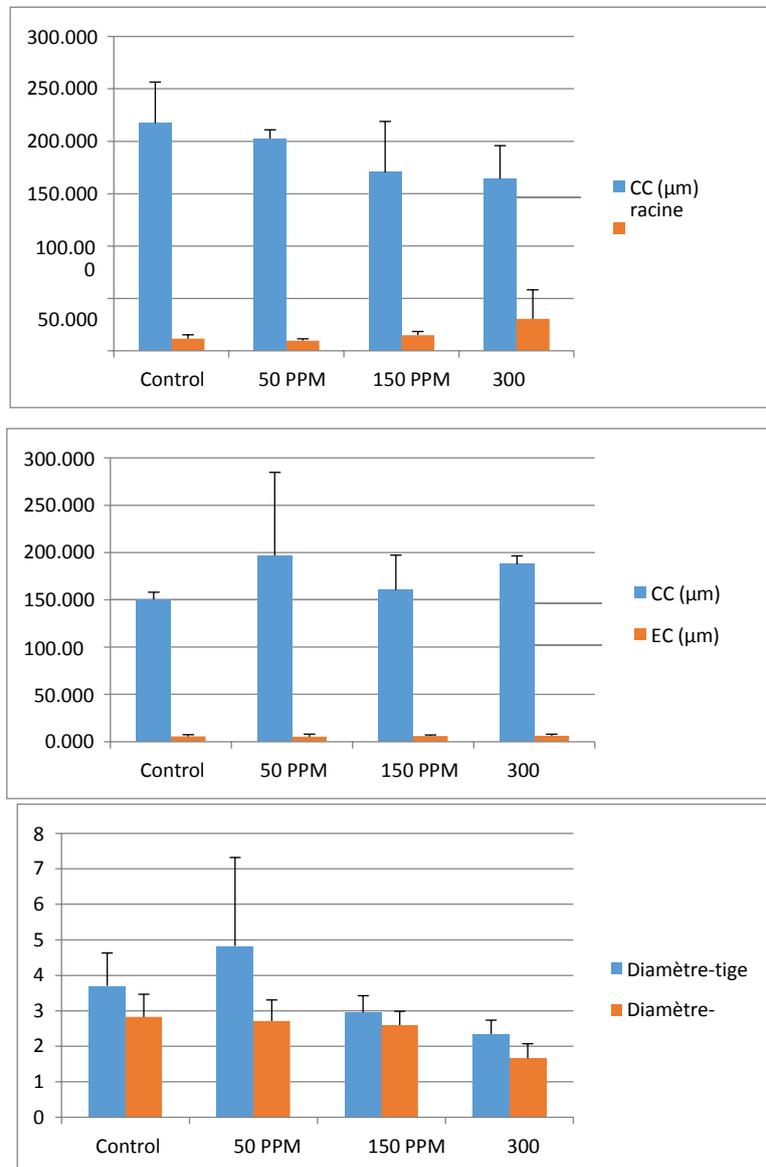
**1.10 Effets du traitement au Cd sur l'anatomie du soja : (Figure 40)**

**Tableau 5:** Impact du traitement au cadmium sur les paramètres anatomiques de racine et tige de Glycine max L. traité avec diverses concentrations de cadmium.

PARAMETRES ANATOMIQUES	TÉMOIN	50 PPM	150 PPM	300 PPM
CC ( $\mu\text{m}$ )-tige	150,27 $\pm$ 7,766a	160,55 $\pm$ 36,85a	187,66 $\pm$ 8,73a	196,88 $\pm$ 87,80a
EC ( $\mu\text{m}$ )-tige	5,22 $\pm$ 2,80a	5,65 $\pm$ 1,85a	6,05 $\pm$ 1,13a	6,21 $\pm$ 1,82a
CC ( $\mu\text{m}$ ) racine	217,21 $\pm$ 39,30a	202,68 $\pm$ 8,30a	170,11 $\pm$ 48,60a	164,16 $\pm$ 31,70a
EC ( $\mu\text{m}$ ) racine	11,60 $\pm$ 3,70a	9,80 $\pm$ 1,72a	15,07 $\pm$ 3,40a	30,48 $\pm$ 27,70a
D(MX) Tige	3,70 $\pm$ 1,82ab	4,82 $\pm$ 2,49b	2,95 $\pm$ 0,47a	2,34 $\pm$ 0,39a

<b>D (MX) Racine</b>	2,82 ±0,70b	2,71±0,59b	2,59±0,38b	1,66±0,41a
----------------------	-------------	------------	------------	------------

**Remarques :** Les données sont rapportées sous la forme Moyenne ± SD avec n = 3 et n=10. a et b indiquent des comparaisons multiples de  $p < 0,05$  à chaque niveau. La même lettre signifie aucune différence significative, tandis que la lettre différente indique une différence significative entre différents plants utilisant ANOVA.



**Figure 40.** Effet de Cd sur l'anatomie des plants de soja.

Les données sont des moyennes ± erreur standard de trois répétitions du diamètre total de la section (μm) et le diamètre du cortex et de la stèle (μm) et dix répétitions du diamètre des vaisseaux du métaxylème. Les barres suivies des différentes lettres sont différentes à  $P < 0,05$ .

## 1.11 Effet sur l'anatomie de la racine :

### 1.11.1 Effet du stress métallique sur la structure anatomique de la racine :

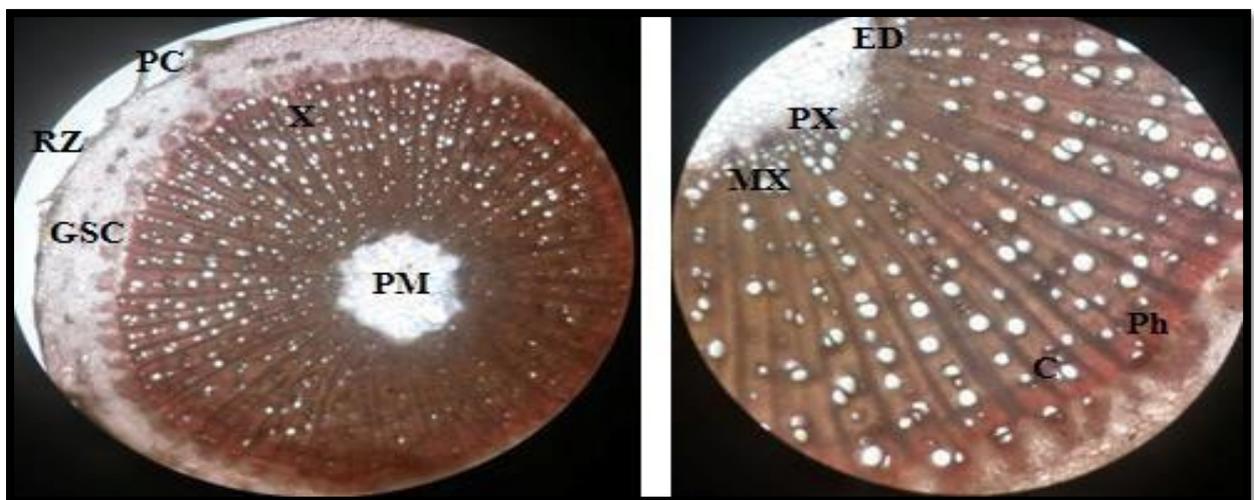
La comparaison des coupes anatomiques réalisées au niveau des racines témoins et des

racines stressées montre une existence des mêmes structures histologiques énumérées ci-dessus ainsi une diminution de l'épaisseur de la racine stressée par rapport à celle du témoin. Ceci est confirmé par les mesures du diamètre total ( $P < 0.05$ ). Un rétrécissement de la stèle chez la racine stressée se traduisant par un élargissement de l'écorce (**Figure 42(A1) ,43(A2) ,44(A3) ,45(A5)**).

Ceci est démontré par les mesures du diamètre de la stèle ( $P < 0.05$ ), ainsi une diminution du diamètre des vaisseaux du xylème, notamment ceux du métaxylème, avec épaissement de la paroi. Ceci est également vérifié statistiquement ( $P < 0.05$ ). Il est à noter chez la racine stressée une présence marquée de fibres sclérenchymateuses et une lignification du centre de la racine.

Le cortex de la jeune racine témoin était constitué de 7 ou 8 couches avec des cellules de parenchyme à paroi mince et de petits espaces intercellulaires (**Figure 42 (C1)**). Péricycle unisériée constitué de cellules de parenchyme à paroi mince. Les tissus vasculaires primaires étaient représentés par quatre groupes de phloème alternant avec quatre brins de xylème où les éléments protoxylèmes étaient disposés vers le péricycle, et les éléments méta xylèmes occupaient le centre de la racine (**Figure 42(C1)**). Dans les racines traitées au Cd, le diamètre a été augmenté et les tissus vasculaires ont été nettement affectés. Les éléments métaxylèmes présentaient une hypertrophie (**Figure 43 (C2) et 44 (C3)**).

Les éléments du protoxyle ont été effacés par un contenu sombre (**Figure 44(B3)**) ; les parois du protoxyle ont été épaissies de manière différenciée. L'hypertrophie du phloème rendait sa reconnaissance difficile. Le péricycle présentait une division cellulaire précoce, donnant naissance à de nouvelles couches cellulaires. Dans la surface totale des racines traitées était nettement supérieure à celle des racines témoins. Le diamètre majeur de la racine traitée était une conséquence de la plus grande taille du cylindre vasculaire et de la zone du cortex. L'augmentation du cortex a été causée par une augmentation de la surface des cellules parenchymateuses corticales.



**Figure 41.** Coupe transversale d'une Racine de *Glycine max (L.) Mer.*

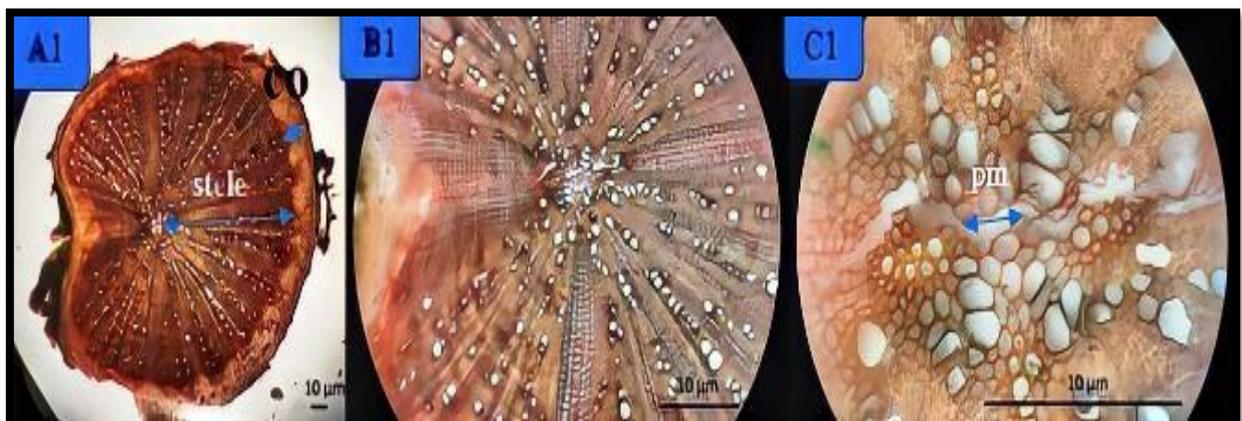
Rz : rhizoderme, PM : parenchyme médullaire, Ed : endoderme, Pc : parenchyme cortical, GSC : gaine sclérenchymateuse, C : cambium, X : xylème, PX : protoxylème. MX : métaxylème, Ph : phloème.

Les coupes effectuées au niveau des racines de la plante (**Figure 42**) ont mis en évidence une structure histologique caractéristique des racines des dicotylédones, présentant de l'extérieur vers l'intérieur l'existence de deux zones principales.

L'écorce : cette partie est constituée du rhizoderme, assise pilifère de cellules rhizodermiques portant les poils absorbants ; d'un parenchyme cortical, formé de cellules épaisses, jointives, allongées dans le sens de l'axe de la racine. Plus profondément s'ajoute un cadre subérifié, autrement dit la dernière couche de cellules de parenchyme cortical, et forme une sorte de barrière de contrôle des molécules circulant dans la racine, c'est l'endoderme (couche peu claire sur la figure).

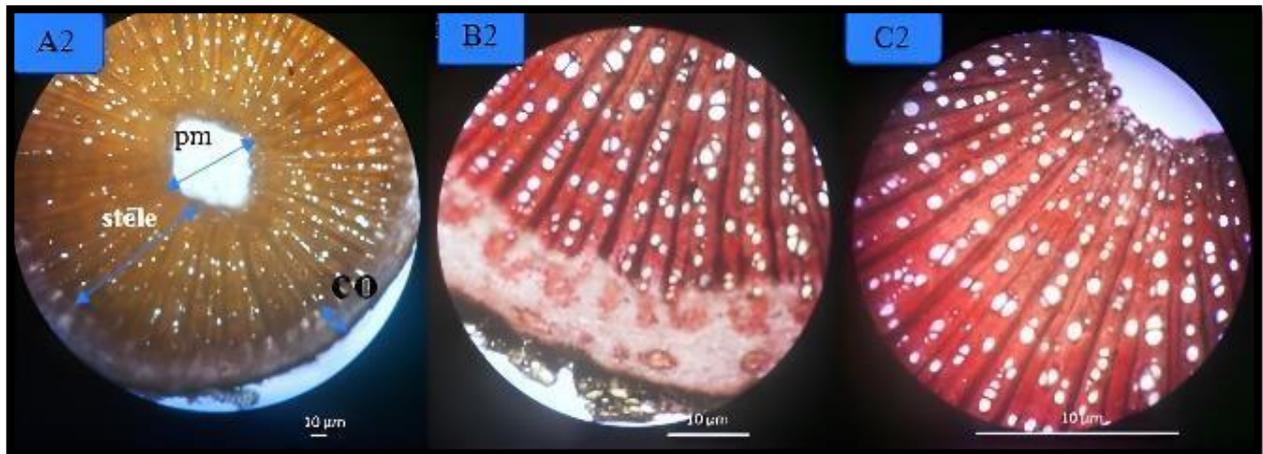
Le cylindre central (Stèle) : de type actinostèle, cette partie renferme l'endoderme couche de cellules étroitement jointives entourant le péricycle. Les parois tangentiellles externes et internes de ces cellules sont cellulósiques, tandis que les autres possèdent une bande imprégnée de subérine, substances entre l'écorce et les tissus conducteurs. Le péricycle est formé par une couche de cellules jointives à paroi mince, à partir de laquelle vont se former les ramifications de la racine. Plus au centre, viennent les deux types des tissus conducteurs, le xylème et le phloème qui s'alternent régulièrement sur un seul cercle, et assurent la circulation de la sève brute (xylème) et la sève élaborée (phloème).

Les cellules de xylème ont des tailles différentes selon leur emplacement dans le cylindre central. Prés du péricycle, elles sont jeunes et petites (protoxylème) . Vers le centre, elles sont grandes et â gées (métaxylème). La différenciation du xylème est centripète. Des fibres du sclérenchyme se localisent au tour des vaisseaux conducteurs. Enfin, au centre de la racine, la moelle, composée de parenchyme médullaire qui a une fonction de remplissage (**Figure 41**).



**Figure 42.** Coupe transversale de la racine témoin

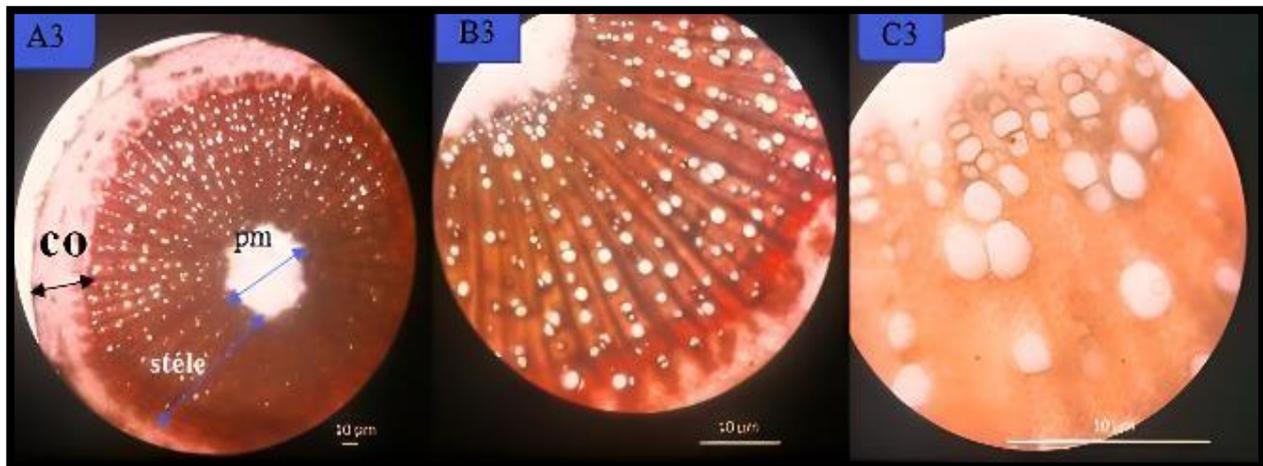
(A1):(Gx4),( B1 ):(Gx10), (C1 ):(Gx40) : Structure microscopique détaillée d'une portion de la



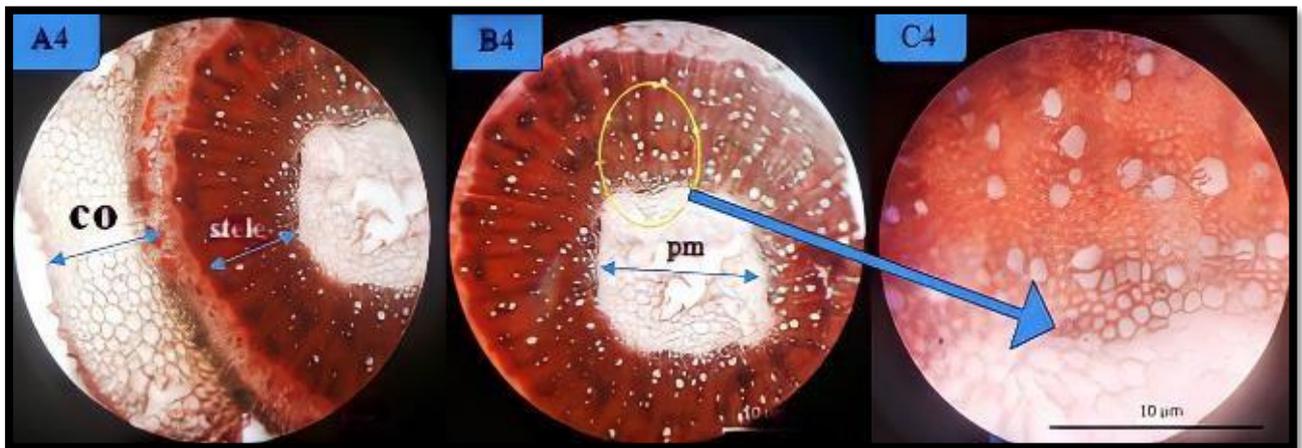
coupe transversale de la racine témoin.

**Figure 43.** Coupe transversale d'une racine stressée à 50 ppm.

(A2): (Gx4), (B2) : (Gx10), (C2) : (G x40) : Structure microscopique détaillée de la coupe transversale d'une racine stressée à 50 PPM.

**Figure 44.** Coupe transversale d'une racine stressée à 150 ppm

(A3) : (Gx4),(B3) :(Gx10), (C3) :(G x40) : Structure microscopique détaillée de la coupe transversale d'une racine stressée à 150 PPM.



**Figure 45.** Coupe transversale d'une racine stressée à 300 ppm.

**A4.** (Gx4), **(B4)** : (Gx10), **(C4)** : (G x40) : Structure microscopique détaillée de la coupe transversale d'une racine stressée à 300 PPM.

### 1.11.2 Effet du stress métallique sur la structure anatomique de la tige :

En coupe anatomique, la tige se distingue par deux parties : l'écorce (parenchyme cortical) et le cylindre central. Dans une tige de dicotylédone, les tissus conducteurs de sève sont disposés sur un seul cercle regroupant des structures élémentaires appelées faisceaux cribro-vasculaires (fcv) ou libéroligneux. Ces derniers regroupent le phloème primaire et le xylème primaire séparés par le cambium, couche de cellules non différenciées ou embryonnaires dont le fonctionnement est bloqué. Elles ne reprendront leur activité que durant l'élaboration des structures secondaires

L'observation des coupes transversales de jeunes tiges de soja, montre que leur structure anatomique se rapproche étroitement de celle des racines, elle comprend : L'épiderme, formée d'une assise de cellules jointive, dépourvue de chloroplastes, dont la face externe est recouverte d'une fine cuticule pourvue de stomates. L'écorce (parenchyme cortical), relativement réduite et composée de grandes cellules polyédriques, laissant entre elles des méats.

En coupe anatomique, la tige se distingue par deux parties : l'écorce (parenchyme cortical) et le cylindre central. Dans une tige de dicotylédone, les tissus conducteurs de sève sont disposés sur un seul cercle regroupant des structures élémentaires appelées faisceaux cribro-vasculaires (fcv) ou libéroligneux (**Figure 46**).

Ces derniers regroupent le phloème primaire et le xylème primaire séparés par le cambium, couche de cellules non différenciées ou embryonnaires dont le fonctionnement est bloqué. Elles ne reprendront leur activité que durant l'élaboration des structures secondaires.

L'observation des coupes transversales de jeunes tiges de soja, montre que leur structure anatomique se rapproche étroitement de celle des racines, elle comprend : L'épiderme, formée

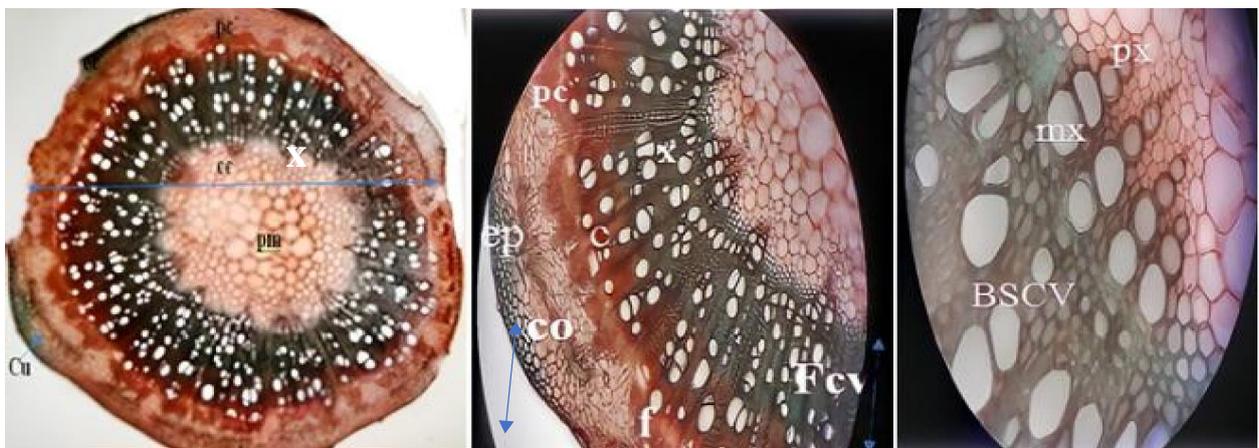
d'une assise de cellules jointive, dépourvue de chloroplastes, dont la face externe est recouverte d'une fine cuticule pourvue de stomates. L'écorce (parenchyme cortical), relativement réduite et composée de grandes cellules polyédriques, laissant entre elles des méats.

Le cylindre central, situé sous l'écorce et réunit dans un parenchyme médullaire, des faisceaux cribro-vasculaires (faisceaux libéro-ligneux) repartis sur un même cycle, présentes sous forme de tissus conducteurs rassemblés en amas superposés de xylème et de phloème dont le xylème est vers le centre de la tige, coiffé vers l'extérieur par le phloème. Chaque faisceau cribro vasculaire est surmonté d'un petit massif de sclérenchyme. Le xylème montre une différenciation centrifuge dont le protoxylème(px) est près du centre et le méta xylème(mx) près de la périphérie. Il est aussi possible de distinguer du protophloème et Métaphloème. La différenciation du phloème est centripète. La moelle de la tige est remplie par des cellules de parenchyme médullaire (Figure.47, 48, 49,50).

- **Microphotographies d'une coupe transversale dans une tige de soja *Glycine max* de trois mois :**

Cette coupe transversale illustre la mise en place de tissus conducteurs secondaires (xylème et phloème secondaires) dans une tige de soja de trois mois. Les tissus à paroi cellulosique sont colorés en rouge et les tissus à paroi lignifié sont colorés en vert. La partie centrale de la tige, moelle, importante est occupée par du parenchyme médullaire (pm) et le cortex (parenchyme cortical, pc) est réduit. Il occupe la partie de la coupe qui va depuis la couche de cellules sous l'épiderme aux fibres associées aux faisceaux cribro vasculaires. la photo nous montre une caractéristique de tige de dicotylédone.

Figure

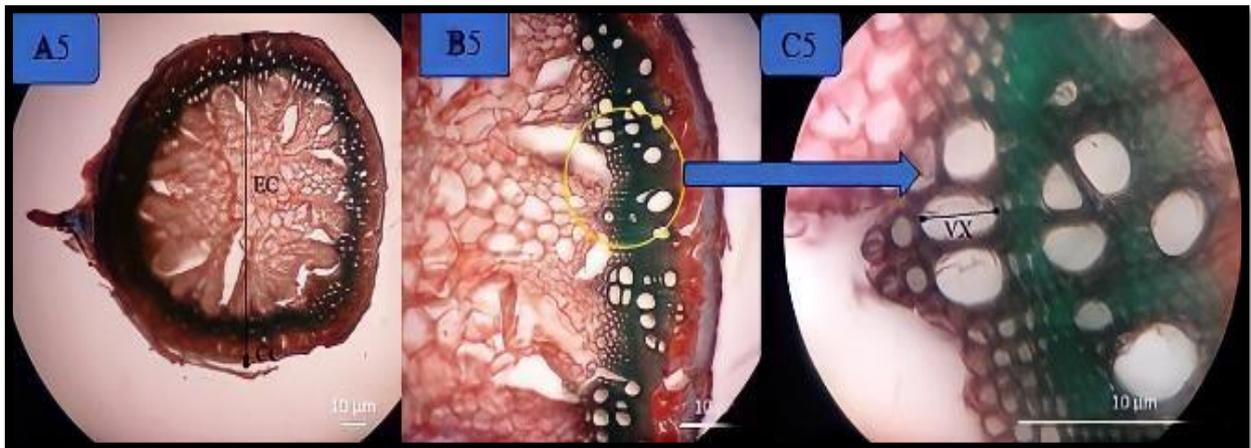


**Figure 46** .Coupes transversales d'une Tige de *Glycine max* (L.)Mer

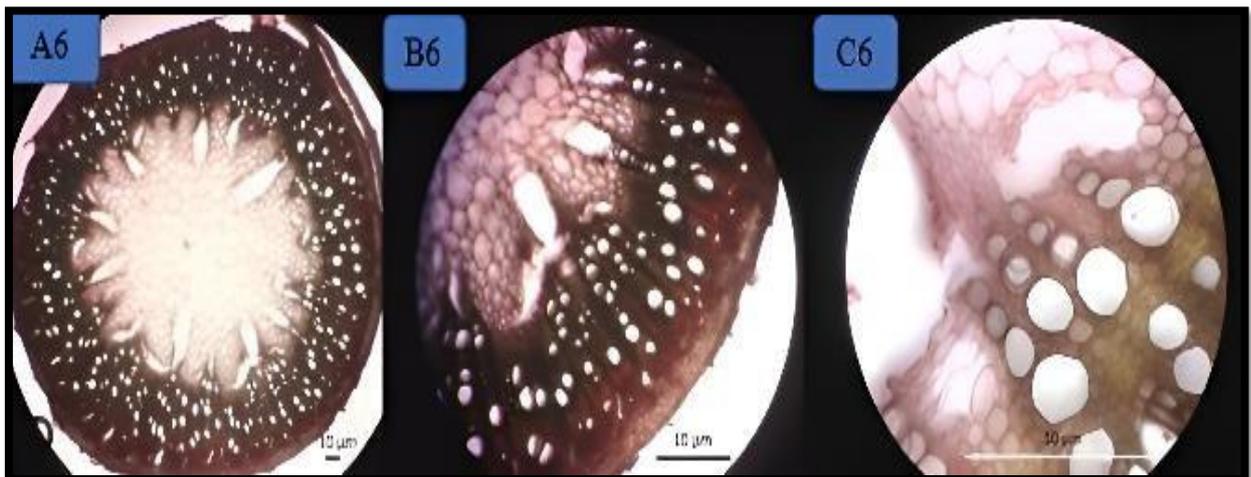
Ec : écorce, CC : cylindre central, Cu : cuticule, EP : épiderme, PM : parenchyme médullaire, Ph: phloème, X : xylème, C : cambium, f CV : faisceaux cribrovasculaires, fasciculaire. BSCV : bande sclérenchymateuse vasculaire.

PX : protoxylème. MX : métaxylème.

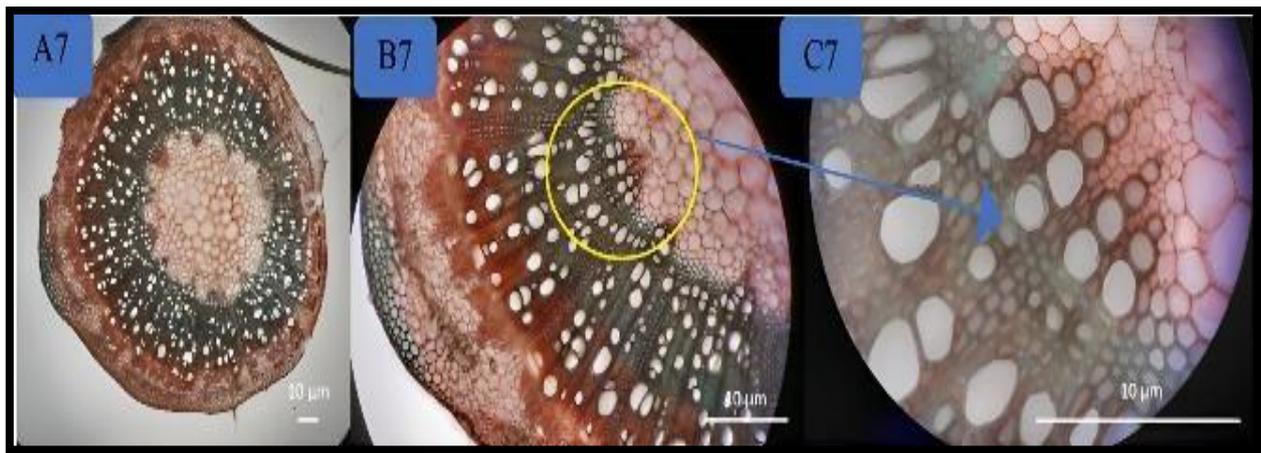
Ci-dessus microphotographie d'une portion de la coupe. En allant de l'extérieur vers le centre de la coupe on trouve successivement : l'épiderme (ep) constitué d'une seule couche de cellules jointives, le cortex occupé par du parenchyme cortical à grandes cellules (pc) et par du collenchyme (co) caractérisé par des cellules plus petites à paroi épaisse, de nouveau des grandes cellules de parenchyme (pc), des fibres (f) surplombant un faisceau cribro vasculaire (fcv).



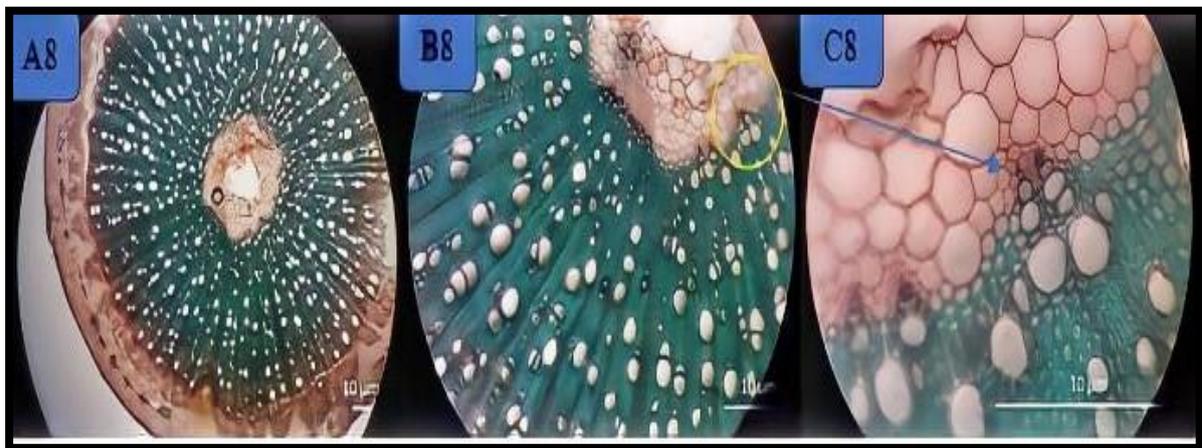
**Figure 47.** Coupe transversale de la tige témoin. (A5) : (Gx4) (B5) : (Gx10) (C5) : (Gx40) : Structure microscopique détaillée d'une portion de la coupe transversale de la tige témoin.



**Figure 48.** Coupe transversale d'une tige stressée à 50 ppm. (A6) : (Gx4) (B6) : (Gx10) (C6) : (Gx40) Structure microscopique détaillée de la coupe transversale d'une tige stressée à 50 PPM



**Figure 49.** Coupe transversale d'une tige stressée à 150 ppm. (A7) : (Gx4) (B7) : (Gx10) (C7) : (G x40) : Structure microscopique détaillée de la coupe transversale d'une tige stressée à 150 PPM.



**Figure 50:** Coupe transversale d'une tige stressée à 300 ppm (A8) : (Gx4) (B8) : (Gx10), (C8) : (G x40) (Structure microscopique détaillée de la coupe transversale d'une tige stressée à 300 PPM)

## 2 Discussion

Dans le but de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans l'accumulation du cadmium chez le soja. Nous avons évalué dans cette partie l'influence de cadmium sur les réponses morphologiques et physiologiques des plantules de soja (*Glycine max* L. cv *Merr*). Nous rappelons que les plantules de soja âgées de 3 mois ont subi un traitement cadmique dans un sol contenant 50, 150 et 300 ppm de  $\text{CdCl}_2$  et sans Cd pendant 10 jours.

L'étude des différents paramètres a porté sur la partie foliaire, et la partie racinaire qui représente l'interface entre le métal et la plante. L'incidence de ce stress métallique a porté, en particulier, sur les aspects morphologiques, sur certains paramètres de la croissance et sur la teneur en pigments photorécepteurs. Les mécanismes impliqués dans la tolérance du cadmium ont été analysés aussi dans ce chapitre.

Le cadmium (Cd) est l'un des métaux lourds les plus facilement absorbés et les plus

rapidement transloqués (**Javed et al. ,2018**) dans les systèmes sol-plantes. En général, lorsque la concentration totale de cadmium (Cd) dans le sol dépasse 8 mg kg<sup>-1</sup>, ou le taux de biodisponibilité. La concentration de Cd devient > 0,001 mg kg<sup>-1</sup>, ou la concentration de Cd dans les tissus végétaux atteint 3 à 30 mg kg<sup>-1</sup>, la plupart des plantes présentent des symptômes visibles de toxicité du Cd tels que un retard de croissance, une chlorose, une nécrose, un brunissement des racines, et même des perturbations de la photosynthèse, de l'absorption d'eau et de l'absorption de minéraux entraînent la mort cellulaires (**Gallego et Benavides, 2018; HE et al. ,2017**).

Les résultats expérimentaux obtenus dans le chapitre précédent indiquent que, les concentrations variables de CdCl<sub>2</sub> comprises entre 50 et 300ppm provoquent un effet significatif ( $p < 0.05$ ) sur la croissance du soja en termes de réduction de la longueur des racines et des pousses et aussi un effet significatif ( $p < 0.05$ ) sur la biomasse. Nos résultats corroborent avec l'étude de (**Finger-Teixeira et al. ,2010**) qui a rapporté que le Cd inhibe la longueur des racines de soja puisque les racines constituent la voie principale par laquelle les éléments métalliques peuvent transiter de la solution du sol vers le tissu végéta.

La biomasse a été altérée dans le soja. Comme indiqué, le Cd est préjudiciable à la croissance des plantes, même à de faibles concentrations (**QIN et al. ,2020**). D'autre part, (**Hashemet al. ,2016**) déclarent que le cadmium altère la croissance, déclenche la nécrose des feuilles et entrave la division et l'allongement des cellules et des attributs de croissance réduits. La réduction de la croissance des plantes par le stress cadmique pourrait être due à une perturbation du métabolisme des nutriments et de la photosynthèse (**Schützendübel et Polle, 2002**). Elle peut également être due à l'inhibition de la division, de la prolifération et de l'élongation cellulaires. (**Schützendübel et al. ,2001**). (**Finger-Teixeira et al. ,2010**) qui a également signalé que l'inhibition de la croissance des racines dans le soja traité au Cd était due à la rigidification accrue de la paroi cellulaire.

Une étude précédente a rapporté que le stress dû au Cd diminuait la quantité des pigments photosynthétiques dans de nombreuses plantes comme la tomate (**López-Millán et al. ,2009**), le haricot (**Nahar et al. ,2016**) et la moutarde (**Mahmud et al. ,2018**) Nous avons noté une réduction hautement significative ( $p < 0.001$ ) de la chlorophylle a, b et caroténoïdes en fonction des concentrations appliquées du Cadmium.

Le Cd diminue également la teneur en pigment dans le soja. La réduction de la teneur en chlorophylle peut être due : (a) à la destruction d'enzymes clés, telles que l'acide aminolévulinique déshydratase (ALA-déshydratase) et la protochlorophyllide réductase impliquées dans la biosynthèse de la chlorophylle, (b) à une diminution de l'absorption d'éléments minéraux tels que le Mg<sup>2+</sup> ; (c) le Cd interfère avec le métabolisme normal en remplaçant des éléments métalliques

essentiels tels que le Ca, le Mg et (d) le Cd déclenche la dégradation enzymatique de la chlorophylle par la chlorophyllase (**Ahmed et al. ,2013**).

L'inhibition de la photosynthèse causée par le Cd est due à un désordre de l'ultrastructure de la Plast quinone, des caroténoïdes, le transport des électrons, l'inhibition de l'activité des enzymes du cycle de Calvin et la déficience en CO<sub>2</sub> due à la fermeture des stomates (**Souguir, 2009**). La réduction de la quantité des pigments photosynthétiques est expliquée par une altération d'ultrastructure des chloroplastes et réduit net taux photosynthèse, stomatique conductance et feuille transpiration. En plus, Cd inhibe photosynthèse en diminuant la transcription des gènes liés à la photosynthèse psbA, psaB et rbcL (**Susana M. Gallego et al. ,2012**). En accord avec notre étude, une réduction significative de la teneur en chlorophylle des feuilles (**Liu et al. ,2018**) de soja a été observée dans les sols contaminés par le Cd (**Hussain et al. ,2019**).

Dans des conditions physiologiques normales, les radicaux libres oxygénés sont produits en régularité par différentes voies mais en faible concentration. Ils participent dans des voies de signalisation importantes. Dans ces conditions, la bascule antioxydants / prooxydants est en équilibre ce qui est indispensable car un excès d'EOR présente des propriétés nuisibles au cellule (**Berni et al. ,2018**).

L'exposition au stress biotique et abiotique, y compris aux métaux lourds, a déclenché l'accumulation de ROS qui perturbent l'homéostasie redox cellulaire et peuvent réagir avec des macromolécules telles que les lipides, les protéines et l'ADN pour provoquer un stress oxydatif (**Mittler, 2016; Nemmiche, 2017**). Dans la présente étude, nous avons constaté que le stress au Cd augmentait l'accumulation de ROS, suivie de l'augmentation de la teneur en peroxydes lipidiques dans les feuilles et les racines du soja, en fonction de la dose.

L'analyse statistique des résultats et comparaison des moyennes générées, présentent une augmentation significative en teneur de la malondialdéhyde (MDA) et la production de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en fonction des concentrations appliquées du Cadmium. Le Cd provoque indirectement la génération de ROS en perturbant la chaîne de transport des électrons, en interférant avec la défense antioxydante (**S. K. Yadav, 2010**) ou en stimulant la NADPH oxydase localisée dans la membrane, ce qui entraîne un stress oxydatif (**Heyno et al. ,2008**).

L'accumulation de MDA dans le soja traité au Cd indique que la peroxydation des lipides causée par le Cd reflète une perturbation du statut antioxydant du soja traité. En outre, la production excessive de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a entraîné une augmentation de la teneur en MDA. L'augmentation concomitante des taux d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et de MDA du soja est conforme aux résultats obtenus pour cette espèce en réponse au stress du Cd (**Muñoz et al. ,2008; Pérez Chaca et al. ,2014**).

Afin de prévenir les dommages causés par l'oxydation, les plantes développent une stratégie de défenses formé par un complexe des systèmes d'antioxydants qui agissent comme des

agents réducteurs qui mettent fin aux réactions oxydatives en éliminant les radicaux libres (Mehla et al., 2017). Ces contrôles sont réalisés par un système antioxydant composé d'enzymes telles que la CAT, la peroxydase (POD ; APX), etc., et de métabolites tels que la GSH, l'ascorbate et les flavonoïdes. L'APX est un composant majeur du cycle ascorbate-glutathion et réduit l' $H_2O_2$  en utilisant l'ascorbate comme donneur d'électrons (Figure ))).

Nos résultats indiquent que l'activité de l'APX s'est accrue sous le stress du Cd. D'après notre étude statistique, Nous avons noté un changement non significatif de l'ascorbate peroxydase ( $p > 0.05$ ). L'augmentation des activités APX peut être liée au dysfonctionnement du cycle

ascorbate-glutathion qui détoxifie l' $H_2O_2$  et prévient ainsi de nouveaux dommages. En outre, l'activité APX a été induite par le signal  $H_2O_2$  (Mittler, 2002). Alors que le CAT est une enzyme tétramérique contenant de l'hémine. Est un puissant piègeur des ROS toxiques, elle agit sur l' $H_2O_2$  et l'élimine dans les peroxysomes (Mittler, 2002). On la trouve dans tous les organismes aérobies et elle est unique car elle ne nécessite pas d'équivalent réducteur.

Nos résultats statistiques obtenus, montrent une diminution significative de CAT. Une diminution de l'activité du CAT pourrait être attribuée au fait que le Cd remplace le Fe du centre actif du CAT et inhibe le fonctionnement de l'enzyme (Maresca et al., 2017). Chez les plantes, la POD et la GST sont des enzymes clés impliquées dans les voies de détoxification des xénobiotiques tels que le Cd (Xia et al., 2009). Nous avons noté une augmentation significative de la Glutathion S-transférases tandis que la peroxydase présente une variation non significative fonction des concentrations variables du Cadmium. Activités accrues de la POD et de la GST dans les tissus du soja, à l'exception des racines. La POD montre qu'elles fonctionnent en même temps que les ions Cd détoxifiés.

La régulation à la hausse de l'activité du GST suggère la formation de S-conjugués de glutathion pour détoxifier le métal dans le soja (Xia et al., 2009), et la régulation à la baisse de l'activité du CAT et du POD dans les racines du soja traité au Cd peut être compensée par une activité APX élevée dans ce tissu. La diminution non significatif du niveau de LRWC dans le soja exposé au stress du Cd s'est accompagnée d'une augmentation de la teneur en proline ; il a été confirmé que le Cd induisait un déséquilibre potentiel en eau des tissus et un stress osmotique, peut-être dû au fait que le Cd inhibe l'absorption d'eau par les racines (Ahmad et al., 2017).

Les osmolytes de faible poids moléculaire et la proline agissent en tant qu'antioxydants non enzymatiques ROS scavengers et oxygène singlet, maintenant ainsi l'homéostasie redox cellulaire (Soares et al., 2018). La proline libre peut chélater le métal, inhiber la LPO et stabiliser les protéines (Gill et Tuteja, 2010). Elle peut fournir une source d'azote (N) et améliorer l'environnement redox cellulaire pour la tolérance des plantes aux stress abiotiques, y compris

l'exposition au Cd (**Gill et Tuteja ,2010**). Une augmentation hautement significative ( $p < 0.001$ ) a été observée dans la teneur en proline.

Dans cette étude, la teneur en proline a augmenté avec l'augmentation de la concentration de Cd dans les feuilles de soja, ce qui corrobore les conclusions de (**Hussain et al. ,2019**) qui ont également signalé que la teneur en proline augmentait avec l'augmentation de la concentration du métal dans *Glycine max* L. sous le stress du Cd, et l'accumulation de proline est un mode d'adaptation et de tolérance sous la toxicité du Cd.

Dans les plantes, l'ascorbate est un métabolite antioxydant hydrosoluble des plus abondants, ils remplissent de multiples rôles tels que les réactions de défense contre le stress et d'autres processus physiologiques comprennent la photosynthèse. C'est un puissant capteur de ROS ( $O_2^-$  et  $OH^-$ ), qui donne des électrons dans les réactions enzymatiques (APX) et régénère le tocophérol à partir du radical tocophéroxyle (**Gill et Tujeta 2010**). Dans la présente étude, la teneur en AsA des feuilles augmente avec la concentration croissante de Cd. Nous avons observé une augmentation significative en teneur de l'acide ascorbique au niveau des feuilles, par contre une diminution significative en teneur de l'acide ascorbique au niveau des racines. Notre résultat corrobore les conclusions de (**Khanna et al. ,2019**) sur la tomate. L'augmentation de la teneur en Ascorbate augmente la tolérance du soja au stress du Cd (**Noctor et al. ,2012**).

La diminution de la teneur en AsA des racines peut être due à l'activité plus élevée des APX qui utilisent l'AsA comme substrat pour détoxifier l' $H_2O_2$  dans l'eau au cours du processus de détoxification de l' $H_2O_2$  (**Gill et Tuteja, 2010**) et la faible régénération de l'AsA est attribuée à la diminution de la GSH. Le stress du Cd diminue la teneur en Ascorbate dans les racines de *Glycine max* L. (**Pérez Chaca et al. ,2014**).

La biosynthèse et la régulation des thiols jouent un rôle majeur dans la tolérance des plantes aux environnements stressants, y compris le stress du cadmium. Une fois dans la cellule, la capacité de chélation des groupes thiols tels que le GSH et les PC est très importante pour la détoxification des ions Cd (**Zagorchev et al. ,2013**).

Dans la présente étude, la teneur en GSH augmente significativement dans les feuilles de soja traitées au Cd, mais dans les racines, sa teneur diminue de manière significative. Pour se protéger du stress causé par le Cd, les plantes ont développé de multiples mécanismes d'adaptation et d'acclimatation (**Clemens, 2006**). La principale stratégie de détoxification du Cd dans les cellules végétales est basée sur la chélation par les phytochélatines (PC) et la compartimentation ultérieure du complexe Cd-PCs (**Clemens, 2001**).

Dans ce travail, le stress du Cd augmente d'une façon significative les niveaux de thiols non protéiques et de manière hautement significative en teneur en PC dans les racines de soja. Cette augmentation peut être due à la synthèse des PC (**Nocito et al. ,2002**) alors qu'elle a induit

une baisse significative des teneurs en GSH . Cette baisse des teneurs en GSH peut être attribuée au fait que le GSH agit comme précurseur pour la biosynthèse des phytochelatines (PC) et leur utilisation comme substrat de la GST stimulée sous le stress des **PC (Pérez Chaca et al. ,2014)**.

Nos résultats montrant une augmentation des PC accompagnée d'une diminution de la GSH dans les racines de soja traité au Cd sont en accord avec les conclusions de **(Nouairi et al. , 2019)** pour *Vicia faba* et **(Lu et al., 2019)** pour *Fagopyrum tararicum*. **(Veza et al. ,2019)** ont rapporté que le stress à l'arsenic augmentait l'accumulation de PC dans les racines de soja, suivie d'une diminution de la teneur en GSH dans cet organe. **(Noctor et al. ,2012)** ont également signalé une diminution des teneurs en GSH due à la production de PC.

Les métabolites secondaires tels que les flavonoïdes ont une puissante capacité antioxydants en piégeant directement les ROS (par exemple  $1O_2$  et  $H_2O_2$  et servent de substrat pour différentes peroxydases (glaïacol peroxydase GPX) en raison de leurs propriétés chimiques et biologiques **(Soares et al. ,2018)**, les flavonoïdes agissent comme un moyen de prévenir la formation de ROS en chélatent les métaux, protégeant ainsi les plantes du stress oxydatif **(Pourcelet al. ,2007)**.

Dans ce travail, le niveau de polyphénols diminue d'une manière non significative par contre les flavonoïdes présentent une augmentation hautement significative dans les feuilles de soja. Parallèlement l'activité du PAL augmente, Cette accroissement pourrait être expliqué par l'induction de la voie des phénylpropanoïdes sous le stress du Cd **(Dai et al. ,2006)**. La PAL est la principale enzyme dans la voie de biosynthèse des composés phénoliques. Des résultats précédents ont également indiqué que la PAL était stimulée dans l'*Azollaim bricata* exposée au Cd **(Dai et al. ,2006)**.

Dans le présent travail, augmentation de la teneur en flavonoïdes afin de renforcer le mécanisme antioxydant enzymatique pour éviter les dommages cellulaires. Malgré l'activité accrue du PAL, la diminution du phénol total dans les feuilles de soja à 300 ppm de Cd peut être attribuée à l'endommagement du système antioxydant et/ou à l'utilisation de phénols pour faire face à ce stress **(Berni et al. ,2018; Ramborger et al. ,2017)**. Dans l'étude actuelle, nos résultats ont montré que le soja avait une forte capacité de défense antioxydante. Ainsi a été attribuée à l'accumulation de métabolites antioxydants tels que les flavonoïdes pour éliminer l'excès de ROS et éviter les dommages oxydatifs.

Une augmentation significative de la concentration en Cd dans les organes végétaux obtenue selon l'ordre suivant racines > feuilles > tiges avec un facteur de transfert estimé à 0,39, 0,63 et 0,49 pour les doses de 50, 150 et 300 ppm respectivement . Les racines constituent le principal site d'accumulation du Cd. Les valeurs HRI **(Tableau7)** indiquent qu'il n'y a aucun risque dans la consommation de soja pour la santé humaine à 50 ppm, mais à des taux

d'absorption plus élevés, comme ceux des consommateurs végétariens, le risque augmente

Une augmentation significative de la concentration en Cd dans les organes végétaux obtenue selon l'ordre suivant racines > feuilles > tiges avec un facteur de transfert estimé à 0,39, 0,63 et 0,49 pour les doses de 50, 150 et 300 ppm respectivement .

Les racines constituent le principal site d'accumulation du métal lourd dans la plante utilisée varie selon la mobilité, la biodisponibilité et la concentration du cadmium dans le sol. Son accumulation dans les feuilles et racines des plantes augmente progressivement avec ses doses croissantes. Ce constat corrobore les résultats trouvés par **Baker et al. (1994)**, qui rapportent que la concentration des métaux dans les plantes dépend hautement de leurs concentrations dans le sol. En effet, la disponibilité des métaux dans le système sol-plante dépend du pH du sol, de la concentration en matière organique et du stade de développement de la plante.

La migration et l'accumulation des métaux lourds dans les organes, les tissus, les cellules de la plante dépendent essentiellement du métal considéré. Mais sauf quelques exceptions la plupart des espèces végétaux paraissent opérer une forte rétention des métaux lourds dans les racines, à un degré moindre dans les feuilles. Les résultats de notre étude ont révélé que le Cd présente le taux le plus élevé dans la partie racinaire de la plante.

Les résultats obtenus sont similaires à ceux de qui ont signalé que les métaux lourds sont stockés souvent dans les racines de la plante. La compartimentation et l'accumulation d'un métal lourd s'effectue dans les vacuoles des cellules racinaires alors limitant son transport vers la partie aérienne. La translocation des éléments métalliques vers les parties aériennes de la plante dépend des différents facteurs (espèce végétale, caractéristiques physicochimiques des sols, espèces métalliques présentes).

La facilité de transfert du Cd est liée entre autres à sa grande mobilité dans le sol par rapport aux autres métaux. Sa biodisponibilité et sa mobilité sont liées à sa solubilité et à sa forme géochimique. Il a été clairement démontré que la capacité d'accumulation du cadmium était dépendante de la famille végétale et de l'espèce. Selon Les plantes cultivées les plus accumulatrices de cadmium sont les Chénopodiacées (épinard, betterave), les Brassicacée (chou, navet, radis) et les Astéracées (laitue). Cependant, des résultats contradictoires montrent que pour la plupart des plantes, la concentration de cadmium dans les racines est au moins trois fois plus importante que celle des parties aériennes. Par exemple chez *Azolla filiculoides*, les niveaux d'accumulation du Cd sont au moins deux fois plus élevés dans les racines que dans les parties aériennes, le riz et la laitue. Ce qui rejoint encore nos résultats, à la dose 300 ppm l'accumulation de cadmium se fait préférentiellement au niveau de la partie souterraine de la plante.

Les métaux lourds, plus que tout autre stress environnemental, affectent gravement la

croissance et le développement des plantes. Les racines sont les premiers organes en contact avec les métaux et les metalloïdes du sol ; provoquent par exemple différentes altérations anatomiques du diamètre des racines, des cellules épidermiques, des cellules parenchymateuses, de la veine centrale, du péricycle et des tissus conducteurs.

La surface totale des racines traitées était nettement supérieure à celle des racines témoins. Le diamètre majeur de la racine traitée était une conséquence de la plus grande taille du cylindre vasculaire et de la zone du cortex. L'augmentation du cortex a été causée par une augmentation de la surface des cellules parenchymateuses corticales. L'élargissement du diamètre de la racine du soja a été produit par une augmentation de l'expansion radiale des cellules dans les zones du cylindre vasculaire et du cortex, comme observé dans l'apex de la racine de *Pisum sativum L. cv. Meraviglia* d'Italia, sensible au Cd et cela est en accord avec **(Fusconi et al. 2007)**, dans l'apex de *Hordeum vulgare* **(Voutsinas et al. 1997)** et dans les cellules de l'algue verte *Spirogyra* **(Pribyl et al. 2005)**.

Semblable à nos études dans le soja, les diamètres plus grands des racines de maïs exposées au Cd étaient dus à une augmentation de la taille des cellules du cortex du parenchyme **(Maksimovic' et al. 2007)**. L'augmentation observée dans le cortex du soja pourrait avoir été stimulée en raison d'une activité mitotique plus faible dans la région apicale de la racine et d'une résistance accrue à l'écoulement radial de l'eau et aux solutés.

Des études menées sur *Zea mays* ont conclu que le Cd induit des différences dans les proportions relatives et la taille des tissus racinaires et des types de cellules. Ces changements semblent dépendre de l'espèce, des tissus et de la concentration de Cd dans la rhizosphère **(Lux et al. 2011)**.

Dans nos conditions expérimentales, le stress au Cd a provoqué une inhibition de la croissance des plantes entières, des racines des tiges du soja, comme cela s'est produit chez d'autres espèces telles que *Arabidopsis* **(Suzuki 2005)**, l'orge **(Wu et al. 2004)**, le tournesol **(Groppa et al. 2007)** et blé **(Ranieri et al. 2005)**. La longueur des plants de soja entiers était réduite sous le stress du Cd cela est en accord avec **Dražić et al. (2004)**, rapportent qu'une diminution du taux de croissance des pousses de plants de soja stressés par le Cd était corrélée avec la concentration externe de Cd, la durée d'exposition et l'espèce végétale ou le génotype. L'inhibition de la croissance des racines chez les plantes stressées par le Cd peut réduire l'absorption de minéraux et d'eau, réduisant ainsi leur taux de croissance en affectant diverses parties du métabolisme racinaire **(Barcelo' et Poschenrieder 1990)**. De même, lors d'un stress au Cd, un stress hydrique peut être induit. **(Jiang et Hartung 2008)**.

En (2017) ont constaté qu'une concentration plus élevée de Cd avait un impact sur la taille et le dessin du méristème racinaire chez *Arabidopsis*, et affectait également négativement

l'organisation du centre de quiescence (QC) de la racine. Par exemple, l'activité méristématique et le potentiel de division de la zone méristématique des plants d'*Arabidopsis* traités au Cd étaient comparables à ceux du témoin, la taille réduite des méristèmes ayant entraîné une diminution de la croissance des racines (**Yuan et Huang, 2016**).

En (2018) ont constaté que le Cd favorisait la formation de racines latérales dont l'organisation du méristème était endommagée et altérée. Par conséquent, il est important de garder à l'esprit que les premiers effets primaires des métaux (loïdes) sur la RAM (par exemple, suppression de l'activité méristématique, allongement altéré, organisation modifiée du QC, etc. La formation et la croissance des racines latérales peuvent influencer de manière significative la morphologie globale du système racinaire et conduire à diverses modifications observées ultérieurement au niveau anatomique dans les tissus plus anciens.

De plus, les métaux (loïdes) peuvent également être responsables de l'épaississement de l'exo- et de l'endoderme, de la subérisation et de la lignification des tissus racinaires et également de l'augmentation de l'épaisseur des cellules en provoquant un retard de croissance et une diminution de la division cellulaire (**Stohs et coll., 2000 ; Far-zadfar et Zarinkamar, 2012 ; Vaculík et al., 2012b ; Martinka et coll., 2014**).

Le nombre de racines latérales a diminué et elles ont été localisées près de la partie basale des racines avec un assombrissement des racines dans le soja traité comme (*Glycine max*) (**Armendariz et al., 2016**). En revanche, un certain nombre de racines latérales ont augmenté et elles ont été déplacées plus près de l'extrémité de la racine.

Selon (**Pita-Barbosa et al., 2015**), Une concentration de ( $2 \text{ mg L}^{-1}$ ) les racines latérales dans le cortex ont diminué, et elles ont été localisées près de la partie basale de la racine avec un assombrissement des racines dans les plantes de soja traitées. Cela était corrélée avec notre concentration externe de Cd, et la durée d'exposition.

L'oblitération et l'hypertrophie du tissu vasculaire observées dans les racines de soja traitées au Cd et la présence de parois épaissies inégales et de certaines cellules endodermiques sombres dans les couches adjacentes peuvent être dues à la rétention de métaux par les groupes d'ammonium des parois (**Ernst et al. 1992**). Par conséquent, les conséquences des altérations anatomiques des racines de soja et de l'inhibition de la croissance par le Cd pourraient être dues à une faible absorption de nutriments et d'eau, à un faible taux de transpiration, entraînant un faible taux de croissance des pousses.

Des résultats antérieurs (**Pérez-Chaca et al. 2014**) ont montré que le Cd induisait une poussée oxydative rapide dans les racines de soja. Ce fait déclenche des dommages oxydatifs aux protéines et l'induction de défenses antioxydantes et d'hormones de stress.

En effet, une augmentation du diamètre total de de la tige s'est manifestée sous stress, ainsi qu'un élargissement du diamètre de la stèle qui s'est traduit par un élargissement de celui de l'écorce. Ces modifications et variations anatomiques peuvent être considérées comme des caractères adaptatifs adoptés par l'espèce vis-à-vis du stress métallique à 50 ppm, cette adaptation anatomique contribue à améliorer la rigidité des tissus racinaires et empêche également la perte d'eau par la surface des tiges et peut entraîner une meilleure absorption de l'eau et des minéraux en période de sécheresse (**Shabala et Cuin, 2008 ; Mustapha et al., 2019**).

Les racines des plantes tolérantes montrent une subérification précoce et ou une lignification des cellules endodermiques ainsi qu'une activité hâtive du péricycle (**Reinoso et al., 2004**).

Nos résultats montrent également une sclérification et une lignification accrue dans la racine et la tige, notamment sur la bande vasculaire (tissu xélymien) et au sein du parenchyme cortical et une présence marquée de fibres sclérenchymateuses, avec rétrécissement de la moelle des tiges stressées à 150 ppm et 300 ppm.

En effet, la plante augmente souvent le diamètre du vaisseau lorsque l'eau est limitée pour augmenter le flux d'eau à travers les éléments du xylème (**Stiller et al. 2003**) ont signalé que la cavitation se produit lorsque l'écoulement de l'eau dans les vaisseaux du xylème ne peut pas maintenir le taux de transpiration.

Selon **Boughalleb et al. (2009)**, la structure anatomique des vaisseaux de xylème est optimisée pour assurer le transport continue de l'eau à partir des racines jusqu'aux feuilles sous des conditions variable d'approvisionnement en eau.

Quelques études ont également montré que le transport d'eau diminue de deux à quatre fois selon l'espèce et la concentration du cadmium (**Barcelo et al., 1988 ; Marchiol et al., 1996**). Ces auteurs ont considéré que cette diminution est due à l'inhibition de la division et de l'élongation des cellules xylémiques. Ces auteurs ont présumé que ceci est une conséquence des perturbations de l'équilibre hormonal causées par le cadmium.

Les résultats obtenus par **Chaoui et El Ferjani (2004)**, rapportent que le cadmium produit 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.

De même, le cadmium provoque 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 Kumar, 2002 ; Fediuc et al., 2005**). Cependant, des chercheurs suggèrent que la fermeture stomatique, en présence de cadmium, est due à la ressemblance chimique entre les ions  $Cd^{2+}$  et  $Ca^{2+}$  ils ont rapporté que les racines de *Latium* pérenne agissent comme une barrière, ainsi, ils réduisent le transport du cadmium vers les parties

aériennes et conservent plus de 90% de cadmium dans les racines.

**Dal Corso et al. ,(2010)** obtiennent pour le soja un taux de rétention similaire à 84 %. Les racines des plantes tolérantes montrent une subérification précoce et ou une lignification des cellules endodermiques ainsi qu'une activité hâtive du péricycle (**Reinoso et al, 2004**).

Une autre caractéristique importante du tissu rhizodermal est le processus de formation des poils de la racine qui a été observé comme étant influencé par divers métaux et métalloïdes, également. En outre, la densité et le schéma de formation des poils de la racine sont une caractéristique importante de la racine qui participe à l'absorption des métaux lourds par d'autres tissus végétaux (par exemple **Kohanova'et al., 2018**).

Un effet similaire, une augmentation de la densité des poils racinaires a été observée dans les racines de *Medicago truncatula* traitées au Cd (**Rahoui et al., 2017**) De plus, la formation de poils racinaires a été induite beaucoup plus près de l'extrémité de la racine dans les racines d'orge (*Hordeum vulgare*) traitées au Cd (**Durcekova et al.2007**). Une augmentation de la densité des poils racinaires a également été observée dans les racines de *Sorghum bicolor* traitées au Cd, mais la densité des poils racinaires a diminué seulement à 0,5 mM de Cd, à des concentrations plus élevées de Cd (2 et 3 mM de Cd).

Les auteurs ont expliqué que l'augmentation de la densité à 0,5 mM était liée à une diminution de l'élongation des cellules. Des concentrations plus élevées ont entraîné l'arrêt de l'élongation cellulaire et de la croissance des poils de racine (**Kuriakose et Prasad, 2008**). Le cadmium dans l'expérience avec l'Arabi- dopsis a augmenté la densité des poils de la racine probablement en changeant le destin des cellules rhizodermiques non poilues en cellules poilues (**Bahmani et al. ,2016**).

L'augmentation de la densité des poils des racines du riz (*Oryza sativa*) exposé au Cd **Tripathi et al.(2012)** a été expliquée comme une stratégie adaptative pour maintenir l'absorption et l'assimilation des minéraux et les processus physiologiques normaux. Dans une fougère, *Pteris vittata*, As modifié le développement des poils de racine en termes d'augmentation de la densité et de la longueur des poils de racine, et ils ont été localisés plus près de l'extrémité de la racine. De plus, un développement normal a été modifié lorsque des poils de racine, généralement localisés au-dessus du point de jonction de deux cellules corticales, ont été développés de manière ectopique à côté d'une seule cellule corticale. De plus, à l'extrémité de la racine, des cellules ressemblant à des bordures se sont formées plus tard et ont été libérées sous la forme d'une couche cellulaire continue. Les tissus corticaux composés de l'exoderme, du mésoderme et de l'endoderme présentent une variabilité structurelle et fonctionnelle en fonction de divers stress environnementaux (**Lux et al.,2004**), et peuvent être fortement influencés par des doses toxiques

de métaux et de métalloïdes.

Trois plantes de Brassicaceae testées ont présenté divers dommages des tissus corticaux, comme l'hypertrophie des cellules corticales chez *B. oleracea*, détachement du protoplaste des parois cellulaires chez *B. juncea* et *B. oleracea*, effondrement des tissus corticaux chez *R. sativus* et effondrement des cellules endodermiques chez *B. juncea* (Freitas-Silva et al., 2016).

La réduction visible du diamètre des racines des plantes Glycine max traitées à l'As-Traitement a également été causée par la dégradation des cellules corticales, la diminution de l'épaisseur du parenchyme et de l'ensemble des cellules dommages. De plus, des dépôts sombres ont été observés dans les cellules corticales (Armendariz et al., 2016).

En outre, il a été démontré que la bande de Casparian ou les lamelles subérines dans l'exoderme et l'endoderme des racines se développent plus près de l'apex des racines chez diverses espèces végétales après exposition au Cd (par exemple, Lunackova ; Tao et al., 2017) Il a également été observé que la culture dans différents milieux a un impact sur le développement des barrières apoplasmiques des racines, ce qui influence consécutivement l'absorption de Cd par les plantes (Redjala et al., et Liska et al. (2016) ont observé un dépôt intensif de subérine et de lignine dans la partie de la racine qui était exposée à la toxicité du Cd, par rapport au côté opposé de la racine qui poussait dans des conditions de contrôle. Des preuves supplémentaires de l'importance des dépôts de subérine en réponse au stress du Cd ont été trouvées dans les racines de l'espèce bulbeuse *Merwillia plumbea*.

Bien que ce monocotylédone ne forme pas un périoderme régulier, en raison de l'absence de méristèmes secondaires, après exposition au Cd, les plantes ont présenté une formation ectopique de périoderme subérisé dans les zones périphériques du cortex racinaire (Lux et al., 2011).

Chez *Trigonella foecum graecum* après un stress au Cd, une proportion moindre de tissus vasculaires était liée à la diminution de la longueur et de la largeur des fibres du xylème et à la réduction du diamètre des vaisseaux du xylème. De plus, la densité des vaisseaux était significativement plus faible que dans le groupe témoin (Ahmad et al., 2005).

La diminution du diamètre des racines de maïs des plantes traitées au Cd a également entraîné une diminution du diamètre des éléments du xylème, ce qui conduit probablement à une augmentation de leur nombre. Il est intéressant de noter que le Cu à haute concentration (150 µM) a augmenté le nombre d'éléments métaxyle, et que le Cd à la même concentration a augmenté le nombre d'éléments protoxyle (Gowayed et Almaghrabi, 2013).

Il existe également des documents sur le dépôt de divers types de dépôt à l'intérieur des

vaisseaux ou dans la zone du cylindre central. Des dépôts sombres ont rempli les éléments du xylème et du phloème dans les plantes *Glycine max* traitées par As, mais seulement si As était présenté sous forme AsIII. L'arsenic sous forme AsV n'a pas induit de dépôt similaire (**Armendariz et al. ,2016**). Un dépôt massif de subérine dans l'endoderme et de lignine dans le cylindre central de la zone de transition des racines sous forme de dépôt apical subéro-lignifié spécifique (SLAD) a été observé en réponse au Cu par le radis (*Raphanus sativus*).

Le SLAD a été spatialement séparé de la subérisation ou de la lignification dans l'endoderme basal, et est probablement lié à un remodelage du système racinaire induit par le stress, comme une diminution de la croissance des racines ou une augmentation de la production de racines latérales (**Kovač et al. ,2018**).

La tige est l'organe de la plante qui relie les racines aux principaux organes photosynthétiques - les feuilles. L'une des principales fonctions de la tige est de porter les feuilles et les fleurs. La tige est également impliquée dans le transport des solutés et la translocation de la racine à la pousse. Par conséquent, les métaux et les metalloïdes absorbés par les racines peuvent également affecter négativement l'organisation des tissus de la tige.

Les métaux et les metalloïdes sont transportés vers les organes de surface par les tissus vasculaires ; c'est pourquoi le système vasculaire et ses environs sont le site d'altérations anatomiques fréquemment observées dans les tissus de la tige. **Ahmad et al. (2005)** ont également révélé que le stress du Cd entraînait une réduction du tissu vasculaire et de la zone de moelle de la tige de *Trigonella foenum graecum*, tandis que les cellules corticales augmentaient avec l'augmentation de la concentration du Cd. La réduction de la taille des faisceaux vasculaires n'est pas la seule à avoir été observée en raison de la toxicité des métaux.

CONCLUSIONS  
ET  
PERSPECTIVES

Au cours des dernières décennies, l'industrialisation et l'urbanisation sont devenues une source de propagation des métaux toxiques dans l'environnement. L'absorption et l'accumulation de métaux et de metalloïdes à des concentrations élevées provoquent des changements morphologiques, structurels et ultra structuraux directs qui affectent les réactions physiologiques et biochimiques et anatomique des végétaux.

A l'issue de nos travaux de recherche sur le soja, on peut conclure que la toxicité du Cd altère la perméabilité et la structure tissulaire des plantules qui augmente l'absorption du Cd, et conduit à une toxicité plus accentuée des structures végétales. Les concentrations expérimentales testées (50,150, et 300 ppm Cd) induisent un stress oxydatif, et une accumulation des espèces réactives oxygénées. À ce stade, le soja (*Glycine max L.*) peut activer son système de défense antioxydant, telles les enzymes APX, POD, CAT et GST, ainsi que des antioxydants non-enzymatiques (proline, thiols et flavonoïdes) qui peuvent atténuer les dommages oxydatifs entraînant une altération de la croissance des plantes et le jaunissement des feuilles. Les résultats obtenus montrent que la croissance, la teneur en pigments et le LRWC des semis de soja exposés au Cd ont diminué de manière dépendante de la concentration, et que des niveaux accrus de peroxyde d'hydrogène entraînent une augmentation de la peroxydation lipidique, et le contenu en GSH s'est appauvri en raison de la production de phytochélatines dans les racines.

L'adaptation des végétaux aux conditions contraignantes de leur environnement nécessite des modifications morphologiques et métaboliques. Ces changements doivent aider à la fois à minimiser les effets nocifs du stress et permettre à la plante de survivre. Les plantes ont mis au point des mécanismes complexes pour contrôler les concentrations des métaux essentiels et réduire au minimum les dommages causés par l'exposition aux métaux non essentiels. Les altérations des tissus racinaires couramment observées en raison de la présence de doses toxiques de métaux comprennent diverses modifications de la paroi cellulaire ou imprégnations par des métabolites secondaires, en particulier dans les tissus racinaires périphériques, comme le rhizoderme et les cellules corticales externes qui sont souvent au premier contact avec les polluants du sol. Cette stratégie vise à renforcer l'interphase racine-sol et à limiter l'absorption des éléments.

De plus, les parois cellulaires peuvent contribuer au stockage des métaux dans des compartiments cellulaires

moins toxiques par rapport aux organites plus sensibles, comme le cytoplasme. Une adaptation supplémentaire est représentée par le développement modifié des barrières apoplasmiques,

principalement les bandes de Cas parian et les lamelles de subérine dans l'exoderme et l'endoderme. Le développement de ces barrières apoplasmiques est variable et fluctue

fréquemment entre les espèces végétales en fonction des conditions environnementales. Cependant, chez de nombreuses espèces végétales, les métaux lourds favorisent le développement de ces barrières plus près de l'apex de la racine, ce qui est considéré comme une stratégie pour limiter l'absorption incontrôlé de substances nocives par voie apoplasmique.

L'approche anatomique a fait ressortir que notre *soja* est une espèce qui met en œuvre des stratégies d'adaptation anatomiques pour contrecarrer les effets néfastes du stress métallique. Cette adaptation s'est traduite par une augmentation du diamètre total de la racine et de la tige, un élargissement du diamètre de la stèle qui s'est traduit par un rétrécissement de celui de l'écorce, ainsi qu'une augmentation importante du diamètre des vaisseaux du xylème au niveau des racines et des tiges, notamment du métaxylème avec des parois plus épaisses.

On a constaté aussi une sclérisation et une lignification accrue dans la racine et la tige, notamment sur la bande vasculaire (tissu xélymien) et au sein du parenchyme cortical et une présence marquée de fibres sclérenchymateuses, avec rétrécissement de la moelle des tiges stressées. Bien que l'effet des polluants tels que les métaux lourds soient intensivement étudié au niveau moléculaire et biochimique, par contre l'effet principal de ces éléments sur la structure tissulaire est peu étudié. Notre travail a mis en évidence les modifications structurelles de divers organes et tissus végétaux affectés par la présence d'un contaminant nocif dans l'environnement, le cadmium.

Enfin, On conclut que les réponses écophysiological des plantules de soja au stress causé par le Cd est très complexe, et pour mieux élucider les mécanismes impliqués dans la pollution par les métaux lourds tel le cadmium, la combinaison de plusieurs approches d'études est nécessaire.

En perspectives, l'étude des mécanismes moléculaires contrôlant l'accumulation du cadmium chez le *soja Glycine max L.* et la caractérisation des gènes impliqués permet de mieux sélectionner des variétés accumulant moins de cadmium dans leurs tissus.

**REFERENCES**  
**BIBLIOGRAPHIQUES**

## Références bibliographiques

### A

- Abouzari, A., et Fakheri, B. A. (2015).** Reactive oxygen species: Generation, Oxidative Damage, and Signal Transduction. *International Journal of Life Sciences*. <https://doi.org/10.3126/ijls.v9i5.12699>
- Aebi, H. (1984).** Catalase in Vitro. *Methods in Enzymology*, 105(C), 121–126. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3)
- Ahammed, G. J., Choudhary, S. P., Chen, S., Xia, X., Shi, K., Zhou, Y., et Yu, J. (2013).** Role of brassinosteroids in alleviation of phenanthrene-cadmium co-contamination-induced photosynthetic inhibition and oxidative stress in tomato. *Journal of Experimental Botany*. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers323>
- Ahmad, P., Alyemeni, M. N., Wijaya, L., Alam, P., Ahanger, M. A., et Alamri, S. A. (2017).** Jasmonic acid alleviates negative impacts of cadmium stress by modifying osmolytes and antioxidants in faba bean (*Vicia faba* L.). *Archives of Agronomy and Soil Science*. <https://doi.org/10.1080/03650340.2017.1313406>
- Anderson, M. E., Orrenius, S., Holmgren, A., Mannervik, B., et Press, R. (1985).** *Annu. Rev. Biochem.* 52, 711 (1983)
- Azooz, M. M., et Ahmad, P. (2015).** Legumes under Environmental Stress: Yield, Improvement and Adaptations. In *Legumes under Environmental Stress: Yield, Improvement and Adaptations*. <https://doi.org/10.1002/9781118917091>.

### B

- Badole, S. L., et Bodhankar, S. L. (2013).** Chapter 8 - Glycine max (Soybean) Treatment for Diabetes. In *Bioactive Food as Dietary Interventions for Diabetes*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397153-1.00008-1>
- Banerjee, A., et Roychoudhury, A. (2017).** *Abiotic Stress , Generation of Reactive Oxygen Species , and Their Consequences : Boon Or Bane - Revisiting the Role of ROS Abiotic Stress , Generation of Reactive Oxygen Species , and Their Consequences : An Overview - Introduction*. October 2018. <https://doi.org/10.1002/9781119324928.ch2>
- Barrs, H., et weatherley, P. (1962).** A re-examination of the relative turgidity technique for estimating water deficits in leaves by h. D. Barrs\* and p. E. Weatherleyt. *Aust.J.Biol.Sci*, 15, 413–428.

**Basal, O., Szabó, A., et Veres, S. (2020).** Physiology of soybean as affected by PEG-induced drought stress. *Current Plant Biology*, 22. <https://doi.org/10.1016/j.cpb.2020.100135>

**Bates, L. S., Waldren, R. P., et Teare, I. D. (1973).** Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*. <https://doi.org/10.1007/BF00018060>

**Berni, R., Luyckx, M., Xu, X., Legay, S., et Sergeant, K. (2018).** Reactive oxygen species and heavy metal stress in plants : Impact on the cell wall and secondary metabolism ☆. *Environmental and Experimental Botany*, October, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.10.017>

**Biniek, C. (2017).** *Importance des ROS et des radicaux : de la graine à la membrane plasmique* To cite this version : HAL Id : tel-01456224 L ' U NIVERSITÉ P ARIS -S ACLAY Mme Catherine Biniek *Importance des ROS et des radicaux :*

**Bradford, M. (1976).** A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>

## C

**Cakmak, I., et Marschner, H. (1992).** Magnesium deficiency and high light intensity enhance activities of superoxide dismutase, ascorbate peroxidase, and glutathione reductase in bean leaves. *Plant Physiology*, 98(4), 1222–1227. <https://doi.org/10.1104/pp.98.4.1222>

**Calero-Muñoz, N., Exposito-Rodríguez, M., Collado-Arenal, A. M., Rodríguez-Serrano, M., Laureano-Marín, A. M., Santamaría, M. E., Gotor, C., Díaz, I., Mullineaux, P. M., Romero- Puertas, M. C., Olmedilla, A., & Sandalio, L. M. (2019).** Cadmium induces reactive oxygenspecies-dependent pexophagy in Arabidopsis leaves. *Plant Cell and Environment*, 42(9), 2696–2714. <https://doi.org/10.1111/pce.13597>

**Chaney, R. L., Institutet, K., Environmental, C., et States, U. (2019).** Cadmium Exposure in the Environment : Dietary Exposure , Bioavailability and. In *Encyclopedia of Environmental Health* (Second Edi, Vol. 1, Issue November 2018). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978- 0-12-409548-9.11746-4>

**Chen, D., Chen, D., Xue, R., Long, J., Lin, X., Lin, Y., Jia, L., Zeng, R., & Song, Y. (2019).** Effectsof boron, silicon and their interactions on cadmium accumulation and toxicity in rice plants. *Journal of Hazardous Materials*, 367(October 2019), 447–455.

**Chen, L., Qu, G., Sun, X., Zhang, S., Wang, L., Sang, N., Du, Y., Liu, J., et Liu, S. (2013).** *Characterization of the Interaction between Cadmium and Chlorpyrifos with Integrative Techniques in Incurring Synergistic Hepatotoxicity.* 8(3), 1–8.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059553>

**Choudhary, K. K., Chaudhary, N., Agrawal, S. B., et Agrawal, M. (2017).** Reactive oxygen species: Generation, damage, and quenching in plants during stress. In *Reactive Oxygen Species in Plants: Boon Or Bane - Revisiting the Role of ROS.* <https://doi.org/10.1002/9781119324928.ch5>

**Choudhury, F. K., Rivero, R. M., Blumwald, E., & Mittler, R. (2017).** Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination. *Plant Journal*, 90(5), 856–867. <https://doi.org/10.1111/tpj.13299>

**Clemens, S. (2006).** Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. In *Biochimie.* <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2006.07.003>

**Clemens, Stephan. (2001).** *Review Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis.*

**Clemens, Stephan, Aarts, M. G. M., Thomine, S., et Verbruggen, N. (2013).** Plant science: The key to preventing slow cadmium poisoning. *Trends in Plant Science*, 18(2), 92–99. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.08.003>

**Clemens, Stephan, et Ma, J. F. (2016).** Toxic Heavy Metal and Metalloid Accumulation in Crop Plants and Foods. *Annual Review of Plant Biology*, 67(1), 489–512. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-043015-112301>

**Corpas, F. J. (2014).** *Zinc induces distinct changes in the metabolism of reactive oxygen and nitrogen species ( ROS and RNS ) in the roots of two Brassica species with different sensitivity to zinc stress.* <https://doi.org/10.1093/aob/mcu246>

**Cuypers, A., Hendrix, S., dos Reis, R. A., De Smet, S., Deckers, J., Gielen, H., Jozefczak, M., Loix, C., Vercampt, Vangronsveld, J., & Keunen, E. (2016).** Hydrogen peroxide, signaling in disguise during metal phytotoxicity. *Frontiers in Plant Science*, 7(APR2016). <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00470>

## D

**Dai, L. P., Xiong, Z. T., Huang, Y., et Li, M. J. (2006).** Cadmium-induced changes in pigments, total phenolics, and phenylalanine ammonia-lyase activity in fronds of *Azolla*

imbricata. *Environmental Toxicology*. <https://doi.org/10.1002/tox.20212>

**Dar, M. I., Naikoo, M. I., Khan, F. A., Rehman, F., Green, I. D., Naushin, F., et Ansari, A.A. (2017)**

An introduction to reactive oxygen species metabolism under changing climate in plants. In *Reactive Oxygen Species and Antioxidant Systems in Plants: Role and Regulation under Abiotic Stress*. [https://doi.org/10.1007/978-981-10-5254-5\\_2](https://doi.org/10.1007/978-981-10-5254-5_2)

**Das, K., et Roychoudhury, A. (2014).** *Reactive oxygen species ( ROS ) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants*. 2(December), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2014.00053>

**Demidchik, V. (2015).** Mechanisms of oxidative stress in plants : From classical chemistry to cell biology. *Environmental and Experimental Botany*, 109, 212–228. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2014.06.021>

**Diaconu, M., Pavel, L. V., Hlihor, R., Rosca, M., Fertu, D. I., Lenz, M., Xavier, Pet Gavrilesu, M. (2020).** of. *New BIOTECHNOLOGY*. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2020.01.003>

#### F

**Feng, Z., Ding, C., Li, W., Wang, D., et Cui, D. (2019).** Applications of metabolomics in the research of soybean plant under abiotic stress. In *Food Chemistry*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125914>

**Finger-Teixeira, A., Lucio Ferrarese, M. de L., Ricardo Soares, A., da Silva, D., & Ferrarese-Filho Osvaldo, O. (2010).** Cadmium-induced lignification restricts soybean root growth. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2010.08.021>

**Fischer, E., Cachon, R., et Cayot, N. (2019).** Pisum sativum vs Glycine max, a comparative review of nutritional, physicochemical, and sensory properties for food uses. *Trends in Food Science & Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.11.021>

**Francis, F.J.1970.** Anthocyanins in pears. *Hortscience*, 5 :42.

#### G

**Gallego, Susana M., Pena, L. B., Barcia, R. A., Azpilicueta, C. E., Iannone, M. F., Rosales, E. P., Zawoznik, M. S., Groppa, M. D., et Benavides, M. P. (2012).** Unravelling cadmium toxicity and tolerance in plants: Insight into regulatory mechanisms. *Environmental and Experimental Botany*, 83, 33–46. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2012.04.006>

**Gallego, Susana Mabel, & Benavides, M. P. (2018).** Cadmium-Induced Oxidative and

Nitrosative Stress in Plants. In *Cadmium Toxicity and Tolerance in Plants: From Physiology to Remediation*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814864-8.00010-3>

**Gautam, V., Kaur, R., Kohli, S. K., Verma, V., Kaur, P., Singh, R., Saini, P., Arora, S., Thukral, A. K., Karpets, Y. V., Kolupaev, Y. E., et Bhardwaj, R. (2017).** ROS compartmentalization in plant cells under abiotic stress condition. In *Reactive Oxygen Species and Antioxidant Systems in Plants: Role and Regulation under Abiotic Stress*. [https://doi.org/10.1007/978-981-10-5254-5\\_4](https://doi.org/10.1007/978-981-10-5254-5_4)

**Gene, P., Kapoor, D., Singh, S., Kumar, V., Romero, R., et Prasad, R. (2019).** Antioxidant enzymes regulation in plants in reference to reactive oxygen species ( ROS ) and reactive nitrogen species ( RNS ). *Plant Gene*, 19(October 2018), 100182. <https://doi.org/10.1016/j.plgene.2019.100182>

**Gerasimova, N. G., Pridvorova, S. M., et Ozeretskovskaia, O. L. (2005).** Role of L-phenylalanine ammonia lyase in the induced resistance and susceptibility of potato plants. *Prikladnaia Biokhimiia i Mikrobiologiia*, 41(1), 117–120. <https://doi.org/10.1007/s10438-005-0019-3>

**Gill, S. S., et Tuteja, N. (2010).** Plant Physiology and Biochemistry Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology et Biochemistry*, 48(12), 909–930. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.08.016>

**Gupta, N., Yadav, K. K., Kumar, V., Kumar, S., Chadd, R. P., et Kumar, A. (2019).** Trace elements in soil-vegetables interface: Translocation, bioaccumulation, toxicity and amelioration - A review. *Science of the Total Environment*, 651, 2927–2942. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.10.047>

## H

**Habig, W. H., Pabst, M. J., & Jakoby, W. B. (1974).** Glutathione S transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry*.

**Hartley-Whitaker, J., Woods, C., & Meharg, A. A. (2002).** Is differential phytochelatin production related to decreased arsenate influx in arsenate tolerant *Holcus lanatus*? *New Phytologist*. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2002.00455.x>

**Hashem, A., Abd Allah, E. F., Alqarawi, A. A., Al Huqail, A. A., Egamberdieva, D., & Wirth, S. (2016).** Alleviation of cadmium stress in *Solanum lycopersicum* L. by arbuscular mycorrhizal fungi via induction of acquired systemic tolerance. *Saudi Journal*

*of Biological Sciences*, 23(2), 272–281. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.11.002>

**Hashiguchi, A., et Komatsu, S. (2017).** Chapter 6 - Proteomics of Soybean Plants. In *Proteomics in Food Science*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804007-2.00006-0>

**HE, S., YANG, X., HE, Z., et BALIGAR, V. C. (2017).** Morphological and Physiological Responses of Plants to Cadmium Toxicity: A Review. *Pedosphere*, 27(3), 421–438. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(17\)60339-4](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(17)60339-4)

**Heath, R. L., et Packer, L. (1968).** Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(68\)90654-1](https://doi.org/10.1016/0003-9861(68)90654-1)

**Heyno, E., Klose, C., et Krieger-Liszkay, A. (2008).** Origin of cadmium-induced reactive oxygen species production: Mitochondrial electron transfer versus plasma membrane NADPH oxidase. *New Phytologist*. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02512.x>

**Himabindu, Y., Chakradhar, T., Reddy, M. C., Kanygin, A., Redding, K. E., & Chandrasekhar, T.(2016).** Salt-tolerant genes from halophytes are potential key players of salt tolerance in glycophytes. In *Environmental and Experimental Botany*. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2015.11.010>

**Honma, T., Ohba, H., Kaneko-Kadokura, A., Makino, T., Nakamura, K., et Katou, H. (2016).** Optimal Soil Eh, pH, and Water Management for Simultaneously Minimizing Arsenic and Cadmium Concentrations in Rice Grains. *Environmental Science and Technology*, 50(8), 4178–4185. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b05424>

**Hussain, A., Aqeel, M., Tariq, M., Hayat, K., Asad, M., Ali, N., Ali, M., et Manghwar, H. (2019).** Individual and combinatorial application of *Kocuria rhizophila* and citric acid on phytoextraction of multi-metal contaminated soils by *Glycine max* L. *Environmental and Experimental Botany*, 159(December 2018),23–33. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.12.006>

## I

**Ismael, M. A., Elyamine, A. M., Moussa, M. G., Cai, M., Zhao, X., et Hu, C. (2019).** Cadmium in plants: uptake, toxicity, and its interactions with selenium fertilizers. *Metallomics*, 11(2), 255–277. <https://doi.org/10.1039/c8mt00247a>

**Jajic, I., Sarna, T., et Strzalka, K. (2015).** *Senescence, Stress, and Reactive Oxygen Species*. 393–411. <https://doi.org/10.3390/plants4030393>

**Javed, M. T., Tanwir, K., Akram, M. S., Shahid, M., Niazi, N. K., et Lindberg, S. (2018).** Phytoremediation of Cadmium-Polluted Water/Sediment by Aquatic Macrophytes: Role of Plant-Induced pH Changes. In *Cadmium Toxicity and Tolerance in Plants: From Physiology to Remediation*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814864-8.00020-6>

**Jeena, G. S., Phukan, U. J., et Shukla, R. K. (2017).** Adjustment of plant metabolism against

reactive oxygen species: Past and present. In *Reactive Oxygen Species in Plants: Boon Or Bane - Revisiting the Role of ROS*. <https://doi.org/10.1002/9781119324928.ch12>

**Junglee, S. (2016).** *Implication of NO in the regulation of ascorbate recycling in tomato fruits ( Solanum lycopersicum , cv micro-Tom ) and in response to an environmental stress* To cite this version : HAL Id : tel-01333842.

### K

**Kampfenkel, K., Van Montagu, M., et Inzé, D. (1995).** Extraction and determination of ascorbate and dehydroascorbate from plant tissue. In *Analytical Biochemistry* (Vol. 225, Issue 1, pp. 165–167). <https://doi.org/10.1006/abio.1995.1127>

**Khanna, K., Jamwal, V. L., Kohli, S. K., Gandhi, S. G., Ohri, P., Bhardwaj, R., Abd\_Allah, E. F., Hashem, A., et Ahmad, P. (2019).** Plant growth promoting rhizobacteria induced Cd tolerance in *Lycopersicon esculentum* through altered antioxidative defense expression. *Chemosphere*. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.11.005>

**Kumar, R., Mishra, R. K., Mishra, V., Qidwai, A., Pandey, A., Shukla, S. K., Pandey, M., Pathak, A., et Dikshit, A. (2016).** Chapter 13 - Detoxification and Tolerance of Heavy Metals in Plants. In *Plant Metal Interaction*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803158-2.00013-8>

### L

**Lane, E. A., Canty, M. J., et More, S. J. (2015).** Cadmium exposure and consequence for the health and productivity of farmed ruminants. *Research in Veterinary Science*, 101, 132–139. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2015.06.004>

**Li, H., Luo, N., Li, Y. W., Cai, Q. Y., Li, H. Y., Mo, C. H., & Wong, M. H. (2017).** Cadmium in rice: Transport mechanisms, influencing factors, and minimizing measures. *Environmental Pollution*, 224, 622–630. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.01.087>

**Lichtenthaler, H. K. (1987).** Chlorophylls and Carotenoids: Pigments of Photosynthetic

Biomembranes. *Methods in Enzymology*, 148(C), 350–382.  
[https://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)48036-1](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)48036-1)

**Liu, L., Shang, Y. K., Li, L., Chen, Y. H., Qin, Z. Z., Zhou, L. J., Yuan, M., Ding, C. B., Liu, J., Huang, Y., Yang, R. W., Zhou, Y. H., & Liao, J. Q. (2018).** Cadmium stress in Dongying wild soybean seedlings: growth, Cd accumulation, and photosynthesis. *Photosynthetica*. <https://doi.org/10.1007/s11099-018-0844-2>

**López-Millán, A. F., Sagardoy, R., Solanas, M., Abadía, A., et Abadía, J. (2009).** Cadmium

toxicity in tomato (*Lycopersicon esculentum*) plants grown in hydroponics. *Environmental and Experimental Botany*.  
<https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2008.11.010>

**Lu, Y., Wang, Q. fu, Li, J., Xiong, J., Zhou, L. na, He, S. ling, Zhang, J. qiong, Chen, Z. ai, He, S.gang, et Liu, H. (2019).** Effects of exogenous sulfur on alleviating cadmium stress in tartary buckwheat. *Scientific Reports*. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43901-4>.

## M

**Mahmud, J. Al, Hasanuzzaman, M., Nahar, K., Bhuyan, M. H. M. B., et Fujita, M. (2018).** Insights into citric acid-induced cadmium tolerance and phytoremediation in *Brassica juncea* L.: Coordinated functions of metal chelation, antioxidant defense and glyoxalase systems. *Ecotoxicology and Environmental Safety*.  
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.09.045>

**Mehla, N., Sindhi, V., Josula, D., Bisht, P., et Wani, S. H. (2017).** An introduction to antioxidants and their roles in plant stress tolerance. In *Reactive Oxygen Species and Antioxidant Systems in Plants: Role and Regulation under Abiotic Stress*.  
[https://doi.org/10.1007/978-981-10-5254-5\\_1](https://doi.org/10.1007/978-981-10-5254-5_1)

**Miransari, M. (2016).** 11 - Soybean production and N fertilization. In *Abiotic and Biotic Stresses in Soybean Production*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801536-0/00011-6>

**Mittler, R. (2002).** Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, 7(9), 405–410. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(02\)02312-9](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(02)02312-9)

**Mittler, R. (2016).** *ROS Are Good*. xx, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.08.002>

**Morillo, E., et Villaverde, J. (2017).** Advanced technologies for the remediation of

- pesticide- contaminated soils. *Science of the Total Environment*, 586, 576–597. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.02.020>
- Muñoz, N., González, C., Molina, A., Zirulnik, F., et Luna, C. M. (2008).** Cadmium-induced early changes in O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and antioxidative enzymes in soybean (*Glycine max* L.) leaves. *Plant Growth Regulation*, 56(2), 159–166. <https://doi.org/10.1007/s10725-008-9297-0>
- Nahar, K., Rahman, M., Hasanuzzaman, M., Alam, M. M., Rahman, A., Suzuki, T., et Fujita, M. (2016).** Physiological and biochemical mechanisms of spermine-induced cadmium stress tolerance in mung bean (*Vigna radiata* L.) seedlings. *Environmental Science and Pollution Research*. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7295-8>
- Nakano, Y., et Asada, K. (1981).** Hydrogen Peroxide is Scavenged by Ascorbate-specific Peroxidase in Spinach Chloroplasts. *Plant and Cell Physiology*, 22(May), 867–880. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a076232>
- Naresh, S., Ong, M. K., Thiagarajah, K., Binti, N., Jehan, S., Kunasundari, B., et Lye, H. S. (2019).** Engineered Soybean-Based Beverages and Their Impact on Human Health. In *Non-alcoholic Beverages*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815270-6.00011-6>
- Nemliche, S. (2017).** Oxidative signaling response to cadmium exposure. *Toxicological Sciences*, 156(1), 4–10. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfw222>
- Nignan I. (2017).** (n.d.). *Thème Effets de l' application de la micro -dose de NPK et d' Urée sur les rendements du maïs ( Zea mays L. ) et du soja ( Glycine max ( L. ) Merr. ) et sur le sol au Burkina Faso : Cas des Novembre 2017.*
- Ningjing, H., Peng, H., Hui, Z., Xiaojing, W., Aimei, Z., Jihua, L., et Xuefa, S. (2017).** Geochemical source, deposition, and environmental risk assessment of cadmium in surface and core sediments from the Bohai Sea, China. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(1), 827–843. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7800-0>
- Nocito, F. F., Pirovano, L., Cocucci, M., & Sacchi, G. A. (2002).** Cadmium-induced sulfate uptake in maize roots. *Plant Physiology*. <https://doi.org/10.1104/pp.002659>
- Noctor, G., Mhamdi, A., Chaouch, S., Han, Y. I., Neukermans, J., Marquez-garcia, B., Queval, G., et Foyer, C. H. (2012).** *Glutathione in plants : an integrated overview*. 454–484. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2011.02400.x>
- Nouairi, I., Jalali, K., Essid, S., Zribi, K., et Mhadhbi, H. (2019).** Alleviation of cadmium-

induced genotoxicity and cytotoxicity by calcium chloride in faba bean (*Vicia faba* L. var. minor) roots. *Physiology and Molecular Biology of Plants*. <https://doi.org/10.1007/s12298-019-00681-5>

### P

- Pan, Y., Bonten, L. T. C., Koopmans, G. F., Song, J., Luo, Y., Temminghoff, E. J. M., et Comans, R. N. J. (2016).** Solubility of trace metals in two contaminated paddy soils exposed to alternating flooding and drainage. *Geoderma*, 261, 59–69. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2015.07.011>
- Pérez Chaca, M. V., Vigliocco, A., Reinoso, H., Molina, A., Abdala, G., Zirulnik, F., et Pedranzani, H. (2014).** Effects of cadmium stress on growth, anatomy and hormone contents in *Glycine max* (L.) Merr. *Acta Physiologiae Plantarum*, 36(10), 2815–2826. <https://doi.org/10.1007/s11738-014-1656-z>
- Pourcel, L., Routaboul, J. M., Cheynier, V., Lepiniec, L., et Debeaujon, I. (2007).** Flavonoid oxidation in plants: from biochemical properties to physiological functions. In *Trends in Plant Science*. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2006.11.006>

### R

- Raja, V., Majeed, U., Kang, H., Iqbal, K., et John, R. (2017).** Abiotic stress : Interplay between ROS , hormones and MAPKs. *Environmental and Experimental Botany*, 137, 142–157. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2017.02.010>
- Ramborger, B. P., Ortis Gularte, C. A., Rodrigues, D. T., Gayer, M. C., Sigal Carriço, M. R., Bianchini, M. C., Puntel, R. L., Denardin, E. L. G., et Roehrs, R. (2017).** The phytoremediation potential of *Plectranthus neochilus* on 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and the role of antioxidant capacity in herbicide tolerance. *Chemosphere*, 188, 231–240. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.08.164>
- Ric De Vos, C. H., Vonk, M. J., Vooijs, R., et Schat, H. (1992).** Glutathione depletion due to copper-induced phytochelatin synthesis causes oxidative stress in *Silene cucubalus*. *Plant Physiology*. <https://doi.org/10.1104/pp.98.3.853>
- Rizwan, M., Ali, S., Abbas, T., Adrees, M., Zia-ur-Rehman, M., Ibrahim, M., Abbas, F., Qayyum, M. F., et Nawaz, R. (2018).** Residual effects of biochar on growth, photosynthesis and cadmium uptake in rice (*Oryza sativa* L.) under Cd stress with different water conditions. *Journal of Environmental Management*, 206, 676–683. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.10.035>

- Rizwan, M., Ali, S., Adrees, M., Ibrahim, M., Tsang, D. C. W., Zia-ur-Rehman, M., Zahir, Z. A., Rinklebe, J., Tack, F. M. G., et Ok, Y. S. (2017).** A critical review on effects, tolerance mechanisms and management of cadmium in vegetables. *Chemosphere*, 182, 90–105. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.05.013>
- Rojjanateeranaj, P., Sangthong, C., et Prapagdee, B. (2017).** Chemosphere Enhanced cadmium phytoremediation of *Glycine max* L . through bioaugmentation of cadmium-resistant bacteria assisted by biostimulation. *Chemosphere*, 185, 764–771. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.07.074>
- Romarin, D. S. D. U. (2017).** *Margot Loussouarn-Yvon*.
- Romero-Puertas, M. C., Terrón-Camero, L. C., Peláez-Vico, M. Á., Olmedilla, A., et Sandalio, L. M. (2019).** Reactive oxygen and nitrogen species as key indicators of plant responses to Cd stress. *Environmental and Experimental Botany*, 161, 107–119. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.10.012>
- Ruyskensvelde, V. Van. (2018).** Author ' s Accepted Manuscript stress response in plants. *Free Radical Biology and Medicine*. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.02.032>
- S**
- Saddhe, A. A., Malvankar, M. R., Karle, S. B., et Kumar, K. (2019).** Reactive nitrogen species : Paradigms of cellular signaling and regulation of salt stress in plants . *Environmental and Experimental Botany*, 161(August 2018), 86–97. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.11.010>
- Schützendübel, A., Schwanz, P., Teichmann, T., Gross, K., Langenfeld-Heyser, R., Godbold, D. L., et Polle, A. (2001).** Cadmium-induced changes in antioxidative systems, hydrogen peroxide content, and differentiation in Scots pine roots. *Plant Physiology*. <https://doi.org/10.1104/pp.010318>
- Schützendübel, Andres, et Polle, A. (2002).** Plant responses to abiotic stresses: Heavy metal- induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *Journal of Experimental Botany*. <https://doi.org/10.1093/jxb/53.372.1351>
- Sharma, R., Bhardwaj, R., Handa, N., Gautam, V., Kohli, S. K., Bali, S., Kaur, P., Thukral, A. K., Arora, S., Ohri, P., et Vig, A. P. (2016).** *METAL STRESS IN*

*PLANTS* : <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803158-2.00010-2>

- Shi, G. L., Zhu, S., Bai, S. N., Xia, Y., Lou, L. Q., et Cai, Q. S. (2015).** The transportation and accumulation of arsenic, cadmium, and phosphorus in 12 wheat cultivars and their relationships with each other. *Journal of Hazardous Materials*, 299, 94–102. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.06.009>
- Shi, W., Zhang, Y., Chen, S., Polle, A., Rennenberg, H., et Luo, Z. Bin. (2019).** Physiological and molecular mechanisms of heavy metal accumulation in nonmycorrhizal versus mycorrhizal plants. *Plant Cell and Environment*, 42(4), 1087–1103. <https://doi.org/10.1111/pce.13471>
- Sigel, A., Sigel, H., et Sigel, R. K. O. (2003).** *Cadmium: From Toxicity to Essentiality, Metal Ions in Life Sciences* (Vol. 11). <https://doi.org/10.1007/978-94-007-5179-8>
- Singh, N., Gupta, V. K., Kumar, A., et Sharma, B. (2017).** Synergistic Effects of Heavy Metals and Pesticides in Living Systems. *Frontiers in Chemistry*, 5(October), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fchem.2017.00070>
- Singh, Sarvajeet, Anjum, N. A., Hasanuzzaman, M., Gill, R., Kumar, D., Ahmad, I., Pereira, E., et Tuteja, N. (2013).** Plant Physiology and Biochemistry Glutathione and glutathione reductase : A boon in disguise for plant abiotic stress defense operations. *Plant Physiology et Biochemistry*, 70, 204–212. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.05.032>
- Singh, Shweta, Tripathi, D. K., Chauhan, D. K., et Dubey, N. K. (2015).** Glutathione and Phytochelatins Mediated Redox Homeostasis and Stress Signal Transduction in Plants: An Integrated Overview. In *Plant Metal Interaction: Emerging Remediation Techniques*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803158-2.00011-4>
- Singh, V. P., Singh, S., Tripathi, D. K., Prasad, S. M., et Chauhan, D. K. (2017).** *Role of reactive oxygen species in photophosphorylation and damage to D1 protein : Past and present Role of Reactive Oxygen Species in Photophosphorylation and Damage to D1 Protein : Past and Present • Introduction. October.* <https://doi.org/10.1002/9781119324928.ch9>
- Singleton, V. L., Orthofer, R., et Lamuela-Raventós, R. M. (1999).** Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1)
- Soares, C., Branco-Neves, S., de Sousa, A., Azenha, M., Cunha, A., Pereira, R., et**

**Fidalgo, F. (2018).** SiO<sub>2</sub> nanomaterial as a tool to improve *Hordeum vulgare* L. tolerance to nano-NiO stress. *Science of the Total Environment*. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.12.002>

**Souguir, D. (2009).** *Modifications métaboliques, moléculaires et génotoxicité induites par le cadmium chez Vicia faba*. 1–207. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00725461/>

**Srinivasarao, C., Venkateswarlu, B., Lal, R., et Singh, A. K. (2013).** Sustainable Management of Soils of Dryland Ecosystems of India for Enhancing Agronomic Productivity and Sequestering Carbon. In *Advances in Agronomy* (1st ed., Vol. 121). Copyright © 2013 Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407685-3.00005-0>

### T

**Tabelin, C. B., Igarashi, T., Villacorte-Tabelin, M., Park, I., Opiso, E. M., Ito, M., & Hiroyoshi, N. (2018).** Arsenic, selenium, boron, lead, cadmium, copper, and zinc in naturally contaminated rocks: A review of their sources, modes of enrichment, mechanisms of release, and mitigation strategies. *Science of the Total Environment*, 645, 1522–1553. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.07.103>

**Tadolini, B., Juliano, C., Piu, L., Franconi, F., & Cabrini, L. (2000).** Resveratrol inhibition of lipid peroxidation. *Free Radical Research*. <https://doi.org/10.1080/10715760000300661>

**Talukdar, D. (2017).** Balancing roles of reactive oxygen species in plants' response to metalloid exposure. In *Reactive Oxygen Species in Plants: Boon Or Bane - Revisiting the Role of ROS*. <https://doi.org/10.1002/9781119324928.ch3>

**Terrón-Camero, L. C., Peláez-Vico, M. Á., Del-Val, C., Sandalio, L. M., Romero-Puertas, M. C., et Brouquisse, R. (2019).** Role of nitric oxide in plant responses to heavy metal stress: Exogenous application versus endogenous production. In *Journal of Experimental Botany*. <https://doi.org/10.1093/jxb/erz184>

**Tiwari, S., Tiwari, S., Singh, M., Singh, A., et Prasad, S. M. (2018).** *Generation Mechanisms of Reactive Oxygen Species in the Plant Cell : An Overview - Introduction*.

### V

**Vazquez, A., Recalde, L., Cabrera, A., Groppa, M. D., et Benavides, M. P. (2020).** Does nitrogen source influence cadmium distribution in *Arabidopsis* plants? *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 191(December 2019), 110163.

<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110163>

**Velikova, V., Yordanov, I., et Edreva, A. (2000).** Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants protective role of exogenous polyamines. *Plant Science*, 151(1), 59–66. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(99\)00197-1](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(99)00197-1)

**Veza, M. E., Luna, D. F., Agostini, E., et Talano, M. A. (2019).** Glutathione, a key compound for As accumulation and tolerance in soybean plants treated with AsV and AsIII. *Environmental and Experimental Botany*, 162(November 2018), 272–282.

<https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2019.03.002>

**Vrchotova, B., Mackova, M., Macek, T., et Demnerova, K. (2013).** Bioremediation of Chlorobenzoic Acids. *Applied Bioremediation - Active and Passive Approaches*. <https://doi.org/10.5772/56394>

## W

**Wei, L., Zhang, M., Wei, S., Zhang, J., Wang, C., et Liao, W. (2020).** Roles of nitric oxide in heavy metal stress in plants: Cross-talk with phytohormones and protein S-nitrosylation. *Environmental Pollution*, 259. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.113943>

**Whent, M. (2013).** *Nutraceutical Properties of Soybeans with Modified Traits* (Doctoral dissertation).

**Wójcik, M., Gonnelli, C., Selvi, F., Dresler, S., Rostański, A., et Vangronsveld, J. (2017).** Metallophytes of Serpentine and Calamine Soils – Their Unique Ecophysiology and Potential for Phytoremediation. *Advances in Botanical Research*, 83, 1–42. <https://doi.org/10.1016/bs.abr.2016.12.002>

## Y

**Yadav, S., et Atri, N. (2017).** Reactive oxygen species and response of the Calvin-Benson cycle: An overview. In *Reactive Oxygen Species in Plants: Boon Or Bane - Revisiting the Role of ROS*. <https://doi.org/10.1002/9781119324928.ch8>

**Yadav, S. K. (2010).** Toxicité des métaux lourds dans les plantes : un aperçu du rôle du glutathion et phytochélatines dans la tolérance au stress des métaux lourds des plantes. 76, 167–179. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2009.10.007>

**Yang, L., Han, Y., Wu, D., Yong, W., Liu, M., Wang, S., Liu, W., Lu, M., Wei, Y., et Sun, J. (2017).** Salt and cadmium stress tolerance caused by overexpression of

*the Glycine Max Na*

+ / H + Antiporter ( *GmNHX1* ) gene in duckweed ( *Lemna turionifera* 5511 ).  
*192*(October 2016), 127–135. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.08.010>

**Yoshimura, K., et Ishikawa, T. (2018).** Chemistry and metabolism of ascorbic acid in plants. *Ascorbic Acid in Plant Growth, Development and Stress Tolerance*, 1–23. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-74057-7\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-74057-7_1)

**Yusefi-tanha, E., Fallah, S., Rostamnejadi, A., et Pokhrel, L. R. (2020).** Journal of *Science of the Total Environment*, 136994. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.136994>

## Z

**Zagorchev, L., Seal, C. E., Kranner, I., et Odjakova, M. (2013).** A Central Role for Thiols in Plant Tolerance to Abiotic Stress. 7405–7432. <https://doi.org/10.3390/ijms14047405>

**Zhishen, J., Mengcheng, T., et Jianming, W. (1999).** The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(98\)00102-2](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00102-2)

**Zhu, G., Xiao, H., Guo, Q., Zhang, Z., Zhao, J., et Yang, D. (2018).** Effects of cadmium stress on growth and amino acid metabolism in two Compositae plants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 158(January), 300–308. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.04.045>