



**DEPARTEMENT DE BIOLOGIE**

**MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDE**

Présenté par

**Mehallah Hafidha et Moralent Radia**

Pour l'obtention du diplôme de

**MASTER EN BIOLOGIE**

**Spécialité : Biochimie Appliquée**

**THÈME**

**Les réponses écophysiologicalues de la tomate (*Solanum lycopersicum*  
L.) au stress induit par le cadmium et Decis 25 EC.**

Soutenue publiquement le 03 /07 / 2019

**DEVANT LE JURY**

<b>Président :</b>	<b>REBAI Ouafa</b>	<b>MCA</b>	<b>U. Mostaganem</b>
<b>Examineur :</b>	<b>HENNIA Aicha</b>	<b>MCB</b>	<b>U. Mostaganem</b>
<b>Encadreur :</b>	<b>NEMMICHE Said</b>	<b>Pr.</b>	<b>U. Mostaganem</b>

*Thème réalisée aux laboratoires pédagogiques de Biochimie N° 01 – Microbiologie N° 03  
de l'Université Mostaganem*

**Année universitaire : 2018/2019**

# *Remerciements*

*En préambule à ce mémoire nous remerciant **ALLAH** qui nous aide et nous donne la patience et le courage durant ces longues années d'étude.*

*Nous exprimons nos profonds remerciements à notre encadreur **Mr. NEMMICHE** pour l'aide compétente qu'il nous apporté, pour sa patience, son encouragement et sa disponibilité.*

*Nous voulons vraiment vous remercier car nous avons eus beaucoup de chance de vous avoir comme encadreur. Si aujourd'hui, Nous sommes parvenues à achever notre mémoire, c'est grâce à leurs encadrements et leurs encouragements.*

*Nous remercions t **Mr TOUZOUT Nabil** en tant que CO-Encadreur s'est toujours montré à l'écoute et très disponible tout au long de la réalisation de ce mémoire ainsi pour l'inspiration, l'aide et le temps qu'il a bien voulu nous consacrer.*

*Nous particulièrement reconnaissante à **Madame REBAI** pour l'honneur qu'il nous avons fait d'avoir acceptée la présidence du jury de notre travail.*

*Nous remercions énormément **Madame HENNIA** d'avoir acceptée d'être le rapporteur de ce manuscrit.*

*Nous remercions également **Mr AIT SAADA** et **Mr HALBOUCHE** pour son équipe et pour l'excellent accueil, leur gentillesse et pour tous les très bons moments partagés ensemble qui ont rendu ce stage particulièrement agréable.*

## Table des Matières

Liste des figures .....	ix
Liste des Tableaux .....	xi
Introduction Générale .....	1

### Partie Théorique

#### Chapitre 1. Le Cadmium

Introduction .....	3
1. Les métaux lourds .....	3
2. Le cadmium .....	3
2.1. Définition.....	3
2.2. Les sources du cadmium.....	3
2.2.1. Rejets d'origine industrielle .....	4
2.2.2. Pratiques agricoles .....	4
3. Les effets du cadmium .....	4
3.1. Effets de cadmium sur la santé humaine .....	4
3.2. Effets du cadmium sur les plantes .....	5
3.2.1. Effets sur la croissance et la biomasse .....	5
3.2.2. Effets sur la photosynthèse .....	6
3.2.3. Effets sur la nutrition minérale .....	6
3.3. Le mécanisme de toxicité du cadmium chez les végétaux .....	6
3.3.1. L'absorption.....	6
3.3.2. Le transport .....	7
3.3.3. La distribution.....	7
4. Le mécanisme de tolérance du cadmium chez les végétaux .....	8

#### Chapitre 2. Le stress oxydatif

Introduction .....	9
1. Définition.....	9
1.1. Les formes réactives d'oxygène (ROS).....	9
1.2. Les espèces azotées réactives (RNS).....	9
2. Les sources d'espèces réactives.....	9
2.2. Les sources des RNS.....	10
3. La production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) .....	12

4. Importance des formes réactives de l'oxygène dans la vie d'une plante.....	13
5. Les conséquences du stress oxydatif sur les macromolécules.....	14
5.1. La peroxydation des lipides .....	15
5.2. Modification des protéines .....	16
5.3. L'effet sur les carbohydrates .....	17
5.4. L'effet sur les acides nucléiques.....	17
5.5. L'apoptose .....	17
6. Les systèmes de défenses.....	18
6.1. Les antioxydants enzymatiques .....	18
6.1.1. Superoxyde dismutase (SOD).....	18
6.1.2. Catalase (CAT) .....	18
6.1.3. Ascorbate peroxydase (APX).....	19
6.1.4. La glutathion réductase (GR).....	19
6.1.5. Glutathion S-transférases (GST).....	20
6.2. Les antioxydants non enzymatiques .....	20
6.2.1. Acide ascorbique (vitamine C) .....	20
6.2.2. Glutathion (GSH).....	21
6.2.3. Proline (Pro).....	21
6.2.4. Alpha-tocophérols (vitamine E).....	22
6.2.5. Les caroténoïdes.....	22
6.2.6. Les flavonoïdes .....	22

### **Chapitre 3. Les pesticides**

Introduction .....	23
1. Définition.....	23
2. Classification.....	23
2.1. Classification selon la structure chimique .....	23
2.1.1. Les pesticides organiques.....	23
2.1.2. Les pesticides organométalliques.....	24
2.1.3. Les pesticides inorganiques .....	24
2.1.4. Les biopesticides .....	24
2.2. Classification selon leur cible.....	25
2.3. Classification selon leur persistance dans l'environnement .....	26
3. La dynamique des pesticides .....	26
3.1. Dispersion atmosphérique (ou dérive).....	26
3.2. Réémission et de volatilisation .....	26
3.3. Le relargage de molécules .....	26

4. Les inconvénients des pesticides .....	27
5. Toxicité des pesticides pour les plantes .....	27
5.1. Symptômes de toxicité visibles .....	27
5.2. Effets de toxicité indirecte .....	28
6. Les conséquences d'utilisation des pesticides .....	28
6.1. Effets des pesticides sur la santé humaine .....	28
6.2. Effets des pesticides sur l'environnement .....	29

## **Partie Expérimentale**

### **1. Matériels et méthodes**

1. Objectifs de l'étude.....	30
2. Matériel végétal .....	30
2.1. Présentation de l'espèce.....	30
2.2. Classification .....	30
2.3. Préférences pédo-climatiques et fertilisation.....	31
2.4. Le développement.....	31
2.5. Principales maladies de la tomate.....	31
2.6. La culture de tomate .....	32
3. Culture et conditions de germination .....	32
4. Méthodes d'analyses.....	34
4.1. Etude morphométrie .....	34
4.2. Quantification de la teneur des chlorophylles et caroténoïdes .....	34
4.3. Les marqueurs du stress oxydatif .....	35
4.3.1. Dosage des lipoperoxydes membranaires .....	35
4.3.2. Le peroxyde d'hydrogène .....	36
4.4. Dosage des protéines .....	36
4.5. Détermination de l'activité antioxydant non enzymatique.....	36
4.5.1. Proline .....	37
4.5.2. Dosage des thiols non-protéiques (NPT), glutathion (GSH) et phytochelatine.....	37
4.6. Dosage des phénols et flavonoïdes .....	39
4.6.1. Dosage des flavonoïdes.....	39
4.6.2. Détermination des polyphénols totaux.....	40
5. Analyse statistique.....	40

### **2. Résultats et discussion**

1. Effet de stress induit par Cd et Decis 25 EC sur la croissance .....	41
2. Etude morphométrie .....	41
2.1. L'effet de Cd et Decis 25 EC sur la longueur des parties aériennes et racinaires .....	41
2.2. L'effet du Cd et Decis 25 EC sur le poids frais des parties aériennes et racinaires .....	42
I. Estimation des pigments .....	43
1. Quantification de la teneur en chlorophylles et caroténoïdes .....	43
II. Les marqueurs de stress oxydatif.....	45
1. Effet du Cd et Decis 25 EC sur la teneur de malondialdéhyde (MDA) .....	45
2. Effet de Cd et Decis 25 EC sur le peroxyde d'hydrogène (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ).....	45
III. Effet de Cd et Decis 25 EC sur les protéines .....	46
IV. Détermination de l'activité antioxydant non enzymatique .....	47
1. Effet de Cd et Decis 25 EC sur le taux de Proline.....	47
2. Effet de Cd et Decis 25 EC sur les Thiols non-protéiques (NPT) et Glutathion (GSH) .	48
3. Effet de Cd et Decis 25 EC sur les Phytochelatines .....	49
5. Effet de Cd et Decis 25 EC sur les flavonoïdes et les polyphénols totaux.....	50
<b>Conclusion Générale .....</b>	<b>52</b>
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>53</b>

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 01</b> : Effets du cadmium dans la génération de ROS et RNS .....	5
<b>Figure 02</b> : Voie principale d'absorption et de transport des métaux dans les plantes .....	7
<b>Figure 03</b> : Sites de production des ROS dans les plantes. ....	11
<b>Figure 04</b> : Schéma montrant les principales sources et les différents mécanismes impliqués dans la synthèse du NO .....	12
<b>Figure 05</b> : Les structures de Lewis des principales espèces réactives d'oxygène/azote.....	12
<b>Figure 06</b> : Feuille de chêne montrant (a) les symptômes d'oxydation de la chlorophylle et (b) les nécroses liées à la mort de cellules .....	14
<b>Figure 07</b> : L'effet des espèces réactives de l'oxygène sur les macromolécules .....	15
<b>Figure 08</b> : Processus de La peroxydation des lipides .....	15
<b>Figure 09</b> : Les mécanismes d'oxydation et de réparation des protéines .....	16
<b>Figure 10</b> : Oxydation d'ADN .....	17
<b>Figure 11</b> : Localisation intracellulaire des systèmes antioxydants chez les plantes.....	20
<b>Figure 12</b> : Cycle glutathion redox.....	21
<b>Figure 13</b> : Structures chimiques de quelques exemples de pesticides. Les pesticides de même couleur font partie de la même famille chimique.....	24
<b>Figure 14</b> : Modalités de diffusion des pesticides dans les environnements agricoles .....	26
<b>Figure 15</b> : Plantules de tomate en culture hydroponique.....	33
<b>Figure 16</b> : La réaction de réactif d'Ellman (DTNB) avec le glutathione (GSH).....	38
<b>Figure 17</b> : Aspects morphologiques de plantules de la tomate après 10 jours de traitement 100 $\mu$ M de CdCl <sub>2</sub> .....	41
<b>Figure 18</b> : L'effet du Cd et Decis 25 EC sur la longueur des parties aériennes et racinaires	42
<b>Figure 19</b> : L'effet du Cd et Decis 25 EC sur le poids frais des parties aériennes et racinaires .....	42
<b>Figure 20</b> : Variations des teneurs en chlorophylles ( <i>a</i> , <i>b</i> et totale) et caroténoïdes dans les feuilles de la tomate sous l'effet de stress induit par cd et Decis 25 EC.....	44
<b>Figure 21</b> : L'effet de cd et Decis 25 EC sur la teneur de Malondialdéhyde (MDA). ....	45
<b>Figure 22</b> : L'effet de stress induit par cd et Decis 25 EC sur accumulation de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> dans les feuilles de tomate .....	46
<b>Figure 23</b> : L'effet de stress du Cd et Decis 25 EC sur la teneur en protéines .....	47
<b>Figure 24</b> : Accumulation de proline au niveau des feuilles. ....	47
<b>Figure 25</b> : L'effet du Cd et Decis 25 EC sur le taux de GSH dans les jeunes plants .....	49

<b>Figure 26</b> : L'effet du Cd et Decis 25 EC sur le taux totaux de thiols non protéiques dans les feuilles de tomate .....	49
<b>Figure 27</b> : Estimation des phytochelatines au niveau des feuilles de plante tomate.....	50
<b>Figure 28</b> : L'effet de Cd et Decis 25 EC sur la teneur en flavonoïdes. ....	51
<b>Figure 29</b> : L'effet de Cd et Decis 25 EC sur la teneur en polyphénols.....	51

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 01 :</b> Les principales formes réactives de nitogène.....	10
<b>Tableau 02:</b> Les sources des espèces réactives d'oxygène .....	11
<b>Tableau 03:</b> Les propriétés et réactivités.....	13
<b>Tableau 04:</b> Les plus importants acides aminés modifiés par les ROS.....	16
<b>Tableau 05:</b> Localisation des classes de SOD.....	18
<b>Tableau 06:</b> Exemples de la diversité chimique et fonctionnelle des pesticides.....	25

# Introduction générale

L'accumulation des métaux lourds dus à la pollution de l'environnement, et en particulier par certaines pratiques agricoles où les agriculteurs utilisent des eaux usées et issues d'usines pour l'irrigation de leurs cultures induisent une omniprésence des métaux lourds toxiques. En plus la productivité des cultures dépend en grande partie de l'application de pesticides tels que fongicides, insecticides et herbicides. Il y a environ deux mille pesticides et des ingrédients pesticides actifs sur le marché.

Le cadmium (Cd), par exemple, interfère avec des fonctions de base comme la photosynthèse et l'absorption d'eau et de minéraux. De plus, le Cd pose un risque sérieux pour la santé des animaux et des humains lorsqu'il traverse la chaîne alimentaire ; la toxicité du Cd induit la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), dont le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), qui provoquent des dommages oxydatifs chez les plantes en induisant une peroxydation lipidique et en touchant les autres biomolécules de la cellule.

Les espèces réactives de l'oxygène sont un ensemble de molécules générées par des réductions partielles de l'oxygène moléculaire. La production des ROS est une conséquence inévitable de la vie en condition aérobie, 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 au stress, de défense au pathogènes et de développement.

Les plantes ont développé des systèmes uniques pour se défendre contre les ROS, en régulant les activités des enzymes antioxydants, à savoir : superoxyde dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbate peroxydase (APX) et glutathione réductase (GR) etc. qui diminuent la production des ROS et réduisent les niveaux de peroxyde d'hydrogène, de peroxydation des lipides et de l'électrolyte, ce qui confère une tolérance aux ROS pour les plantes soumises à un stress. En outre, les pesticides ont un impact négatif sur les plantes via l'influence des protéines, des pigments, de la division cellulaire, de l'absorption des minéraux, de la photosynthèse et de la respiration. Les plantes sont exposées aux pesticides intentionnellement ou involontairement. Cela entraîne de nombreux effets directs ou indirects sur leur survie, leur croissance et leur reproduction, ce qui entraîne un changement dans les attributs de la communauté végétale.

Dans cette étude, le matériel végétal utilisé est la tomate (*Solanum lycopersicum* L.) qui appartient à la famille Solanaceae et enregistre une plus forte consommation commerciale parmi les légumes. Elle est considérée comme culture stratégique. C'est une source riche de

nutriments importants, tels que le  $\beta$ -carotène, le lycopène, les flavonoïdes et l'acide ascorbique.

L'objectif de notre présent travail est de mieux comprendre la réponse des plantules de tomate au stress causé par la présence du cadmium et du pesticide. Ainsi, l'effet de ces xénobiotiques sera analysé à différents niveaux :

- L'effet du cadmium et pesticides sur la croissance (la longueur et poids des racines, parties aériennes), la morphologie, les pigments (chlorophylle a, b, totale et caroténoïdes).
- L'effet du cadmium et pesticides sur le métabolisme oxydant (les paramètres du stress oxydant)
- Et les réponses antioxydants non-enzymatiques ont été étudiées (proline, les flavonoïdes et polyphénols) et aussi les métabolites secondaires (GSH, non protéines thiols, phytochelatine).

**Partie I**

**La synthèse**

**bibliographique**

# Chapitre I

## Le Cadmium

**Introduction**

La contamination du sol et les végétaux due à l'accumulation des éléments traces est devenue un problème majeur. De nombreux éléments comme le plomb (Pb), le cadmium (Cd), le chrome (Cr) et le mercure (Hg) sont présents le plus souvent dans l'environnement sous forme de traces. Les plus toxiques d'entre eux sont le cadmium, l'arsenic, le plomb et le mercure. Ils peuvent également être présents dans les végétaux et s'accumuler dans la chaîne alimentaire et entraîner des effets sur la santé humaine (Gupta et *al.*, 2019).

**1. Les métaux lourds**

Les métaux lourds sont définis comme étant les éléments métalliques ayant une densité supérieure à 5 g/cm<sup>3</sup>. Les métaux lourds que l'on retrouve le plus souvent dans le sol sont : le cadmium, le manganèse, le cobalt, le chrome, le cuivre, le plomb, le mercure, le nickel et le zinc.

Certains comme Cu, Fe, Zn, Mn peuvent jouer un rôle essentiel pour les plantes et/ou les animaux, d'autres tels que Cd, As, Pb et Hg sont non essentiels et peuvent entraîner des effets néfastes pour la santé, même en quantités infimes (Fedda, 2016).

**2. Le cadmium****2.1. Définition**

Le cadmium est un métal blanc argenté appartenant à la famille des métaux de transition, avec un numéro atomique de 48 et une masse atomique de 112,4 g/mol. Il n'est pas essentiel au développement des organismes animaux ou végétaux. En revanche, ses propriétés physiques et chimiques, proches de celles du zinc et du calcium, lui permettent de traverser les barrières biologiques et de s'accumuler dans les tissus (Zorrig, 2010).

**2.2. Les sources du cadmium**

Le Cd est un métal lourd d'origine naturelle présent à des concentrations plus élevées en association avec les sols riches en Cd, y compris les schistes, les sédiments lacustres et les phosphorites. Cependant, plus de 90% du Cd dans l'environnement de surface est le résultat de l'industrie et de l'agriculture. Il est considéré comme un des éléments les plus toxiques dans l'environnement, avec un large éventail de toxicité d'organe et une longue demi-vie d'élimination (Lane et *al.*, 2015).

### **2.2.1. Rejets d'origine industrielle**

Le cadmium se retrouve dans les déchets industriels stockés sur des anciennes friches industrielles ainsi que dans les produits en fin de vie comme les batteries et les piles à Cd/Ni et les effluents liquides issus des usines. Les retombées atmosphériques provenant de l'activité industrielle et du trafic urbain favorisent également la pollution des sols et des eaux de surface et souterrains par le cadmium. Ces facteurs représentent la source principale de contamination dans les zones urbaines.

### **2.2.2. Pratiques agricoles**

Les produits chimiques utilisés en agriculture, tel que les fongicides, les insecticides, les herbicides peuvent contenir plusieurs métaux toxiques comme Cu, Cd, Zn et Pb et peuvent donc contribuer à la contamination des terres agricoles. D'autre part, l'utilisation répétée d'eaux usées peut aussi contribuer à l'accumulation de ce métal dans les sols ; en effet, ces eaux contiennent du cadmium à des concentrations plus élevées que les eaux normales (Bounab and Sahli, 2014).

## **3. Les effets du cadmium**

Parmi les métaux lourds, le Cd est relativement mobile dans le sol et peut être toxique pour les plantes et les animaux tandis que pour les êtres humains passent principalement par le cycle de la chaîne alimentaire qui peut causer un certain nombre de troubles (Rizwan et *al.*, 2017). Il agit sur l'homéostasie cellulaire tout en induisant la formation des espèces réactives oxygénées (ROS) et espèces réactives azotés (RNS) (Nemmiche, 2017) (Figure 1).

### **3.1. Effets de cadmium sur la santé humaine**

Le Cd est un métal lourd toxique très puissant et aussi un contaminant environnemental répandu. Les principales voies d'exposition au Cd chez l'homme sont les voies digestives et respiratoires. Les expositions environnementales et non professionnelles proviennent de divers aliments, de l'eau contaminée, de la poussière contaminée et de la fumée du tabac et divers dommages biologiques sont causés par la toxicité du Cd (Nemmiche, 2017). Il est considéré et classé comme un cancérigène humain de classe 1 par le Centre international de recherche sur le cancer, mais il n'est que faiblement génotoxique.

### 3.2. Effets du cadmium sur les plantes

La toxicité du Cd diminue la croissance végétale, la biomasse, la photosynthèse et le rendement, et modifie la nutrition minérale des plantes.

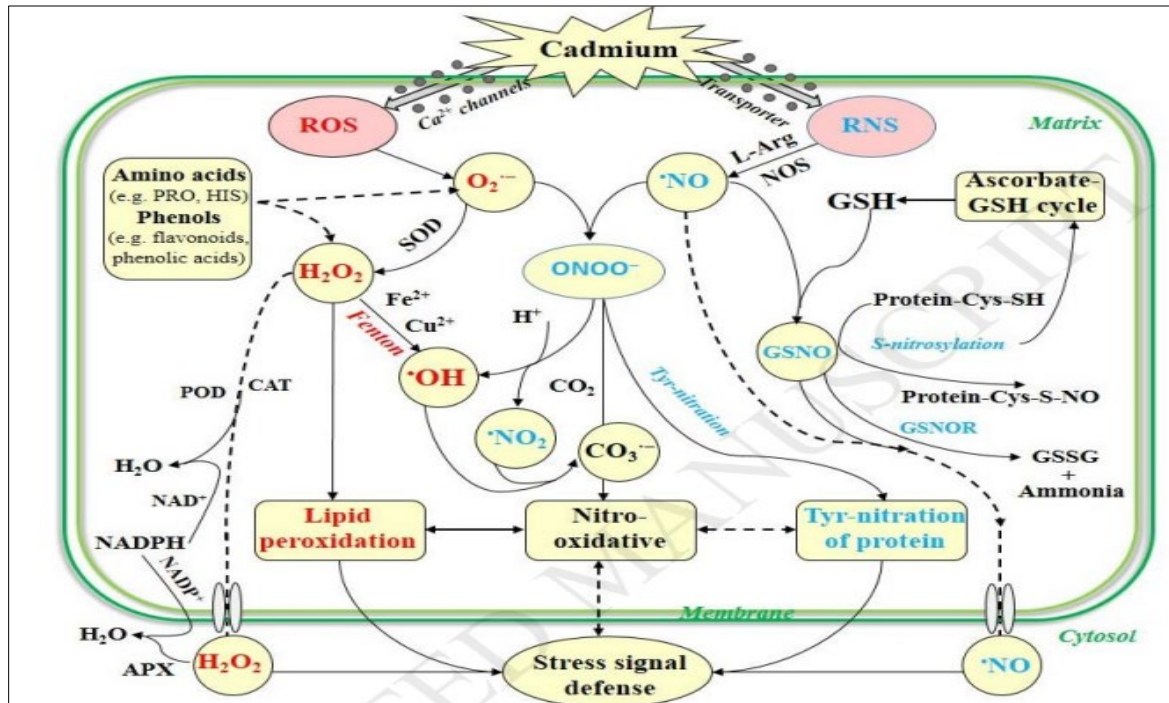


Figure 01. Effets du cadmium dans la génération de ROS et RNS (Liu and Yang, 2017)

#### 3.2.1. Effets sur la croissance et la biomasse

La mesure de la croissance est un paramètre biométrique souvent utilisée pour la détermination d'un éventuel effet phytotoxique des métaux lourds. Dans les conditions environnementales, les métaux lourds pénètrent par les racines où ils causent les premiers dommages, Le Cd affecte négativement la croissance des plantes. Étant très mobile dans le phloème, il peut s'accumuler dans n'importe quelle partie de la plante, ce qui cause un retard de croissance, la chlorose et l'épinastie des feuilles. Il induit également des changements biochimiques dans les racines et les feuilles, comme la lignification des parois cellulaires dans les tissus racinaires et la veine principale des feuilles (Gallego et al., 2012).

Rizwan et al. (2017) rapportent que l'absorption du Cd par les plantes de concombres, stressés à une concentration de 10-mM Cd dans des conditions hydroponiques, a considérablement réduit la longueur de la racine, la surface et l'extrémité des racines par rapport au contrôle.

### 3.2.2. Effets sur la photosynthèse

Ce métal lourd altère l'ultrastructure de chloroplaste et réduit le taux net de photosynthèse, la conductance stomatique et la transpiration des feuilles. En outre, le Cd inhibe la photosynthèse en diminuant la transcription des gènes liés à la photosynthèse (psbA, psaB et rbcL), inactive les enzymes impliquées dans la fixation du CO<sub>2</sub>, induit la peroxydation lipidique et la protéolyse, et perturbe le métabolisme d'azote (N) et du soufre (S) ainsi que les mécanismes antioxydants chez les plantes (Gallego et al., 2012). L'effet du Cd sur l'activité photosynthétique varie selon l'âge des feuilles, et diminue la teneur en chlorophylle chez le pois (*Pisum sativum* L.), soja, tomate, laitue et pomme de terre (Rizwan et al., 2019).

### 3.2.3. Effets sur la nutrition minérale

L'absorption et l'accumulation des différents nutriments dans les légumes peuvent changer considérablement sous le stress Cd. La présence de Cd dans la solution nutritive peut agir sur l'absorption et l'accumulation des éléments nutritifs essentiels pour la croissance des plantes. Dans la plupart des cas, le Cd inhibe l'absorption des cations K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> et Fe<sup>3+</sup> et des anions NO<sup>3-</sup>. Certains signes de toxicité des plantes par le Cd ont été attribués à des perturbations d'origine nutritionnelle (Souguir, 2009).

## 3.3. Le mécanisme de toxicité du cadmium chez les végétaux

Les plantes absorbent les éléments essentiels et non essentiels du sol en réponse à un gradient de concentration et/ou absorption sélective d'ions ou par diffusion. Les racines jouent un rôle significatif dans l'absorption des ions métalliques (Figure 2). L'adsorption des éléments traces à la surface de la racine se produit sous forme cationique avec une paroi cellulaire négative en raison de la présence de cellulose, de pectines et de glycoprotéines qui fonctionnent comme des échangeurs d'ions spécifiques (Gupta et al., 2019).

### 3.3.1. L'absorption

Les métaux lourds toxiques pénètrent dans des cellules végétales par le système de transport impliqués dans l'assimilation micro-nutritive. Particulièrement l'assimilation Cd<sup>2+</sup> arrive par des transporteurs transmembranaires.

Les plantes peuvent absorber le Cd selon sa biodisponibilité et sa concentration, à partir du sol ou de l'eau; assez peu absorbé directement de l'atmosphère. Le Cd fait partie des

éléments qui peuvent s'accumuler dans ces plantes à des niveaux supérieurs à 0,01 % du poids sec des pousses, sans causer de symptômes de toxicité (Gallego et *al.*, 2012).

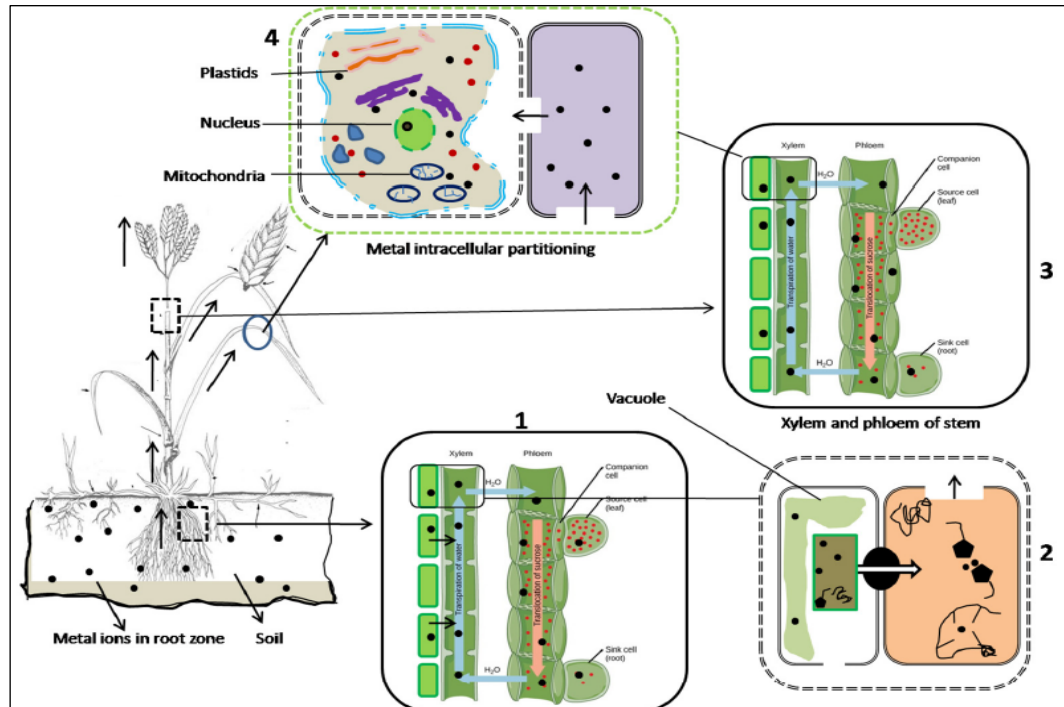


Figure 02. Voie principale d'absorption et de transport des métaux dans les plantes (Dal Corso et *al.* (2014) rapporté par Gupta et *al.* (2019))

### 3.3.2. Le transport

Les transporteurs ZIP-IRT1 sont des transporteurs non spécifiques les mieux étudiés, responsables de l'absorption de fer de haute affinité du sol. Ce sont des protéines de transport à membrane plasmatique. Le Cd peut pénétrer dans les cellules racinaires sous forme de  $Cd^{2+}$  par l'intermédiaire de transporteurs ZIP tels que les orthologues d'At IRT1 et Tc ZNT1/ Tc ZIP4. Il pourrait également pénétrer dans les cellules racinaires sous forme de Cd-chélates par les protéines YSL (Yellow-Stripe 1-Like), qui appartiennent à la superfamille OPT des transporteurs d'oligopeptides (Gallego et *al.*, 2012)

### 3.3.3. La distribution

Les concentrations du Cd sont souvent (mais pas toujours) plus élevées dans les racines que dans les pousses, ce qui suggère que le transport du Cd vers le xylème est limité dans la plupart des plantes et à des teneurs plus faibles dans les graines, fruits et tubercules (Gallego et *al.*, 2012).

#### 4. Le mécanisme de tolérance du cadmium chez les végétaux

Pour faire face au stress abiotique, les plantes ont développés un système immunitaire qui implique principalement des antioxydants enzymatiques et non enzymatiques, et la séquestration des métaux dans des parties métaboliquement inactives telles que les parois des cellules radiculaires et les vacuoles.

La réponse des antioxydants varie selon les génotypes de la même espèce. Par exemple, l'activité de l'ascorbate peroxydase (APX) diminue, tandis que l'activité du glutathion (GSH) augmente chez les génotypes de pois sensibles au Cd (Rizwan et *al.*, 2017).

La séquestration du Cd dans les parois des cellules radiculaires et les vacuoles des feuilles peut être impliquée dans la détoxification du Cd chez les plantes. Toutefois, la séquestration du Cd dans différentes parties métaboliquement inactives varie selon les espèces et les génotypes au sein de la même espèce. Les plantes pourraient tolérer le stress Cd par la production de phytochelatines (PC) dans différentes parties de la plante (Rizwan et *al.*, 2017).

# Chapitre II

## Le Stress oxydatif

## Introduction

D'une manière générale, dans une large gamme de stress métallique provoqué par des xénobiotiques sur des cibles variées, les organismes photosynthétiques subissent souvent un important stress oxydatif lié à une surproduction des espèces réactives oxygénées (ROS).

### 1. Définition

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 ROS et/ou RNS (Nemmiche, 2017). Le stress oxydatif est donc associé à un déséquilibre redox sévère, considéré comme un facteur de stress semblable à la salinité, à la sécheresse et à d'autres facteurs qui peuvent endommager les cellules et/ou déclencher des réactions de signalisation et de défense.

#### 1.1. Les formes réactives d'oxygène (ROS)

Le terme ROS englobe les substances contenant un ou plusieurs atomes activés d'oxygène soit sous forme d'espèces radicalaires ou non radicalaires. Ils sont produits de façon endogène par plusieurs organites et compartiments végétaux, en particulier ceux dont le taux de transport des électrons est élevé comme les chloroplastes, les mitochondries et les peroxysomes. A l'état normal, ils agissent comme messagers cellulaires et régulateurs redox de plusieurs processus biologiques végétaux (Rajaa et *al.*, 2017).

#### 1.2. Les espèces azotées réactives (RNS)

Les espèces azotées réactives (RNS) sont produites dans des conditions stressantes qui conduisent à la contrainte nitrosative. Les RNS sont des dérivés du NO, un composant de signalisation clé dans diverses contraintes et mécanismes de tolérance, et certains d'entre eux sont également impliqués dans le cycle d'azote (Saddhe et *al.*, 2019). Les principaux RNS chez les plantes sont indiqués dans le tableau 1.

## 2. Les sources d'espèces réactives

### 2.1. Les sources des ROS

Les sources de ROS sont à la fois extracellulaires (polluants, xénobiotiques, médicaments, et la radiothérapie) et intracellulaire (Tableau 2). La source principale des ROS (généralement plus de 90%) dans les organismes vivants est la chaîne de transport d'électrons

mitochondriale, du réticulum endoplasmique, membranes plasmiques et nucléaires, et le système photosynthétique (Nemmiche, 2017) (Figure 3).

Tableau 01. Les principaux formes réactives de nitrogène (Saddhe et *al.*, 2019)

<b>Les espèces réactives de l'azote</b>	
NO	Monoxyde d'azote
NO <sub>2</sub>	Dioxyde d'azote
S-nitrosothiols non radicaux	
ONOO	Peroxynitrite
NO <sup>-</sup>	Anion nitroxyle
NO <sub>3</sub>	Nitrate
NO <sup>+</sup>	Cation nitrosonium
N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Trioxyde de dinitrogène
N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	Dinitrogène tétoxure
NO <sub>2</sub> Cl	Chlorure de nitryle
HNO <sub>2</sub>	Acide nitreux

## 2.2. Les sources des RNS

Chez les plantes, le NO est connu comme une molécule bioactive multifonctionnelle. La synthèse de NO endogène (Figure 4) peut se produire dans des organes ou des cellules stressées, et le NO se diffuse à l'intérieur et à l'extérieur des cellules. Certaines études ont indiqué que la synthèse de NO peut se produire en réponse à un stress biotique et abiotique causé par la salinité, la sécheresse, le froid et les métaux lourds. Le NO est biosynthétisé par l'activité de l'enzyme NO synthase (NOS) (Nabi et *al.*, 2019)

Tableau 02. Les sources des espèces réactives d'oxygène (Tandon et al. (2005) rapporté par Gupta et al., 2019)

Métabolisme cellulaire	Environnementale
<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Transport d'électrons mitochondriaux</li> <li>○ Oxydation du réticule endoplasmique</li> <li>○ Activité enzymatique, y compris : diamine oxydase, glycolate oxydase, L-gluconolactone oxydase, L-aminooxydase, monoamineoxydase, NADPH oxydase, tyrosine hydroxylase, xanthine oxydase</li> <li>○ Synthèse de la prostaglandine</li> <li>○ Auto-oxydation de l'adrénaline, acide ascorbique, thiol</li> <li>○ Réduction du FMNH<sub>2</sub>, du FADH, de la riboflavine</li> <li>○ Oxyde nitrique synthase</li> <li>○ Neutrophiles stimulés</li> <li>○ Les cellules phagocytaires activées</li> <li>○ Lésions de reperfusion</li> <li>○ Cytochrome P450</li> </ul>	<p>Drogues</p> <p>Halothène, paracétamol, bleomycine, Doxorubicine, métronidazole, éthanol</p> <p>CCl<sub>4</sub></p> <p>Pesticides</p> <p>Métaux de transition (Cu, Fe)</p> <p>Fumé, le tabac</p> <p>Alcool</p> <p>Radiations</p> <p>Radiations</p> <p>Haute température</p>

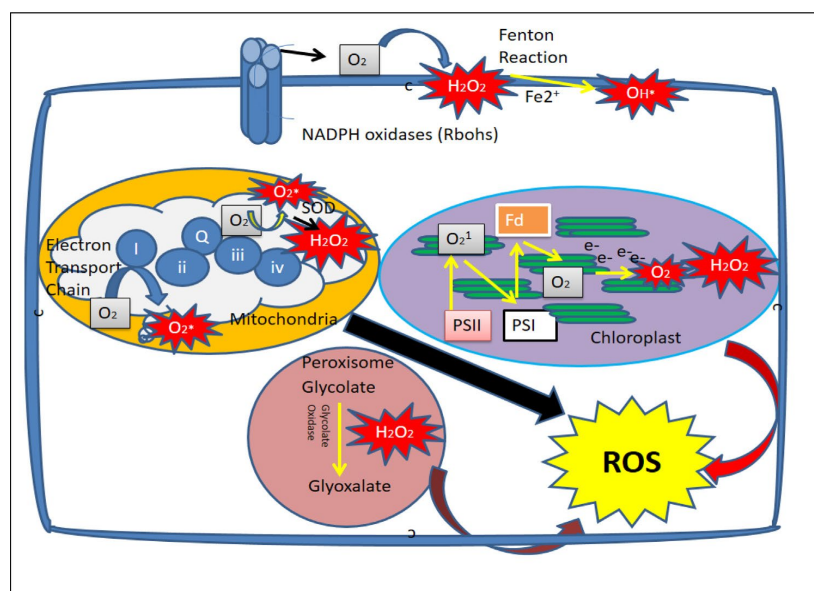


Figure 03. Sites de production des ROS chez les plantes (Rajaa et al., 2017)

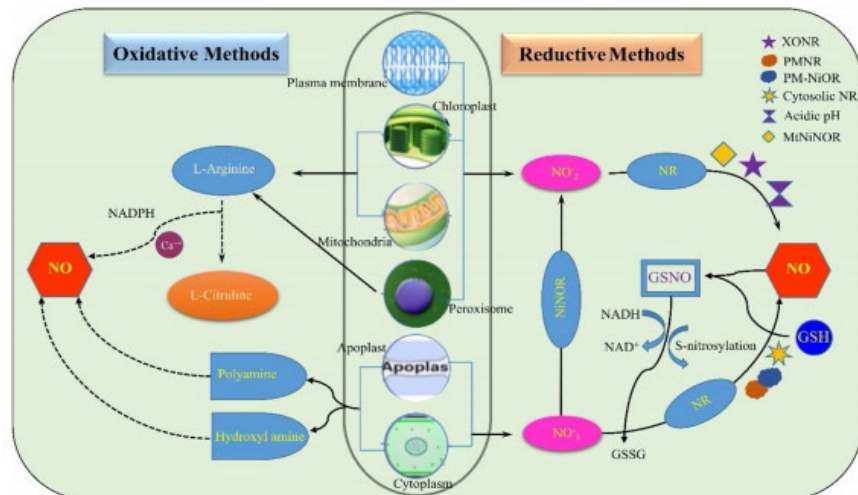


Figure 04. Schéma montrant les principales sources et les différents mécanismes impliqués dans la synthèse du NO (Sahay and Gupta (2017) rapportée par Nabi et *al.*, 2019).

### 3. La production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO)

Il existe plusieurs formes de ROS (Figure 5 ; Tableau 3), forme radicalaire comme le radical superoxyde,  $\text{OH}\cdot$  (radical hydroxyle) et forme non-radicalaire (moléculaire) tel  $\text{H}_2\text{O}_2$  (peroxyde d'hydrogène) et  $^1\text{O}_2$  (oxygène singulet). Les ROS sont des sous-produits inévitables du métabolisme aérobie produit dans divers compartiments cellulaires, y compris les chloroplastes, les mitochondries, les peroxysomes, la membrane plasmatique et l'apoplastie. Les superoxydes et le peroxyde d'hydrogène, les plus abondants, ont des rôles métaboliques et de signalisation importants (Gupta and Igamberdiev, 2015).

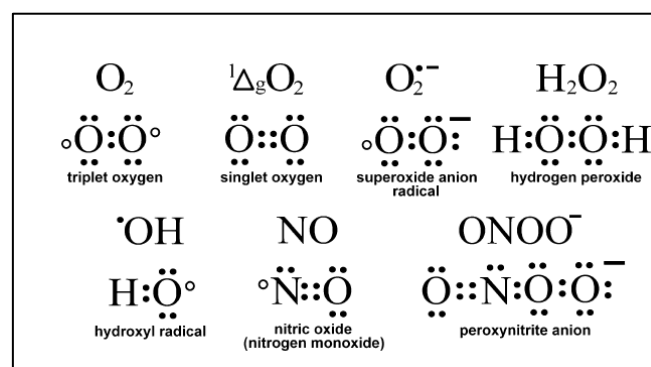


Figure 05. Les structures de Lewis des principales espèces réactives d'oxygène/azote.

(Demidchik, 2015)

Tableau 03. Les propriétés et réactivités des ROS (Mittler, 2016)

ROS	t ½	Distance de migration	Mode d'action	Site de production	Système scavenging
Superoxyde (O <sup>•-</sup> <sub>2</sub> )	1-4 μs	30 nm	Réagit avec les protéines Fe-S Dismutases à H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Apoplaste (RBOH), chloroplastes, mitochondries, peroxysomes, chaînes de transfert d'électrons	SOD, flavonoids, ascorbate..
Radical hydroxyle (OH <sup>•</sup> )	1 ns	1 nm	Extrêmement réactive avec toutes les biomolécules, y compris l'ADN, l'ARN, les lipides et les protéines	Fer et H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (réaction de Fenton)	Flavonoids, proline, glucides, ascorbate,...
Peroxyde d'hydrogène (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	>1 ms	> 1 μm	Réagit avec les protéines en attaquant les résidus de cystéine et de méthionine. Réagit avec les protéines d'hème. Réagit avec l'ADN.	Peroxysomes, chloroplastes, mitochondries, cytosol, apoplaste	APX, CAT, GPX, PER, PRX, ascorbate, glutathione
L'oxygène singulet	1-4 μs	30 nm	Oxyde les lipides, les protéines (résidus de Trp, His, Tyr, Met et Cys) et les résidus de G de l'ADN	Membranes, chloroplastes, Noyaux	Caroténoïdes et tocopherols

#### 4. Importance des formes réactives de l'oxygène dans la vie d'une plante

Les ROS sont depuis longtemps reconnues pour leur importance dans la réponse des plantes aux contraintes environnementales. Certains symptômes observés en situation de stress d'origine biotique ou abiotique (par exemple, blanchiment des feuilles, nécroses) sont la conséquence d'une forte accumulation de radicaux libres oxygénés et d'une altération de l'homéostasie cellulaire. Ces symptômes traduisent à la fois une oxydation de la chlorophylle

au niveau des feuilles, mais aussi la mort par nécrose des cellules isolées ou de groupements de cellules dans les différents tissus végétaux. Ainsi, même si les ROS sont formées au cours du métabolisme normal de la plante, l'augmentation de leur concentration intracellulaire est souvent synonyme de stress (Parent et *al.*, 2008) (Figure 6).



Figure 06. Feuilles de chêne montrant (a) les symptômes d'oxydation de la chlorophylle et (b) les nécroses liées à la mort de cellules (Parent et *al.*, 2008)

De nombreuses études ont montré que les ROS peuvent aussi intervenir dans :

- ❖ Les cascades de signalisation responsables de l'induction et de la régulation de nombreux gènes de défenses (protéines chaperonnes, *Heat Shock Proteins*, enzymes antioxydantes, ascorbate peroxydase (APX), glutathione-S-transférase (GST), et gènes liés à la pathogénèse).
- ❖ Les ROS sont désormais aussi considérées comme agents régulateurs de la mort cellulaire programmée (PCD : *Programmed Cell Death*) chez les plantes.

### 5. Les conséquences du stress oxydatif sur les macromolécules

Le stress oxydatif a un effet réversible ou irréversible induisant une perte complète de certaines activités physiologiques des biomolécules telles que les protéines, les acides polynucléiques, les glucides et les lipides (Figure 7).

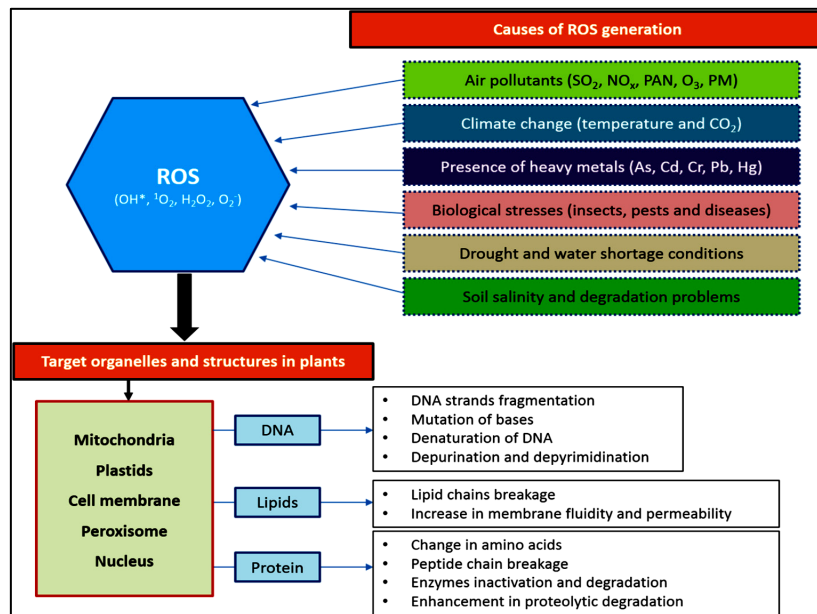


Figure 07. Effets des espèces réactives de l’oxygène sur les macromolécules (Gupta et al., 2019)

### 5.1. La peroxydation des lipides

En condition de stress, les ERO produites attaquent les lipides des membranes pour former un mélange complexe d’hydroperoxydes lipidiques. Ce processus de peroxydation lipidique (Figure 8) a pour conséquence une diminution de la fluidité et l’étanchéité membranaire (Loussouarn-Yvon, 2017).

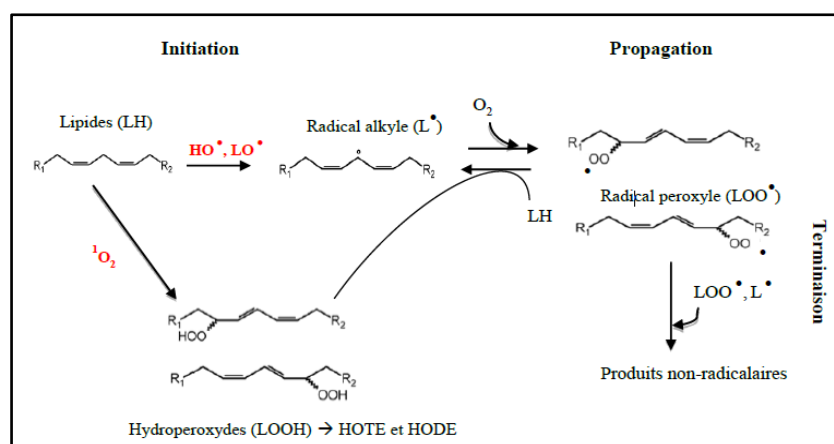


Figure 08. Processus de la peroxydation des lipides (Loussouarn-Yvon, 2017)

5.2. Modification des protéines

Les ROS peuvent oxyder tout résidu d'acide aminé (Tableau 4). Une telle modification de cette composante organique clé de la vie entraîne une perte d'une fonction donnée à médiation protéique, comme des activités métaboliques, structurelles, de transport ou de régulations spécifiques. L'oxydation des protéines entraîne également en cas d'accumulation d'agrégats de protéines toxiques et en cas de dommages graves, l'induction de l'apoptose (Demidchik et *al.*, 2015) (Figure 9). Il a été démontré que les produits de la peroxydation lipidique, tels que la 4-hydroxynonenal et le malondialdéhyde réagit et oxyde un certain nombre d'acides aminés (comme la lysine ou l'histidine) (Demidchik et *al.*, 2015)

Tableau 04. Les plus importants acides aminés modifiés par les ROS  
(Demidchik et *al.*, 2015)

Acide aminé	Forme oxydé
Cystéine	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cystéine ' cystine' cystéine acide sulfinique ' acide cystéique</li> </ul>
Méthionine	<ul style="list-style-type: none"> <li>• R et S stéréo-isomères de méthionine</li> <li>• Sulfoxyde ' méthionine sulfone</li> </ul>
Histidine	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 2-Oxohistidine histidine, asparagine, aspartate,</li> <li>• 4-hydroxynonenal-histidine (HNE-His)</li> </ul>
Glutamyl (glutamine, glutathione, glutamate)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Acide oxalique</li> <li>• Acide pyruvique</li> </ul>

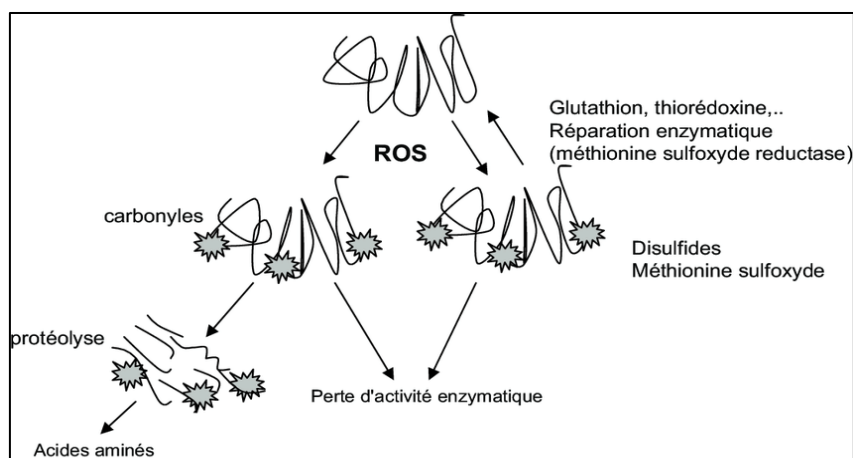


Figure 09. Les mécanismes d'oxydation et de réparation des protéines  
(Bailly et *al.*, 2008)

### 5.3. L'effet sur les carbohydrates

Les glucides sont les molécules biologiques le plus abondant chez les plantes (et sur la planète), et en même temps sont moins étudiés en termes de dommages oxydatifs et de rôle dans le stress et la signalisation. Ils soutiennent et façonnent mécaniquement les cellules végétales (cellulose, pectine, etc.), emmagasinent du carbone réduit (amidon, saccharose, etc.), régulent les activités enzymatiques et la pression osmotique (sucres de faible poids moléculaire), et fournissent une défense antioxydante non enzymatique (flavonoïdes, mannitol, etc.) et jouent d'autres rôles clés. L'oxydation des glucides est potentiellement nocive pour les plantes (Demidchik, 2015).

### 5.4. L'effet sur les acides nucléiques

Les ADN nucléaires, mitochondriaux et chloroplastiques peuvent également être altérés par les ROS. Les ADN des organites énergétiques dépourvus d'histones et à proximité des sources de ROS sont plus sensibles aux dommages oxydants. L'attaque de l'ADN (Figure 10) engendre des délétions de base, la dimérisation des bases pyrimidines, des cassures de brin, des liaisons ADN-protéines et des modifications de bases telles que l'alkylation et l'oxydation. L' $\text{HO}\cdot$  attaque les deux types de bases, purine et pyrimidine, et le squelette de désoxyribose ce qui peut générer des cassures de brins et créer des liaisons ADN-protéines (Loussouarn-Yvon, 2017).

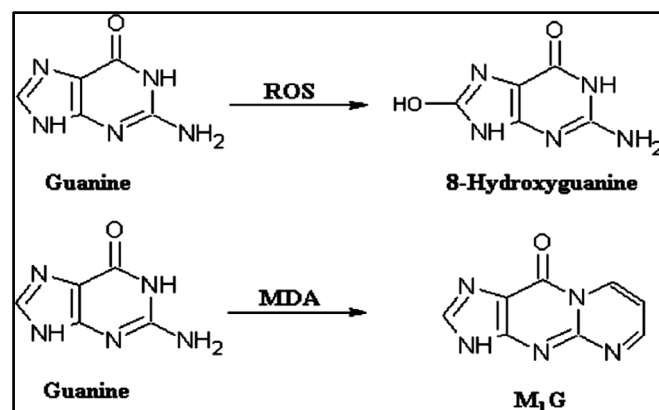


Figure 10. Oxydation de l'ADN (Gill et Tuteja, 2010)

### 5.5. L'apoptose

L'apoptose est une mort cellulaire physiologique, génétiquement programmée, nécessaire à la survie des organismes pluricellulaires. Elle est en équilibre constant avec la

prolifération cellulaire. L'apoptose peut être induit par les ROS qui agissent aussi bien sur la voie mitochondriale que sur la voie des récepteurs de la mort.

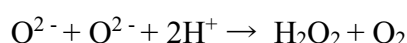
## 6. Les systèmes de défenses

Les plantes ont plusieurs stratégies pour résister au stress oxydatif. Tout d'abord, c'est une activation et une synthèse de novo des antioxydants - enzymes et substances non enzymatiques responsables de balayage direct (élimination) des ROS (Figure 11).

### 6.1. Les antioxydants enzymatiques

#### 6.1.1. Superoxyde dismutase (SOD)

Le SOD est un métallo-enzyme intracellulaire le plus efficace, omniprésent dans tous les organismes aérobies et dans tous les compartiments subcellulaires sensibles au stress des ROS. C'est une enzyme catalysant la dismutation de l'O<sub>2</sub><sup>-</sup> en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et O<sub>2</sub> suivant la réaction :



##### 6.1.1.1. Les classes des SOD

Les SOD sont classés par leurs cofacteurs métalliques en trois types connus (Tableau 5):

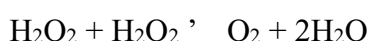
- Le cuivre/zinc (Cu/Zn-SOD)
- Le manganèse (Mn-SOD)
- Le fer (Fe-SOD)

Tableau 05. Localisation des classes de SOD (Gill and Tuteja, 2010)

Les classes de SOD	Localisation
<b>Mn-SOD</b>	-Les mitochondries des cellules eucaryotes - Peroxysomes
<b>Cu/Zn-SOD</b>	- Les fractions cytoplasmiques - Les chloroplastes des plantes supérieures
<b>Fe-SOD</b>	- Associés au compartiment chloroplaste.

#### 6.1.2. Catalase (CAT)

Les CAT sont des enzymes tétramériques contenant un hème, catalysent la dismutation de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> directement en H<sub>2</sub>O et O<sub>2</sub> suivant la réaction :



Ils sont indispensables pour la désintoxication du ROS en situation de stress (Biniek, 2016). C'est une molécule qui peut convertir environ 6 millions de molécules de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en H<sub>2</sub>O et O<sub>2</sub> par minute. Le rôle du CAT est l'élimination des H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produits dans les peroxysomes par les oxydases impliquées dans la β-oxydation des acides gras, la photo-respiration et le catabolisme des bases purines.

### 6.1.3. Ascorbate peroxydase (APX)

L'ascorbate peroxydase (APX) est une enzyme qui catalyse aussi la réduction du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en utilisant l'ascorbate (ASA) comme donneur d'électrons suivant la réaction :



Les APX sont considérées comme étant plus efficaces que les CAT étant donné qu'elles sont distribuées dans toute la cellule et qu'elles ont une meilleure affinité pour H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Das et Roychoudhury, 2014). Les APX constituent une famille de 5 isoformes localisées dans les thylakoïdes, le stroma des chloroplastes et les peroxysomes :

- ✓ Les formes de membrane thylakoïde (tAPX)
- ✓ Le glyoxisome (gmAPX)
- ✓ La forme chloroplaste stromale soluble (sAPX)
- ✓ La forme cytoplasmique (cAPX)

### 6.1.4. La glutathion réductase (GR)

La GR est une flavoprotéine oxydoréductase, localisée dans les mitochondries et le cytosol. C'est une enzyme potentielle du cycle ASH-GSH. Le GR catalyse la réduction du glutathion oxydé (GSSG) en glutathion réduit (GSH), en utilisant du NADPH comme donneur d'électrons. C'est une molécule impliquée dans de nombreuses régulations métaboliques et les processus antioxydants chez les plantes (Biniek, 2016).

#### 6.1.4.1. Localisation

La GR est localisée principalement dans les chloroplastes, mais une petite quantité de cette enzyme a également été trouvée dans les mitochondries et le cytosol (Guill and tuteja, 2010).

### 6.1.5. Glutathion S-transférases (GST)

Le glutathion transférase, anciennement connue sous le nom de glutathion S-transférase (GST, EC 2.5.1.18) forme un groupe vaste et diversifié des enzymes qui catalysent la

conjugaison des xénobiotiques électrophiles avec le tripeptide glutathion (GSH ; gamma-glu-cys -gly) (Gill and Tuteja, 2010).

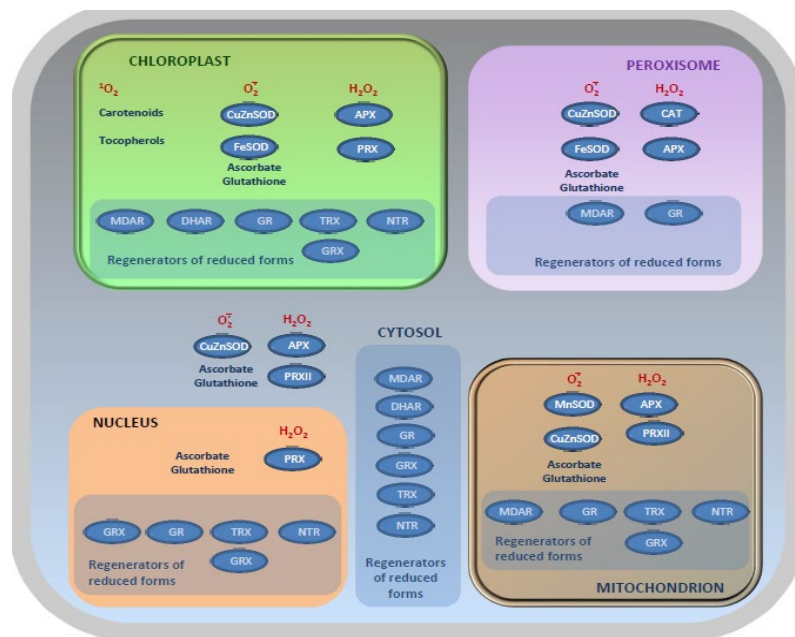


Figure 11. Localisation intracellulaire des systèmes antioxydants chez les plantes (Noctor et *al.*, 2017)

## 6.2. Les antioxydants non enzymatiques

### 6.2.1. Acide ascorbique (vitamine C)

L'acide ascorbique est le plus abondant dans les plantes, puissant et soluble dans l'eau. C'est un antioxydant qui agit pour prévenir ou minimiser les dommages causés par les ROS chez les plantes, est le donneur d'électrons à l'ascorbate peroxydase (APX) (Smirnoff, 2000).

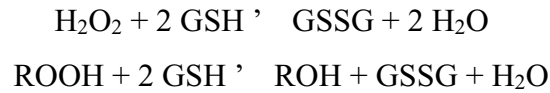
#### 6.2.1.1. Localisation

Il se produit dans tous les tissus végétaux, habituellement plus élevés dans les cellules photosynthétiques et les méristèmes (et certains fruits). Sa concentration est plus élevée dans les feuilles matures.

### 6.2.2. Glutathion (GSH)

Le tripeptide (gamma-glu-Cys-Gly; GSH) est l'un des métabolites présent dans les plantes. Il joue un rôle central dans plusieurs processus (Figure 12), y compris la régulation du transport des sulfates, la transduction des signaux, conjugaison des métabolites, détoxification

des xénobiotiques et l'expression des gènes sensibles au stress. Le GSH peut directement réduire l' $\text{H}_2\text{O}_2$  mais également d'autres ROS, des hydroperoxydes organiques et des peroxydes lipidiques suivant la réaction (Junglee, 2016) :



### 6.2.2.1. Localisation

Il est produit en abondance sous forme réduite (GSH) dans les tissus végétaux et il est localisé dans tous les compartiments cellulaires comme le cytosol, le réticulum endoplasmique, vacuole, mitochondrie, chloroplastes, peroxyosomes ainsi que l'apoplaste (Gill and Tuteja, 2010).

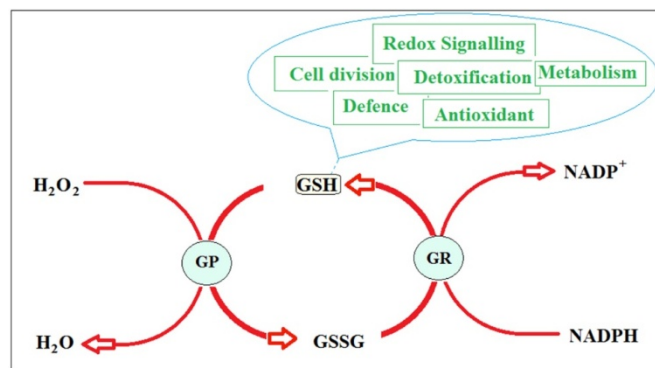


Figure 12. Cycle redox du glutathion (Salbitani *et al.*, 2017)

### 6.2.3. Proline (Pro)

La proline est un acide aminé essentiel pour la synthèse protéique et le métabolisme primaire chez les êtres vivants. Cet acide aminé joue d'autres rôles, non encore totalement élucidés, tels que la stabilisation des protéines, le piégeage des radicaux libres, la régulation du potentiel redox cellulaire, la signalisation cellulaire et la tolérance aux contraintes hydriques. L'accumulation de la proline résulte d'une activation de sa biosynthèse localisée à la fois dans le cytoplasme et dans le chloroplaste chez les plantes et de la répression de son catabolisme dans la mitochondrie (Ben Rejeb, 2015).

### 6.2.4. Alpha-tocophérols (vitamine E)

Le tocophérol est un antioxydant lipophile présent au niveau des membranes. Il existe sous 4 formes :  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ - tocophérol mais c'est l' $\alpha$ -tocophérol qui est considéré comme le

meilleur antioxydant (Das and Roychoudhury, 2014). C'est un scavenger de  $^1\text{O}_2$  au niveau du PSII. Il permet aussi d'arrêter la propagation de l'auto-oxydation des lipides.

#### 6.2.4.1. Localisation

Les tocophérols sont localisés dans la membrane des thylakoïdes et chloroplastes.

#### 6.2.5. Les caroténoïdes

Dans tous les organismes photosynthétiques le bêta-carotène, la zéaxanthine et les tocophérols agissent comme des phytoprotecteurs importants, soit en dissipant l'excitation excessive d'énergie sous forme de chaleur ou par balayage des ROS et suppression de la peroxydation lipidique.

Les caroténoïdes sont des pigments que l'on trouve dans les plantes et les micro-organismes. Il y'a plus de 600 caroténoïdes se produisant dans la nature. Ils sont des lipides antioxydants solubles qui jouent une multitude de fonctions dans le métabolisme des plantes y compris la tolérance au stress oxydatif (Gill and Tuteja, 2010).

#### 6.2.6. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes possèdent de nombreuses fonctions comme la pigmentation des fleurs, des fruits et des graines, protection contre les rayons UV, défense contre les phytopathogènes (micro-organismes pathogènes, insectes, animaux). Ils ont aussi un rôle dans la fertilité des plantes et la germination du pollen, et agissent comme des molécules de signal dans les interactions plantes-microbes (Khan et al, 2017).

Les flavonoïdes sont parmi les métabolites secondaires végétaux les plus bioactifs. La plupart des flavonoïdes surpassent les antioxydants, en localisant et neutralisant les ROS avant qu'ils n'endommagent les cellules.

# Chapitre III

## Les Pesticides

## Introduction

Les plantes terrestres sont continuellement soumises à des fluctuations environnementales et à des stress biotiques et abiotiques. Les pollutions par les xénobiotiques, et en particulier par les pesticides, font partie intégrante de ces contraintes chimiques abiotiques.

### 1. Définition :

Les pesticides représentent une part importante des pollutions environnementales actuelles. Le terme « pesticide » possède une définition étendue, comprenant les « produits phytosanitaires », les « produits phytopharmaceutiques » ou les « biocides ». Il concerne donc toutes les substances naturelles ou synthétiques utilisées pour la prévention, le contrôle ou l'élimination d'organismes (micro-organismes, animaux ou végétaux) jugés indésirables ou nuisibles, non seulement en contexte agricole, mais également dans les domaines de l'hygiène et de la santé publique, de la santé animale et dans les traitements de surfaces non-agricoles (Serra, 2015).

Toutes substances ou mélanges de substances utilisés pour éloigner, détruire ou diminuer tout êtres vivants nuisibles pour l'agriculture, est communément nommé pesticides (CRAAQ, 2016).

### 2. Classification :

Les pesticides peuvent être regroupés de manière différente selon l'aspect sous lequel ils sont étudiés. Ils peuvent être classés en fonction de leur cible, de leur structure chimique, de leur persistance dans la nature, et de leur mode ou mécanisme d'action (Samsidar et *al.*, 2018) (Figure 14).

#### 2.1. Classification selon la structure chimique

En ce qui concerne la classification chimique, on distingue trois catégories :

##### 2.1.1 Les pesticides organiques

Les pesticides organiques sont les plus nombreux. Ils présentent un squelette carboné et appartiennent à diverses familles chimiques selon les atomes constituant la structure de base de la molécule et les fonctions chimiques associées.

### 2.1.2. Les pesticides organométalliques

Les pesticides organométalliques sont principalement des fongicides dont la molécule est constituée d'un complexe entre un métal, tel que le zinc ou le manganèse, et un composé carboné.

### 2.1.3. Les pesticides inorganiques

Ils sont peu nombreux avec absence de carbone dans leur structure. Ils dérivent de composés minéraux stables dans le milieu naturel tels que le soufre et le cuivre (Komárek et *al.*, 2010).

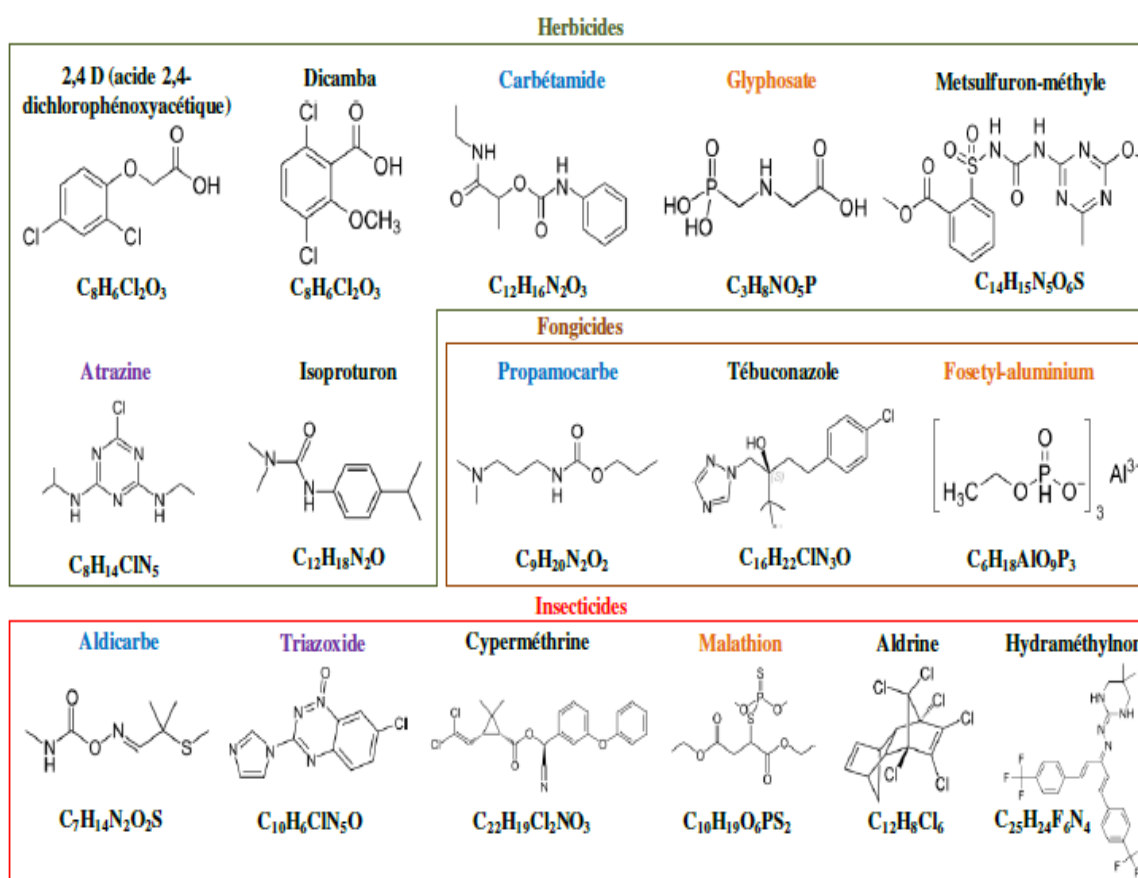


Figure 13. Structures chimiques de quelques exemples de pesticides. Les pesticides de même couleur font partie de la même famille chimique (Serra et *al.*, 2016)

### 2.1.4. Les biopesticides

Les biopesticides sont des matières naturelles dérivées naturellement d'organismes vivants ou de leurs métabolites, comme les bactéries, les champignons, les plantes, etc.

Ces pesticides contiennent des micro-organismes qui agissent comme agents antiparasitaires, comme des bactéries, des champignons ou des virus. Les souches de *Bacillus thuringiensis* et

de ses sous-espèces sont des biopesticides couramment utilisées. Leur mode d'action consiste généralement à produire une protéine qui se lie au récepteur larvaire qui affame les larves.

**2.2. Classification selon leur cible**

D'après leur cible (Tableau 6), les pesticides sont divisés en herbicides désignés pour tuer les mauvaises herbes ; en insecticides pour combattre les insectes ; en fongicides qui luttent contre les champignons ; en acaricides pour tuer les acariens ; en hélicides ou molluscicides pour éradiquer les nématocères ; en rodenticides ou raticides pour combattre les rongeurs vertébrés.

Tableau 06. Exemples de la diversité chimique et fonctionnelle des pesticides (Calvet et *al.*, 2005 ; Komárek et *al.*, 2010 ; Roberts (2000) rapporté par Serra et *al.*, 2016 )

Type	Organismes cibles	Exemples de familles chimiques	Exemples de molécules	Mode d'action
Herbicides	mauvaises herbes	Carbamates	Carbétamide	Blocage des centres organisateurs des microtubules et désorganisation du fuseau Achromatique
		Organophosphorés	Glyphosate	Inhibition de la biosynthèse des acides aminés aromatiques
		Sulfonylurées	Metsulfuron-méthyle	Inhibition de la biosynthèse des acides aminés ramifiés
Fongicides	Champignons parasites des cultures "maladies "	Carbamates	Propamocarbe	Inhibition de la formation des microtubules
		Triazoles	Tébuconazole	Inhibition de la biosynthèse des stérols
		Organophosphorés	Fosétyl-Al	Inhibition de la germination des spores et de la croissance mycélienne
Insecticides	Insectes ravageurs "ravageurs "	Triazines	Triazoxide	Perturbation de la biosynthèse des mélanines
		Pyréthrinoïdes	Cyperméthrine	Perturbation du système nerveux
		Organochlorés	Aldrine	
		Amidinohydrazones	Hydraméthylnon	Perturbation du système respiratoire

### 2.3. Classification selon leur persistance dans l'environnement

Les pesticides sont classés en deux principaux types :

- Les pesticides conservatifs (persistants) organiques non biodégradables tels que les HAPs, PCBs, dioxines, etc.
- Les pesticides non conservatifs (non persistants) biodégradables tels que certains OP, pyrèthrinoïdes, néonicotinoïdes et biopesticides (Belhaouchet, 2014).

### 3. La dynamique des pesticides

La dynamique environnementale des pesticides dépend de différents processus (Figure 15):

#### 3.1. Dispersion atmosphérique (ou dérive)

Lorsqu'une partie des molécules n'atteint pas la cible et reste dans le compartiment atmosphérique, et qu'il y a entraînement par le vent de gouttelettes ou de vapeurs de pesticides hors des parcelles cultivées.

#### 3.2. Réémission et de volatilisation

Il peut avoir lieu après le dépôt du produit à la surface du sol ou des plantes par évaporation de l'eau ou sous l'effet du vent.

#### 3.3. Le relargage de molécules

Au niveau du sol, les molécules provenant de granulats et d'agrégats est l'un des processus majeurs influençant la dynamique des pesticides. L'eau reste le principal moteur de ces transferts, par ruissellement en surface ou en sub-surface, ou en drainage profond vers les nappes phréatiques.

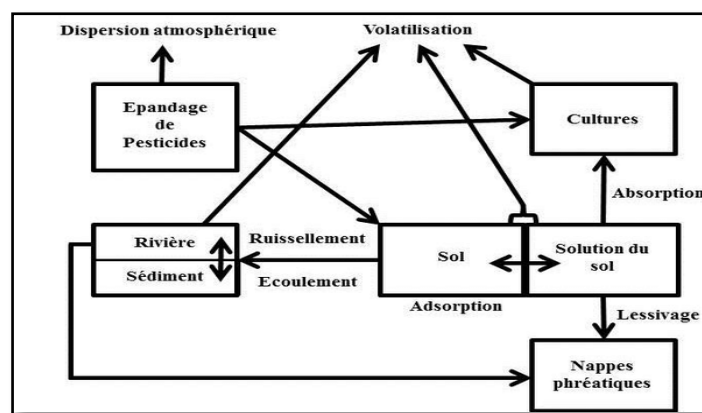


Figure 14. Modalités de diffusion des pesticides dans un environnement agricole (Serra et al., 2016)

L'intensité de ces différents processus est liée aux caractéristiques physico-chimiques des molécules, qui affectent leur affinité pour les différentes phases du milieu et leur prise en charge par les compartiments biologiques. Ces transferts sont aussi affectés par les caractéristiques du sol : texture, perméabilité, saturation en eau, acidité, et surtout teneur en matière organique, avec un rôle prépondérant des acides humiques (Serra, 2015).

#### 4. Les inconvénients des pesticides

Les plantes sont exposées aux pesticides intentionnellement ou involontairement. Cela entraîne de nombreux effets directs ou indirects sur leur survie, leur croissance et leur reproduction, ce qui entraîne un changement dans les attributs de la communauté végétale. La quantité excédentaire de pesticides ajoutés est absorbée par les plantes. :

- **Les herbicides** : affectent la photosynthèse, le système respiratoire, la division cellulaire/nucléaire et la synthèse de protéines/caroténoïdes/lipides. Le 2,4-D est l'herbicide le plus couramment utilisé et le plus étudié.
- **Les organophosphorés (OP)** fonctionnent en entraînant une accumulation excessive d'acétylcholine (ACh) dans les récepteurs cholinergiques du système nerveux périphérique et central des insectes. Par conséquent, d'autres mécanismes comme l'induction du stress oxydatif conduisant à la génération de radicaux libres et à la diminution des antioxydants ou des systèmes de piégeage des radicaux libres par l'oxygène ont été impliqués pour expliquer la toxicité OP (Singh et al., 2016).

#### 5. Toxicité des pesticides pour les plantes

##### 5.1 Symptômes de toxicité visibles

Les communautés végétales sont souvent soumises à une exposition ciblée et non ciblée aux pesticides, et elles manifestent souvent des réactions subtiles mais importantes. La toxicité chimique xénobiotique se manifeste de nombreuses façons à des concentrations faibles et élevées pour produire différentes formes d'effets négatifs visibles chez les plantes.

Des symptômes visibles comme la déformation des pousses et la réduction des dimensions des feuilles, ainsi que la chlorose, sont très visibles lorsque les concentrations de ces produits chimiques sont élevées et que les pigments photosynthétiques diminuent considérablement. La mort complète ou le retard de croissance des plantes non ciblées dû aux pesticides a été signalé, une altération complète du phénotype en réponse aux pesticides (Singh et al., 2016).

## 5.2. Effets de toxicité indirecte

Outre les effets toxiques visibles sus-mentionnés, les scientifiques ont signalé divers effets indirects causés par l'utilisation imprudente des pesticides chez les plantes non ciblées. La conséquence courante de la toxicité xénobiotique est l'accumulation excessive d'espèces réactives de l'oxygène (ROS).

- ✓ **l'oxyfluorène** est capable de réduire la croissance indirectement en générant des ROS, c'est-à-dire de l'oxygène singulet ( $^1\text{O}_2$ ), un radical superoxyde ( $\text{O}_2\bullet^-$ ), le peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) et les radicaux hydroxyles ( $\bullet\text{OH}$ ), l'augmentation de la production des ROS entraîne un stress oxydatif ce qui pourrait éventuellement conduire à une dégradation de la chlorophylle menant à la chlorose.
- ✓ Les effets toxiques des pesticides impliquent également une perturbation biochimique et physiologique, ainsi qu'une perturbation du mécanisme de signalisation.
- ✓ Un autre effet indirect négatif important des pesticides est qu'ils peuvent altérer les interactions concurrentielles entre les espèces, modifiant ainsi la dominance, la richesse et la répartition des espèces, ce qui peut entraîner d'autres effets secondaires négatifs dans l'écosystème (Singh *et al.*, 2016).

## 6. Les conséquences d'utilisation des pesticides

L'utilisation excessive des pesticides dans l'environnement et la présence de leurs métabolites ont des effets néfastes sur la santé humaine et sur tous les autres organismes vivants, Les pesticides sont dangereux pour la santé humaine et l'environnement en raison de leur bioaccumulation.

### 6.1. Effets des pesticides sur la santé humaine

Les résidus des pesticides peuvent être présents dans les matrices alimentaires (légumes et fruits) et dans les matrices environnementales telles que le sol, l'eau et d'autres matrices complexes. Lorsque ces aliments sont consommés, les résidus seront accumulés dans l'organisme. Par exemple, les anomalies congénitales, l'infertilité, l'immunologie, troubles endocriniens et respiratoires sont les divers problèmes de santé résultant de l'exposition aux pesticides. En outre, les pesticides sont impliqués dans des différentes formes de cancers, diabète, et troubles neurodégénératifs (Parkinson, Alzheimer et la sclérose latérale amyotrophique), et d'autres dommages à la santé humaine sont associés à l'exposition aux pesticides (Samsidar *et al.*, 2018).

**6.2. Effets des pesticides sur l'environnement**

Les pesticides ont été considérés comme l'un des plus importants polluants environnementaux. Des mesures considérables devraient être prises indépendamment du fait que les pesticides jouent un rôle important dans l'augmentation du rendement des cultures. Par conséquent, beaucoup de méthodes ont été élaborés afin de déterminer la présence de résidus des pesticides. Leurs application se fait généralement par pulvérisation, et ces substances pourraient être à l'origine d'une contamination des sols, des eaux souterraines et des plantes

**Partie II**  
**Partie**  
**expérimentale**

# Matériel et Méthodes

### 1. Objectifs de l'étude

Cette étude vise à déterminer l'effet des pesticides et du cadmium sur une culture stratégique, la tomate (*Solanum lycopersicum* L.), dans le but de mieux comprendre la réponse des plantules de la tomate au stress causé par la présence du Cd et pesticide isolés, et en combinaison des deux. Ce travail a été réalisé au laboratoire de biochimie de la faculté des sciences de la nature et de la vie de l'Université de Mostaganem au cours de la période du 17 février au 15 mai 2019.

### 2. Matériel végétal

#### 2.1. Présentation de l'espèce

Le matériel végétale utilisé est la plante *Solanum lycopersicum* L. appartenant à la famille des solanacées qui regroupe plus de 3000 espèces, aussi bien alimentaires dont notamment la pomme de terre, la tomate, l'aubergine ou le piment qu'ornementales (pétunia). Certaines espèces, riches en alcaloïdes, sont mondialement connues pour leurs usages médicaux et leurs effets psychotropes (le tabac).

La tomate est une plante herbacée pérenne (dans des conditions climatiques adaptées) mais elle est cultivée comme une plante annuelle dont le développement végétatif se caractérise par une architecture sympodiale.

Elle possède sur ses feuilles et sur ses tiges des trichomes, poils glandulaires sécrétant des substances de défenses (acylglycérols, sesquiterpènes) vis-à-vis d'un grand nombre de ravageurs et de maladies. Le fruit de la tomate est une baie composée d'un péricarpe charnu et une pulpe (placenta) qui renferme les graines.

#### 2.2. Classification

- Règne *Plantae*
- Sous-règne *Tracheobionta*
- Division *Magnoliophyta*
- Classe *Magnoliopsida*
- Ordre *Solanales*
- Famille *Solanaceae*
- Genre *Solanum*
- Espèce *lycopersicum*

### 2.3. Préférences pédo-climatiques et fertilisation

Les tomates aiment les saisons chaudes et craignent le gel à n'importe quel stade de leur croissance. La plage de température optimale pour la culture des tomates est comprise entre 18 et 27 °C. L'humidité relative optimale des cultures sous serre varie de 60 à 80 %. Dans le cas des cultures hydroponiques, l'humidité relative nocturne et diurne se monte en général respectivement à 75 % et 85 %.

D'une part, les tomates sont sensibles aux conditions de faible luminosité. Elles exigent un minimum de 6 heures d'ensoleillement direct pour fleurir. D'autre part elles s'accommodent d'une vaste gamme de sols à condition qu'ils soient bien drainés et structurés.

Les tomates nécessitent une nutrition appropriée. Ainsi, les meilleures cultures sont obtenues sur les sols plus fertiles. Le pH optimal du sol se situe entre 6,0 et 6,5.

### 2.4. Le développement

Le développement du fruit de tomate peut être divisé en trois phases la division, l'expansion et la maturation (Massot, 2010) :

- a) **La division** : au cours du développement de la fleur, une première période de divisions cellulaires a lieu dans l'ovaire, puis la croissance de l'ovaire cesse et ne reprendra qu'après la fécondation, si elle a lieu. La croissance du fruit est principalement due à des divisions cellulaires intenses.
- b) **L'expansion** : pendant la deuxième phase, la croissance du fruit continue principalement par expansion cellulaire jusqu'à ce que le fruit atteigne sa taille finale au stade vert mature.
- c) **La maturation** : La tomate est un fruit climactérique, c'est-à-dire qu'au début de la maturation, la respiration augmente et de l'éthylène est synthétisé en grande quantité, de façon transitoire, lors de la crise ou pic climactérique. Cette maturation s'accompagne de nombreux changements physiologiques et biochimiques conférant au fruit ses propriétés organoleptiques (couleur, texture, goût...).

### 2.5. Principales maladies de la tomate

Des problèmes se posent à la culture de tomate quant à la lutte contre de nombreuses attaques parasitaires qui sont les ravageurs, les virus, les bactéries et les champignons. Ces pathogènes sont capables de développer des résistances suite à l'emploi répété des pesticides.

Parmi les maladies fongiques, on trouve :

- Le mildiou causé par *Phytophthora infestans*.
- L'alternariose dont le mycète responsable est *Alternaria tomatophila*.
- La septoriose causée par *Septoria lycopersici*.

- L'oïdium dû à l'*Oïdium neolycopersici*.
- La fusariose provoquée par *Fusarium oxysporum*.
- La verticilliose causée par *Verticillium alboatrum* et *Verticillium dahliae*.

En fin la moisissure grise causée par *Botrytis cinerea*, qui est une maladie très répandue dans les cultures de tomate sous abris (Vásquez, 2017).

### **2.6. La culture de tomate :**

La tomate demande environ 4 mois de culture, il est préférable de commencer le semis sous abri assez tôt, dès février ou mars afin de pouvoir mettre en terre au mois de mai.

Les tomates hydroponiques sont cultivées dans une solution nutritive plutôt que dans la terre : on les place généralement dans une matière qui ne vient pas du sol et qui peut supporter leurs racines et retenir les nutriments. Faire pousser des tomates de façon hydroponique permet de les faire évoluer dans un environnement contrôlé avec moins de risques de maladies. Une croissance plus rapide et une meilleure récolte de fruits. Il existe une multitude de milieux de culture. Ceux-ci doivent fournir à la plante tous les éléments nutritifs dont elle a besoin. On distingue deux types de milieux, ceux ayant une consistance liquide et servant aux cultures de cellules, et ceux 'solides', ayant la consistance d'un flan, servant aux cultures de tissus, bourgeons, racines ou cals.

### **3. Culture et conditions de germination**

Les graines de tomate (*Solanum lycopersicum* L.var. Sally) ont été obtenues à partir de l'institut technique des cultures maraichères et industrielles (ITCMI) d'Alger. Les graines sont désinfectées à l'hypochlorite de sodium 10% pendant 10 min, puis rincées abondamment à l'eau distillée pour lessiver les produits de conservation ayant adhéré à la graine. Elles sont ensuite mises à germer dans des alvéoles sous conditions contrôlées (température : 24°C jour 16°C nuit, photopériode : 16 h de lumière 8 h d'obscurité) et sous filet afin d'éviter toute contamination par des insectes ou autres ravageurs. Les graines ont été semées dans des bacs à semis de 72 puits contenant du terreau.

#### **▪ Culture hydroponique**

Après 4 jours de germination, les plantules sont repiquées dans des boîtes contenant une solution nutritive Hoagland pour la culture hydroponique. La solution nutritive est renouvelée tous les 3 jours pour éviter les variations de pH et l'épuisement des ions minéraux.

#### **Macroéléments :**

Les macroéléments sont additionnés dans le milieu nutritionnel à des concentrations définies :

KNO <sub>3</sub> .....	100mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	250 mM
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ,4H <sub>2</sub> O.....	500 mM
MgSO <sub>4</sub> ,7H <sub>2</sub> O.....	500 mM

### Oligo-éléments :

Les oligo-éléments, excepté le fer, sont réunis dans une solution mère unique et apportés au milieu nutritionnel aux concentrations finales suivantes :

MnSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O .....	0.5 mM
ZnSO <sub>4</sub> ,7H <sub>2</sub> O.....	0.5 mM
CuSO <sub>4</sub> ,5H <sub>2</sub> O.....	0.1 mM
H <sub>3</sub> BO <sub>4</sub> .....	10 mM
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> .....	0.1 mM
Fe-EDTA.....	20 mM



Figure 15. Plantules de tomate en culture hydroponique.

#### ▪ **Traitement métallique et récolte des plantules**

Les plantules de *Solanum lycopersicum* préalablement cultivés sur une solution nutritive âgées de 10 jours subissent un traitement par CdCl<sub>2</sub> à une concentration de 100 µM et pulvérisés avec un insecticide (Deltaméthrine/ Decis 25 EC) pendant 7 jours. Quarante-vingt-six réplicas ont été maintenus et chaque réplica se composait de 6 plantes.

#### **4. Méthodes d'analyses**

Elles se rapportent aux expériences suivantes :

- Obtention de la poudre de tomate et pelures par séchage à l'étuve à température 25°C.
- Etude morphométrie.
- Estimation des pigments.
- Estimation des activités antioxydants enzymatiques.
- Estimation des activités antioxydants non enzymatiques.
- Les marqueurs du stress oxydatif

### 4.1. Etude morphométrie

Au terme de chaque traitement (10 jours), les plantes âgées de 28 jours sont fractionnées en deux parties : racines et feuilles. Les racines sont lavées dans trois bains successifs d'eau distillée puis séchées entre deux couches de papier filtre. Les lots destinés à l'étude de la croissance sont mis à sécher dans l'étuve à 70°C après avoir pesé leurs masses de matière fraîche et mesuré les longueurs des racines et de la surface foliaire. D'autres lots sont placés immédiatement dans le frigo pour une utilisation ultérieure.

### 4.2. Quantification de la teneur des chlorophylles et caroténoïdes

La chlorophylle est le principal pigment contenu dans les plantes. Elle se trouve dans les chloroplastes des cellules végétales sous forme de couleur verte. Elle est indispensable pour l'activité photosynthétique de la plante pour produire de l'énergie chimique (ATP) à partir de l'énergie lumineuse du soleil. En effet la lumière du soleil est captée par la chlorophylle. On distingue plusieurs formes de chlorophylles (a, b, c, d et f) qui n'ont pas la même structure chimique. Les plus courantes sont les chlorophylles a et b que l'on retrouve chez les plantes supérieures et chez les algues.

L'extraction de la chlorophylle a et b est réalisée selon la méthode de Lichtenthaler (2001). Environ 100 mg de feuilles sont broyées en utilisant un mortier et un pilon et mis dans 5 mL d'acétone 80 %. L'extraction s'effectue dans l'obscurité pour éviter l'oxydations de la chlorophylle par la lumière, 48 h plus tard, on procède à la lecture des densités optiques des solutions avec un spectrophotomètre à trois longueurs d'ondes, 662 nm pour la chlorophylle a, 645nm pour la chlorophylle b et 470 nm pour les caroténoïdes. La détermination des teneurs réalisée selon les formules suivants :

$$C_a (\mu\text{g/ml}) = 12.25 A_{663.2} - 2.79 A_{645.8}$$

$$C_b (\mu\text{g/ml}) = 12.25 A_{645.8} - 2.79 A_{663.2}$$

$$C_{(x+c)} (\mu\text{g/ml}) = (1000 A_{470} - 1.82 C_a - 85.02 C_b)/198$$

### 4.3. Les marqueurs du stress oxydatif

#### 4.3.1. Dosage des lipoperoxydes membranaires

Le dosage du malondialdéhyde (MDA), ou des substances réagissant à l'acide thiobarbituriques (TBARS) est utilisé pour estimer la peroxydation des lipides dans les membranes et les systèmes biologiques.

Le MDA est formé à partir d'une auto-oxydation et d'une dégradation enzymatique des acides gras polyinsaturés dans les cellules, lors d'un stress oxydatif. Le dosage permet donc de mettre en évidence les stress environnementaux pouvant induire une variation de ce niveau d'oxydation des lipides.

##### a. Principe

Un complexe se forme entre le TBA et les composés aldéhydiques, essentiellement le malondialdéhyde (MDA) : TBA-MDA. Le niveau de peroxydation lipidique a été déterminé par la méthode Hodges et *al.* (1999).

##### b. Extraction

Des échantillons de feuilles ou de racines (0,5 g) ont été homogénéisés dans 5 ml d'acide trichloroacétique (TCA) à 10% (p / v) et centrifugé à 3000xg pendant 10 min. Quatre ml de TCA à 20% contenant 0,65% (p / v) du TBA a été ajouté à 1 ml de surnageant. Le broyat est chauffé dans un bain marie à 95°C pendant 25 min. La réaction est arrêtée par un refroidissement immédiat dans un bain de glace. Après centrifugation à 3000xg pendant 10 min, le surnageant est récupéré pour un dosage colorimétrique des lipoperoxydes.

Les produits de peroxydation lipidique, qui réagissent avec le TBA sont principalement le MDA et les endo-peroxydes. L'absorbance du complexe TBA-MDA est mesuré à 440, 532 et 600 nm contre un blanc constitué de tampon d'extraction. La concentration en MDA est calculée en utilisant la formule suivant :

$$\text{MDA } (\mu\text{g/ml}) = 6.54 (A_{532} - A_{600}) - (0.56 * A_{440})$$

#### 4.3.2. Le peroxyde d'hydrogène

Le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a été déterminé selon la méthode de Velikova et *al.* (2000). 100 mg de matière végétale fraîche est broyée dans 1 ml de solution à 0,1% (p / v) d'acide trichloroacétique (TCA), le broyat est ensuite centrifugé à 12 000 xg pendant 15 min.

Le mélange réactionnel contient 1 ml de tampon phosphate de potassium 50 mM (pH 7) et 2 ml de KI et 0,1 ml du surnageant. La densité optique est déterminée à 390 nm, Le dosage est effectué par spectrophotométrie. La concentration de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est calculée en utilisant son coefficient d'extinction molaire ( $\mu=0.28 \mu\text{mol}/\text{cm}$ ).

### 4.4. Dosage des protéines

#### a. Extraction

Le matériel végétal (les feuilles) (0,3 g) été homogénéisé avec 3 ml de tampon phosphate 50 mM glacé (pH 7,8) contenant 0,2 mM d'EDTA et 1% de polyvinylpyrrolidone (p / v) en utilisant un mortier et un pilon pré-refroidis. Le broyat est centrifugé à 4 ° C pendant 20 min à 12 000xg et les surnageants récupérés ont été utilisés pour la détermination des activités enzymatiques antioxydants.

#### b. Protocole de dosage des protéines

Le dosage des protéines est effectué selon la méthode de Bradford (1976). Le principe de cette méthode est basé sur la liaison du Bleu de Coomassie G-250 avec les liaisons peptidiques, les acides aminés aromatiques (tryptophane, tyrosine et phénylalanine) et les résidus hydrophobes des acides aminés présents dans la ou les protéines ce qui entraîne un changement du maximum d'absorption du colorant de 465 nm à 595 nm.

Une aliquote de l'extrait 100  $\mu\text{L}$  est additionnée à 5 mL de 0.01% bleue de Coomassie G-250. 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 BSA.

### 4.5. Détermination de l'activité antioxydant non enzymatique

Un certain nombre de molécules sont capables de réagir chimiquement avec les formes toxiques de l'oxygène afin de les réduire.

#### 4.5.1. Proline

##### a. Principe

La ninhydrine ou hydrate de tricéto-hydrindène réagit avec les acides aminés en donnant un chromophore acides aminés-ninhydrine. Cependant pour la proline la fonction imine fournit une teinte rouge rosé qui présente un maximum d'absorption à 520 nm. Le chromophore proline-ninhydrine est préalablement extrait par du toluène. La quantité de proline présente est conforme à la loi de Beer-Lambert.

### b. Extraction

Le dosage de la proline est effectué selon la méthode de Bates et *al.* (1973). Environ 0.5 g des feuilles homogénéisés dans 10 ml d'acide sulfosalicylique 3 % (p/v) puis l'extrait est filtré sur papier filtre Whatman.

### c. Protocole de dosage

1 mL de surnageant ou de gamme étalon est mélangé avec 1 ml de réactif ninhydrine et 1 ml d'acide acétique glacial. Après 1 h au bain-marie bouillant (100 °C), la réaction est arrêtée par refroidissement dans de la glace. Le mélange est ensuite extrait en ajoutant 2 ml de toluène et en mélangeant pendant 15 à 20 secondes. La phase toluénique est prélevée et son absorbance est lue à 520 nm en utilisant le toluène comme blanc.

La concentration de proline a été déterminée à partir d'une courbe standard et calculée sur la base du poids frais comme suit :

$$\frac{(\mu\text{g proline/ml} \times \text{ml de toluène}) / 115,5 \mu\text{g}/\mu\text{mole}}{[(\text{échantillon g})/5]} = \text{moles proline/g de produit frais.}$$

### 4.5.2. Dosage des thiols non-protéiques (NPT), glutathion (GSH) et phytochelatine

Des feuilles fraîches (0,5 g) ont été homogénéisées dans 2 ml d'acide sulfosalicylique à 5 % (w : v) dans des conditions froides. L'homogénat a été centrifugé à 10 000xg pendant 10 minutes.

#### 4.5.2.1. Dosage des thiols non-protéiques (NPT)

##### a. Principe

Les thiols réagissent avec l'acide 5,5' dithiobis 2-nitrobenzoïque (DTNB) pour former de l'acide 2-nitro-5-thiobenzoïque TNB qui se colore en jaune en milieu alcalin et absorbe à 412 nm (Ellman, 1959). Le chromophore ainsi créé suit la loi de Beer-Lambert. La quantification des thiols est effectuée en utilisant une courbe d'étalonnage réalisée en présence de glutathion (-glutamyl -cysteinyl-glycine) réduit. La mesure en spectrophotométrie se fait assez rapidement car les groupements R-SH s'oxydent en peu de temps en milieu alcalin.

**b. Protocole de dosage**

La mesure de la teneur en thiols non protéiques a été mesurée selon la méthode de Sedlak et Lindsay (1968). Les échantillons ont été homogénéisés dans 0.002 M EDTA dans un bain de glace. Des aliquotes de 5 ml des homogénats ont été mélangées avec 4 ml d'eau distillée et 1 ml de TCA à 50 %. Après 15 min d'incubation, les mélanges ont été centrifugés pendant 15 min. Deux ml du surnageant a été mélangé à 4 ml de tampon Tris 0.4 M (pH 8.9) et à 0.1 ml de DTNB. L'absorbance a été lue en l'espace de 5 min à une longueur d'onde de 412 nm contre le blanc.

**4.5.2.2. Détermination de la teneur en glutathion réduit (GSH)**

Le dosage du glutathion réduit (GSH) est réalisé par une méthode colorimétrique par le réactif d'Ellman (DTNB). La réaction consiste à couper la molécule d'acide 5,5 dithiodis-2-nitrobenzoïque (DTNB) par le GSH, ce qui libère l'acide thio-nitrobenzoïque (TNB) selon la réaction suivante :

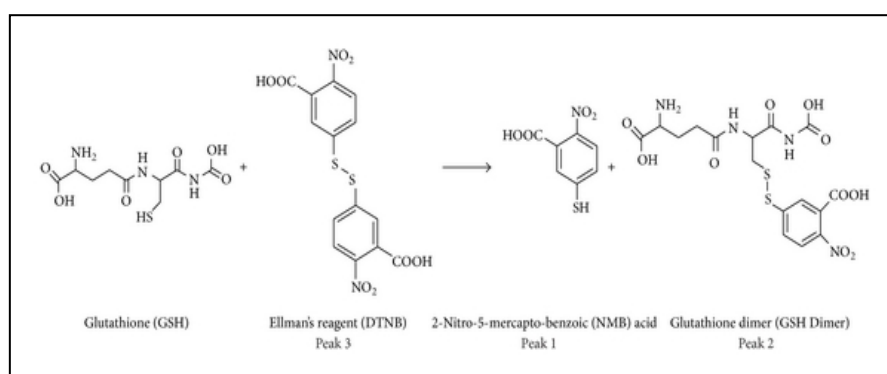


Figure 16. La réaction de réactif d'Ellman (DTNB) avec le glutathione (GSH) (Appala, 2016)

La teneur en GSH a été déterminée par spectrophotométrie selon la méthode d'Ellamn (1959). Le GSH est oxydé dans 2,6 ml d'un tampon phosphate de sodium (pH 7,0) contenant 0.2 ml d'extrait d'échantillon et 0,2 ml d'acide 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoïque) à 6 mM. La réaction est suivie par l'évolution de l'absorbance à 412 nm. La teneur en GSH a été déterminé en utilisant le coefficient d'extinction. ( $\mu = 1.3 \cdot 10^4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )

**4.5.2.3. Estimation des teneurs en phytochelatines**

Les concentrations totales de phytochalatines ont été calculées en soustrayant la quantité de GSH de la quantité totale TNP selon la méthode De Vos et al. (1992).

PC =	SHT	-	GSH
Phytochelatines	Thiols non-protéiques		Glutathion réduit

### 4.6. Dosage des phénols et flavonoïdes

Pour déterminer la teneur totale en phénol (Singleton et Rossi, 1965), des échantillons de feuilles séchées (400 mg) ont été chauffés dans de l'éthanol à 60 % (40 mL) pendant 10 minutes à 60°C et filtrés. Le résidu a été extrait de nouveau en suivant la même procédure. Les filtrats ont été recueillis et le volume final a été porté à 100 mL par addition de 60 % d'éthanol.

#### 4.6.1. Dosage des flavonoïdes

Les flavonoïdes, classe importante des polyphénols, sont reconnus pour leurs nombreuses activités biologiques telles que : les activités antivirales, anti-inflammatoires et anticancéreuses. Ces activités sont attribuées en partie à la capacité de ces composés naturels à piéger les radicaux libres. Leur activité antioxydant en tant que piègeurs de radicaux libres et également en tant qu'inhibiteurs d'enzymes responsables de la formation de ces espèces nocives (Favier, 2005).

##### - Protocole de dosage :

L'analyse quantitative des flavonoïdes est réalisée par une méthode spectrophotométrique selon la méthode décrite par Woisky and Salatino (1998). Un mélange réactionnel composé de 250 µL de surnageant et 75 µL de nitrate de sodium  $\text{NaNO}_2$  à 5 % (m/v) incubé pendant 5 minutes puis 150 µL de trichlorure d'aluminium  $\text{AlCl}_3$  à 10 % (m/v) est ajouté. Après 6 min de réaction, l'addition de 500 µL de soude  $\text{NaOH}$  (1M) donne une coloration rose qui absorbe à 510 nm. La teneur en flavonoïdes de l'extrait éthanoïque est déterminée par interpolation à l'aide d'une courbe étalon réalisé par la quercétine.

#### 4.6.2. Détermination des polyphénols totaux

Chez les végétaux, à côté des métabolites primaires classiques (glucides, protides, lipides et acides nucléiques), ils accumulent des métabolites dits « secondaires ». Ces métabolites jouent souvent un rôle de défense de la plante qui les fabrique. Une des caractéristiques des composées phénoliques qu'ils partagent avec l'ensemble des métabolites secondaires est de montrer une répartition très inégale chez les différentes espèces, et, pour une même espèce, selon la variété et le stade d'évolution physiologique.

##### - Protocole de dosage

Le dosage des polyphénols totaux est réalisé selon la méthode décrite par Singleton et *al.* (1999). A 20 µL du surnageant : 1.58 mL d'eau distillée, et 100 µL de réactif de Folin - ciocalteau ont été ajoutés. Après 8 min de réaction, 300 µL de solution de carbonate de sodium  $\text{NaCO}_3$  (7.5 %) est ajoutée. La lecture de l'absorbance a été réalisée à 765 nm à l'aide

d'un spectrophotomètre (UV-visible) après 2h d'incubation à température ambiante. La détermination de la teneur en polyphénols a été faite en se référant à un courbe étalon dressé à partir d'une série de solutions filles d'acide gallique.

### **5. Analyse statistique**

L'analyse statistique est réalisée par le logiciel SPSS (version 22.0). Elle comprend une analyse de variance ANOVA et test 'Tukey'. Une différence significative est jugé à  $p < 0.05$ .

# Résultats et discussion

### 1. Effet de stress induit par Cd et Decis 25 EC sur la croissance

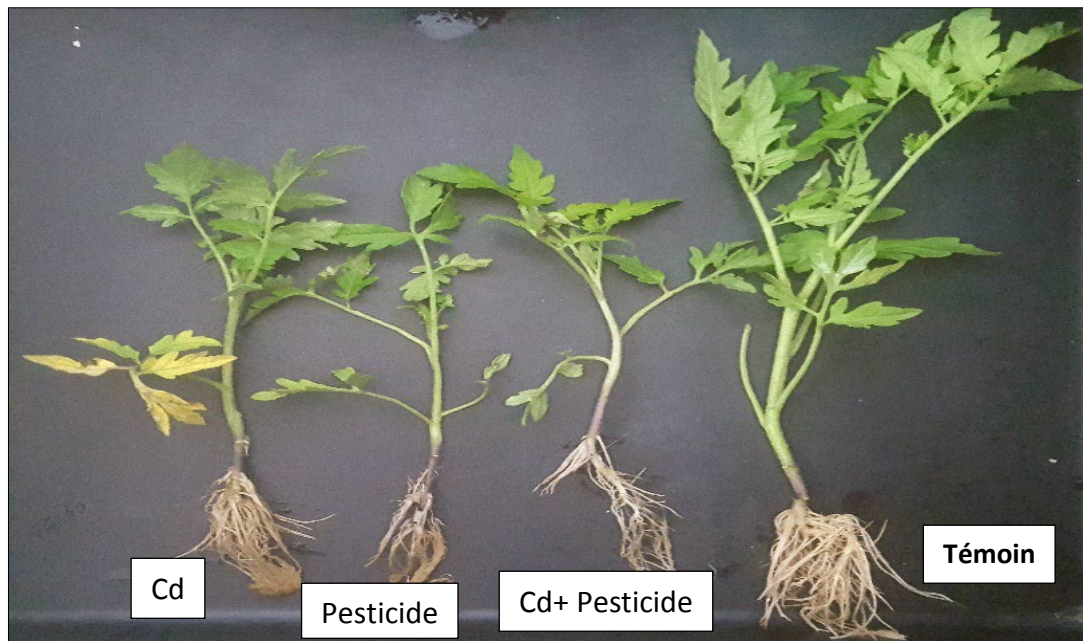


Figure 17. Aspects morphologiques de plantules de la tomate après 10 jours de traitement  $100 \mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$  et  $500 \mu\text{M}$  de Decis 25 EC.

Les plantules de la tomate traitées par  $100 \mu\text{M}$  de Cd,  $500 \mu\text{M}$  pesticides et la combinaison entre les deux montrent un retard dans le développement des feuilles. De même, la dose de  $\text{CdCl}_2$  provoque une inhibition de la croissance racinaire. Au niveau phénotypique, on observe un brunissement du système racinaire, une diminution de la taille des racines et un jaunissement au niveau des feuilles secondaires après 10 jours d'exposition au stress.

### 2. Etude morphométrie

#### 2.1. L'effet de Cd et Decis 25 EC sur la longueur des parties aériennes et racinaires

Les résultats de l'analyse de variance indiquent que le stress n'entraîne pas un effet significatif sur la croissance des pousses, spécifiquement sur la longueur (Fig. 18) et le poids des racines (Fig. 19), mais favorise un effet significatif sur la longueur et le poids des parties aériennes ( $P < 0.001$ ). Les résultats ont également indiqué qu'il y a une réduction au niveau de la longueur des racines en comparaison avec le contrôle non traité, environ 11% sous le Cd/pesticide, suivie de 14% sous pesticide seul, et 26 % sous pesticide seul.

Le stress réduit la longueur des parties aériennes de 9%, 19%, et 31% sous l'effet du Cd/pesticide, pesticide, et cadmium, respectivement.

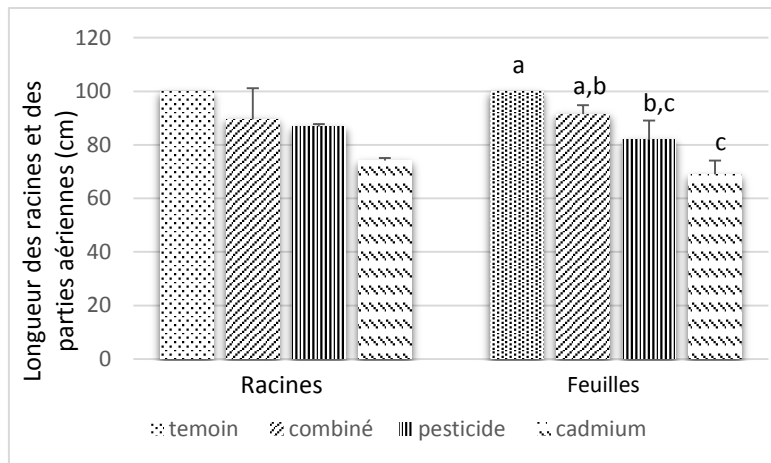


Figure 18. L'effet du Cd et Decis 25 EC sur la longueur des parties aériennes et racinaires. Les valeurs sont les moyennes de 3 répétitions. Des lettres différentes pour chaque longueur indiquent une différence significative à  $p < 0,05$

## 2.2. L'effet du Cd et Decis 25 EC sur le poids frais des parties aériennes et racinaires

L'exposition au stress augmente le poids frais des racines de 31 % et légèrement le poids des feuilles 6 % sous l'effet du pesticide seul. Une diminution a été observée dans le poids frais des racines sous l'effet combiné (estimé à 27%), et des feuilles de 48%. Le poids des feuilles est affecté d'une diminution de 20 % tandis que des racines diminuent légèrement de l'ordre de 8% en comparaison avec le contrôle non traité.

Cet effet sur la longueur s'accorde avec l'étude de Zhao et *al.* (2018) qui montre qu'après exposition du *Zea mays* L. au stress pendant 21 jours par Chlorsulfuron et cadmium à des concentrations de 0.001 et 5.0 mg kg<sup>-1</sup>, respectivement, la longueur des racines et parties aériennes sont réduits significativement.

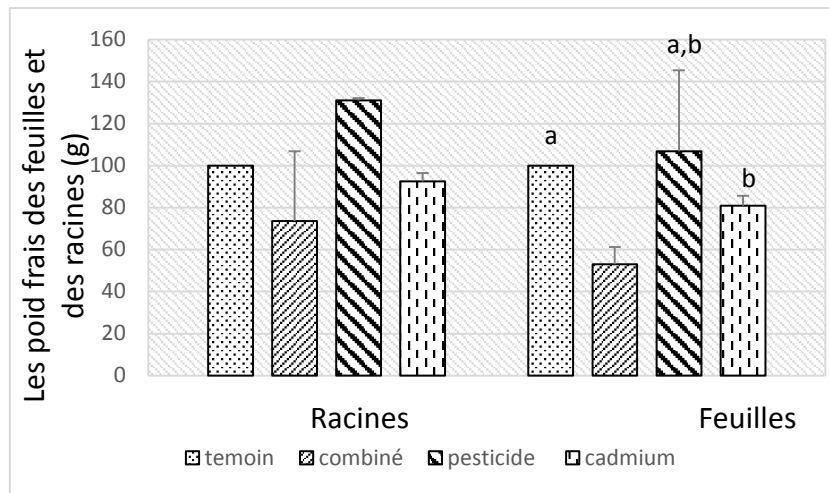


Figure 19. L'effet de cadmium et Decis 25 EC sur le poids frais les parties aériennes et racinaires. Des lettres différentes pour chaque poids indiquent une différence significative à  $p < 0,05$ .

## I. Estimation des pigments

### 1. Quantification de la teneur en chlorophylles et caroténoïdes

La teneur en chlorophylles est souvent utilisée pour évaluer l'impact de nombreux stress environnementaux. L'application du pesticide Decis 25 EC et du Cd seul ou en combinaison entraîne un effet significatif sur les teneurs des pigments photosynthétiques « la chlorophylle a, b, totale et caroténoïdes » (Fig. 20).

Les analyses comparatives montrent qu'il existe des différences significatives au niveau de la chlorophylle a en comparaison avec le contrôle non traité, il y'a une différence significative ( $P < 0.001$ ) entre témoin/combiné, suivie par témoin /pesticide ( $P < 0.002$ ), ensuite entre témoin/cadmium ( $P < 0.030$ ). Une différence significatif remarquable aussi entre combiné/cadmium ( $P < 0.005$ ) et entre pesticide/cadmium ( $P < 0.021$ ). Une diminution significative ( $P < 0.001$ ) a été enregistrée sous Cd/pesticides 50%, suivi par le pesticide seul 15 % et de Cd seul 20%.

Au niveau de la chlorophylle b, la différence significative a été observée entre le témoin/pesticide ( $P < 0.014$ ). Une diminution significative ( $P < 0.019$ ) a été observée sous pesticide seul 69 %, suivie par Cd/pesticides 36%, pour le Cd seul la chlorophylle b diminue de 39%.

Le contenu en chlorophylle totale, une différence significative au niveau du témoin/combiné ( $P < 0.005$ ), suivie par témoin/pesticide ( $P < 0.003$ ), enfin le témoin/cadmium ( $P < 0.026$ ). Une

baisse significative ( $P < 0.009$ ) le contenu en chlorophylle totale de pesticide seul 54%, suivie par Cd /pesticide 44%, le Cd seul entraîne un effet significatif avec une diminution de 30%.

Une différence significative a été enregistrée au niveau des caroténoïdes entre témoin/pesticide ( $P < 0.040$ ), et cadmium /pesticide ( $P < 0.018$ ). Une augmentation significative a été observée beaucoup plus sous pesticide seul de 100%, une diminution pour Cd/pesticide de 14 % et une diminution de 51% sous l'effet de Cd seul.

Le contenu en chlorophylle a, b, et totale ont montré une tendance similaire après exposition au Cd et pesticide, seul ou combiné. Ces résultats sont en concordance avec les travaux d'Ahammed *et al.* (2013) observés chez la tomate stressée par 100 $\mu$ M phenanthrene (PHE) et 100 $\mu$ M Cd pendant 40 jours, montrent que l'application du Cd seul était plus phytotoxique que l'application du pesticide seul tandis que leur combinaison induit une légère amélioration de l'activité photosynthétique et de la teneur en pigments. La teneur en chlorophylle due au Cd (150  $\mu$ M) est conforme aux conclusions de l'étude d'Ahmad *et al.* (2011) et Khan *et al.* (2015), qui ont signalé une diminution significative de la teneur en chlorophylle du *Brassica juncea*.

Accumulation de métaux lourds entraîne une réduction de la synthèse des pigments chlorophylliens en modifiant les intermédiaires biosynthétiques de la chlorophylle, et donc le fonctionnement du complexe de protéines pigmentaires (Ahanger *et al.*, 2016).

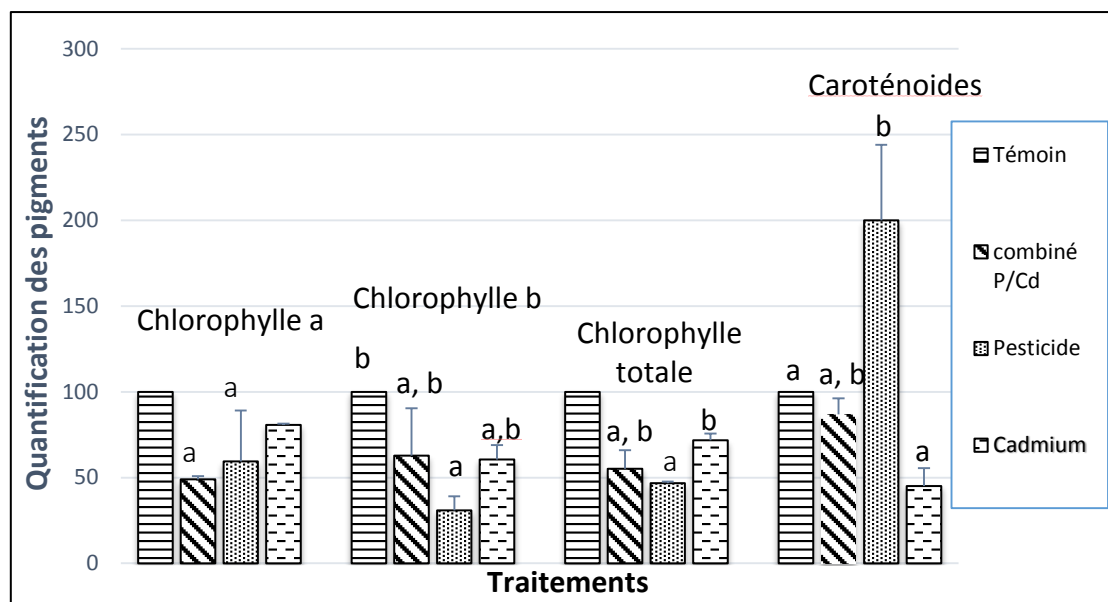


Figure 20. Variations des teneurs en chlorophylles (a, b et totale) et caroténoïdes dans les feuilles de la tomate sous l'effet de stress induit par cd et Decis 25 EC. Les valeurs sont les moyennes de 3 répétitions. Des lettres différentes pour chaque pigment indiquent une différence significative à  $p < 0,05$ .

## II. Les marqueurs de stress oxydatif

### 1. Effet du Cd et Decis 25 EC sur la teneur des malondialdéhydes (MDA)

Dans cette étude, l'induction du stress oxydatif a été évaluée par le niveau de ces principaux biomarqueurs, tel le MDA. Nos résultats ont montré que le stress oxydatif des subi par la tomate s'est manifesté par un effet non significatif sur la teneur en MDA (Fig. 21). Tous les traitements sont homogènes.

Nos résultats étaient en accord avec Zhao et al. (2018) qui montre qu'après exposition du *Zea mays* L. au stress par Chlorsulfuron et cadmium à 0.001 et 5.0 mg kg<sup>-1</sup>, respectivement pendant 21 jours, on n'observe aucun effet sur MDA. De plus, il n'y a pas eu d'interaction entre le chlorsulfuron et Cd sur le contenu MDA. Par contre, ceux du Hashem et al. (2015) montre que le stress induit par le Cd (150 µM) sur *Solanum lycopersicum* a provoqué des changements significatifs dans la croissance et sur la teneur du malonaldéhyde (MDA) après 40 jours d'exposition.

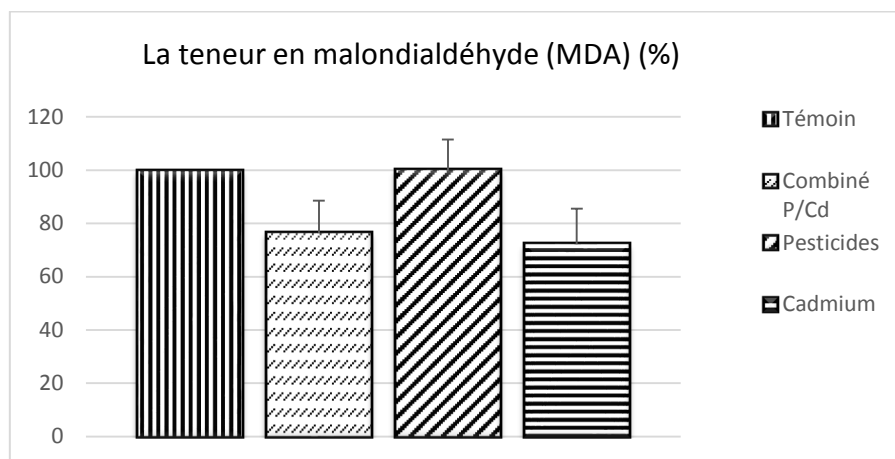


Figure 21. L'effet de Cd et Decis 25 EC sur la teneur de Malondialdéhyde (MDA).

### 2. Effet de Cd et Decis 25 EC sur le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

Le peroxyde d'hydrogène joue le rôle d'une molécule signal qui alerte la cellule de la présence d'un stress environnemental. Il peut fonctionner comme un messenger secondaire à des faibles concentrations mais il devient toxique à fortes concentrations (Souguir, 2009).

L'accumulation significative du peroxyde d'hydrogène suite à une exposition au Cd et pesticide, par rapport au témoin, a été observée au niveau des feuilles (Fig. 22).

Des différences significatives au niveau des teneurs du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> existent entre le témoin/combiné (P<0.009) et entre témoin /cadmium (P<0.014). Une accumulation 2.5 x le témoin a été

enregistrée sous traitement combiné du Cd+ pesticide, et 2x le témoin pour une exposition au Cd seul.

Le cadmium peut causer un stress oxydatif indirectement en activant la NADPH oxydase présente dans les membranes plasmiques en augmentant la production du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Ces résultats sont en accord avec ceux observés chez la tomate (*Solanum lycopersicum L. cv. Hezuo 903*) où les plantules ont subi un stress combiné de phenanthrene–Cd, montrent que l’application du Cd seul (100µM) était plus phytotoxique que l’application de pesticide seul (100µM) tandis que leurs combinaisons provoquent une légère amélioration de l’activité photosynthétique et de la teneur en pigments après traitements de 40 jours (Ahammed et al., 2013).

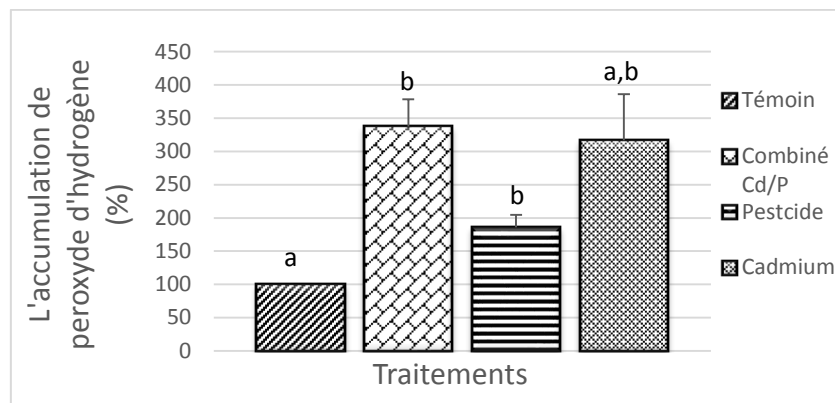


Figure 22. l’effet de stress induit par cd et Decis 25 EC sur accumulation de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans les feuilles de tomate. Les valeurs sont les moyennes de 3 répétitions. Des lettres différentes indiquent une différence significative à p <0,05.

### III. Effet de Cd et Decis 25 EC sur la teneur en protéines

Les analyses comparatives montrent qu’il existe des différences significatives au niveau de témoin /combiné (P<0.025) et témoin/pesticide (P<0.017). L’induction du stress entraîne un effet significatif sur la teneur en protéines (Fig. 23), une augmentation de 5x le témoin sous l’effet de Cd/pesticide, 6x le témoin sous pesticide seul, et 4x le témoin sous l’effet du cadmium. L’augmentation maximale a été observée sous pesticide seul.

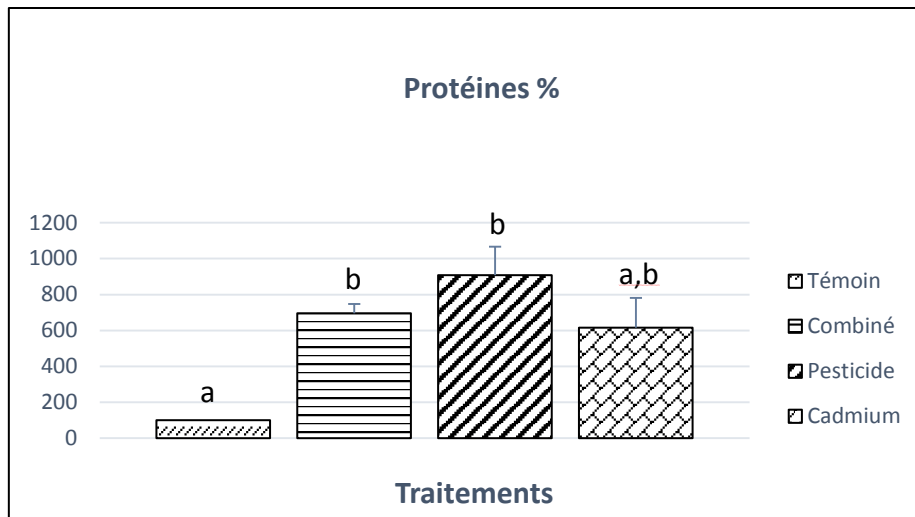


Figure 23. L'effet de stress du Cd et Decis 25 EC sur la teneur en protéines. Les valeurs sont les moyennes de 3 répétitions. Des lettres différentes indiquent une différence significative à  $p < 0,05$ .

#### IV. Détermination de l'activité antioxydant non enzymatique

##### 1. Effet de Cd et Decis 25 EC sur le taux de Proline

La proline est considérée comme l'un des métabolites importants et s'accumule dans les tissus végétaux en réponse à l'oxydation pour protéger les tissus végétaux des dommages causés par le stress (Shakir, 2018). Nos résultats ont montré que les concentrations de proline (Fig. 25) ont augmenté significativement ( $P < 0,002$ ) dans les feuilles de la plante. Les analyses comparatives montrent qu'il existe des différences significatives entre le témoin/cadmium ( $P < 0,002$ ), suivie par pesticide/cadmium ( $P < 0,008$ ). En particulier chez le lot traité par pesticide, la proline augmente de 134% que le Cd/pesticide de 56%. Le stress Cd induit une augmentation de 70 %.

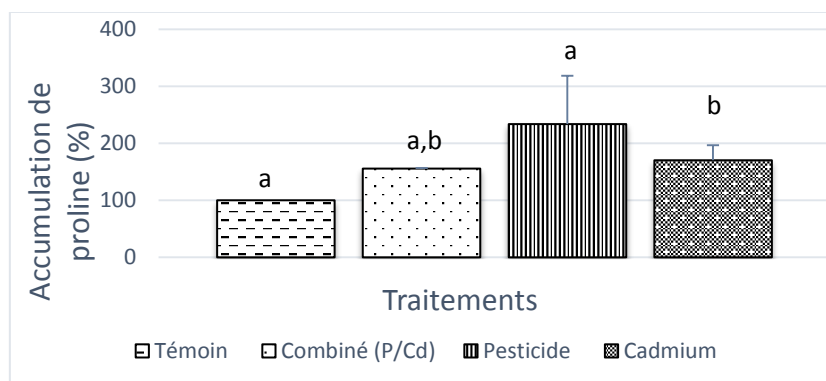


Figure 24. Accumulation de proline au niveau des feuilles. Les valeurs sont les moyennes de 3 répétitions. Des lettres différentes indiquent une différence significative à  $p < 0,05$ .

### 2. Effet de Cd et Decis 25 EC sur Thiols non-protéiques (NPT) et Glutathion (GSH)

Le GSH et NPT ont un rôle dans la détoxification des ROS, la conjugaison des métabolites, la désintoxication des xénobiotiques, et l'action de signalisation, qui déclenche des réactions adaptatives dans des conditions de stress (Karam *et al.*, 2017).

Les niveaux de GSH et de NPT chez la tomate ont été altérés avec les traitements pesticides et cadmium. Le contenu GSH a augmenté dans les différents traitements. Le GSH présente une tendance similaire (Fig. 25) significative ( $P < 0,009$ ) pour les deux traitements Cd/pesticide et sous pesticide seul respectivement de 38%, et 21% suivie par une augmentation de 10% sous Cd seul.

Une augmentation du taux de GSH dans les jeunes plants traités suggère la participation active du GSH à la désintoxication des espèces oxygénées et des radicaux libres. Ce résultat est en accord avec ceux observés chez *Brassica napus* L. où le traitement au cadmium (1.5 mM CdCl<sub>2</sub> pendant 7 jours) a augmenté significativement ( $P < 0,05$ ) le GSH. Ceci suggère que la tomate peut tolérer le stress dû au cadmium et pesticides. Le GSH désintoxique le Cd directement par complexation du groupe thiol, et par le transport et séquestration dans les vacuoles (Karam *et al.*, 2017).

D'autre part, le stress entraîne un effet significatif ( $P < 0.004$ ) sur le taux de NPT. La différence significative touche témoin/pesticide ( $P < 0.008$ ) et entre combiné/pesticide ( $P < 0.006$ ). On observe une légère diminution de l'ordre de 2 % avec un stress combiné de Cd+ pesticide (Fig. 26). Le traitement par pesticide seul augmente le niveau NPT de 35% par rapport au contrôle non traité, tandis que le stress induit par le Cd seul provoque une augmentation de 28%.

L'évaluation des thiols en tant que marqueur de stress oxydatif est de plus en plus fréquente et ils sont actuellement considérés comme un des éléments clés pour améliorer la tolérance des plantes au stress abiotique (Zagorchev *et al.*, 2013).

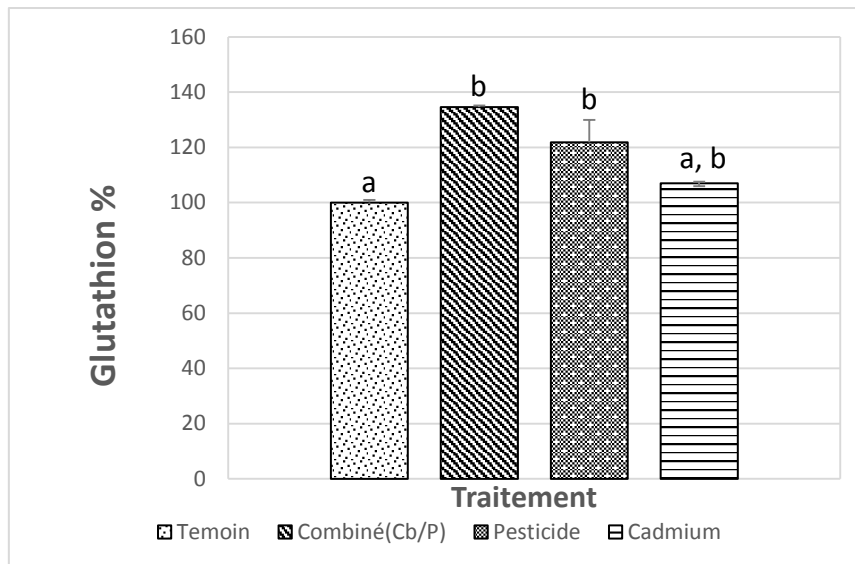


Figure 25. L'effet de stress du Cd et Decis 25 EC sur le taux de GSH dans les jeunes plants. Les valeurs sont les moyennes de 3 répétitions. Des lettres différentes indiquent une différence significative à  $p < 0,05$ .

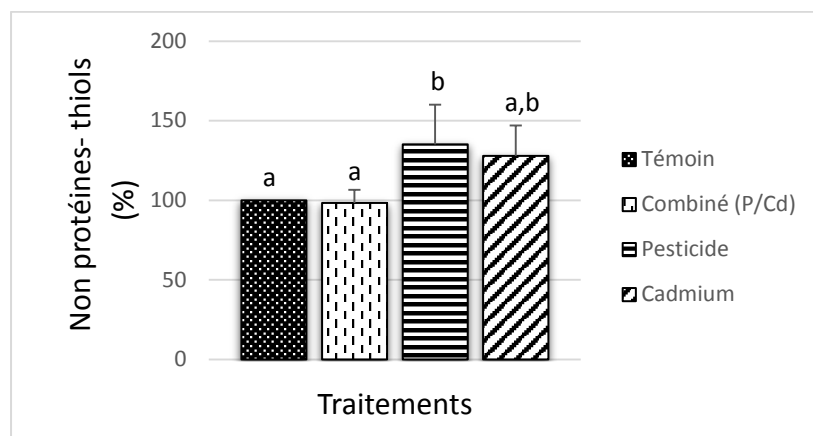


Figure 26. L'effet de stress du Cd et Decis 25 EC sur le taux totaux de thiols non protéiques dans les feuilles de tomate. Les valeurs sont les moyennes de 3 répétitions. Des lettres différentes indiquent une différence significative à  $p < 0,05$ .

### 3. Effet de Cd et Desic 25 EC sur l'estimation de Phytochélatine

L'application du Decis 25EC et le Cd seule ou en combinaison entraine un effet significatif sur la synthèse des phytochelatines ( $P < 0.04$ ). Il existe une différence significative entre témoin/pesticide ( $P < 0.008$ ) et aussi entre combiné/pesticide ( $P < 0.005$ ).

Les résultats (Fig. 27) révèlent que l'effet pesticide est plus élevé par rapport au cadmium avec une augmentation de 35% en comparaison avec contrôle non traité. Sous cadmium seul, les

phytochélatines augmentent de 18%. A une exposition combinée au Cd et pesticides, on assiste à une diminution légère d'environ 2%. Les PC fonctionnent comme des chélateurs importants et que leurs formation est essentielle pour la tolérance des plantes au stress abiotiques et biotiques.

Ces résultats sont en accord avec Molina et *al.* (2008) où les niveaux de PC étaient plus élevés en comparaison avec le contrôle non traité chez *Vigna mungo* L. traités avec 40  $\mu$ M CdCl<sub>2</sub> pendant 12 jours.

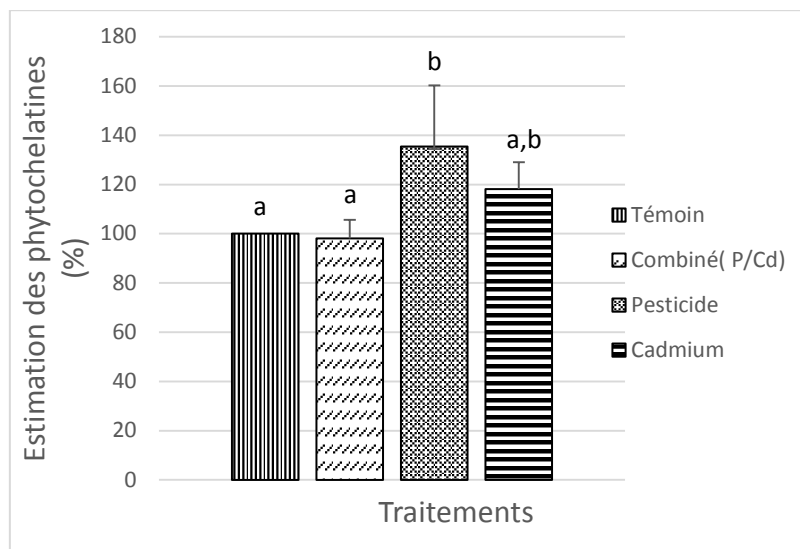


Figure 27. Estimation des phytochélatines au niveau des feuilles de plante tomate. Les valeurs sont les moyennes de 3 répétitions. Des lettres différentes indiquent une différence significative à  $p < 0,05$ .

### 5. L'effet de Cd et Decis 25 EC sur les flavonoïdes et les polyphénols totaux

Les flavonoïdes et les polyphénols neutralisent les ROS avant qu'ils n'endommagent les cellules. Les résultats obtenus des polyphénols totaux et des flavonoïdes montrent que le stress induit un effet significatif sur les flavonoïdes (Fig. 28) tandis qu'aucun effet significatif n'est enregistré sur la teneur des polyphénols (Fig. 29).

Pour les flavonoïdes, la différence significative est enregistré entre témoin/pesticide ( $P < 0,034$ ), et entre le témoin/combiné ( $P < 0,009$ ). Dans le cadre de cette étude, nos résultats montrent qu'il y'a une réduction des flavonoïdes d'environ 36% sous Cd/P, suivie par pesticide seul 15%, et de 26% sous l'effet de cadmium seul. En ce qui concerne les polyphénols, on observe une diminution de 2% sous Cd/P, 31 % sous pesticide seul et 5 % sous cadmium seul. Cet effet est dû à la condition pro-oxydante causée par l'exposition au cadmium et pesticide induisant des

dommages du système antioxydant. Nos résultats sont en accord avec Ramborger *et al.* (2017) qui ont obtenu une réduction des flavonoïdes et des polyphénols chez *Plectranthus neochilus* causée par l'exposition au 2,4-D à une dose de 11.42 Kg/ha.

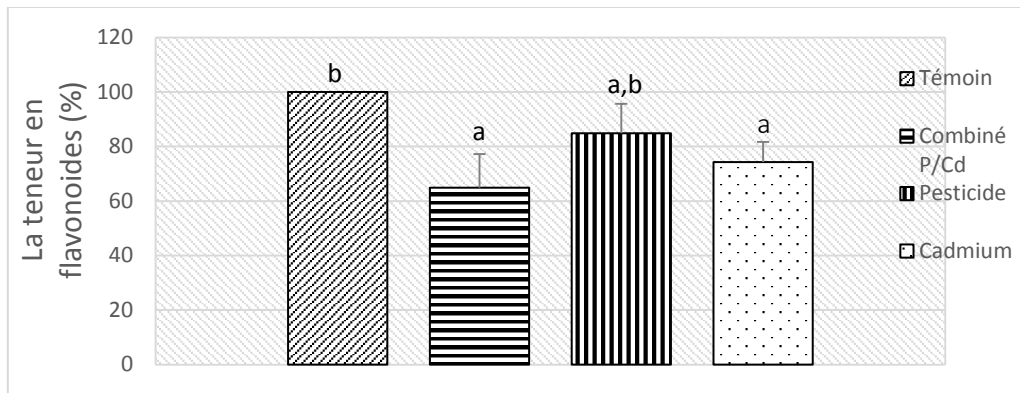


Figure 28. L'effet de Cd et Decis 25 EC sur la teneur en flavonoïdes. Les valeurs sont les moyennes de 3 répétitions. Des lettres différentes indiquent une différence significative à  $p < 0,05$ .

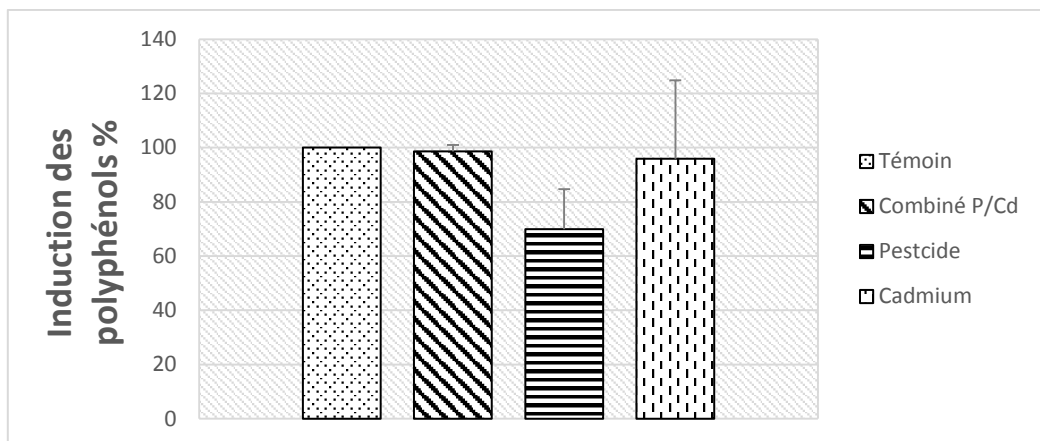


Figure 29. L'effet de cadmium et pesticides sur la teneur en polyphénols.

Induction des phénols dans les feuilles sous stress induit par pesticides et cadmium.

# Conclusion

L'adaptation des végétaux aux conditions contraignantes de leur environnement nécessite des modifications morphologiques, métaboliques et moléculaires. Ces changements doivent aider à la fois à minimiser les effets nocifs des stress et permettre à la plante de survivre.

Les plantes ont mis au point des mécanismes complexes pour contrôler les concentrations de métaux essentiels et réduire au minimum les dommages causés par l'exposition aux métaux non essentiels et les produits phytosanitaires.

L'étude de l'accumulation du Cd et Decis 25EC a permis de voir l'effet cadmique et effet pesticide sur la tomate.

A la lumière de l'ensemble des résultats obtenus, il semble que la réponse des plantules de tomate au stress causé par le Cd et les pesticides est très complexe. Il serait intéressant d'utiliser l'approche « omique » en particulier génomique et protéomique pour éclaircir les mécanismes moléculaires de l'effet du Cd et pesticide.

# **Les références bibliographiques**

## *Les références bibliographiques*

**Ahammed Golam Jalal, Sikan de Pal choudhary, shuangchen chen et al**, 2013. Role of brassinosteroids in alleviation of phenanthrene– cadmium co-contamination-induced photosynthetic inhibition and oxidative stress in tomato. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 64, No. 1, pp. 199–213. doi:10.1093/jxb/ers323.

**Ahanger MA, Moad-Talab N, Abd-Allah EF, Ahmad P, Hajiboland R**, 2016. Plant growth under drought stress : significance of mineral nutrients. In *BWater stress and crop plants : a sustainable approach.*-Ed. Ahmad P. Wiley Blackwell. pp. 649–668

**Ahmad P, Nabi G, Ashraf M**, 2011. Cadmium-induced oxidative damage in mustard [(*Brassica juncea* L.) Czern. & Coss.] Plants can be alleviated by salicylic acid. *South Afri J Bot* 77:36–44.

**Appala Raju N, Chigurupati Sridevi et al**. 2016. A Simple HPLC-UV Method for the Determination of Glutathione in PC-12 Cells. *Reaserch gate*. DOI :10.1155/2016/6897890.

**Bailly Christophe, El-Maarouf-Bouteau Hayat, Corbineau François**, 2008. Rôle de la signalisation par les espèces réactives de l'oxygène dans la germination et la levée de dormance des semences. *Journal de la Société de Biologie* 202(3) :241-248. DOI: 10.1051/jbio:2008025

**Belhaouchet. N, 2014**. Evaluation de la toxicité du Spinosad « insecticide nouvellement introduit en Algérie » sur un modèle expérimental bioindicateur de la pollution « *Helix*

**Ben Rejeb K**, 2015. Implication des Espèces Réactives de l'Oxygène (ERO) dans la régulation de la capacité antioxydante et du métabolisme de la proline chez (*Arabidopsis thaliana*) sous contraintes hydriques. Thèse de Doctorat. Université Pierre et Marie Curie (PARIS VI) (France). Université Tunis EL Manar (Tunisie).

**Biniék Catherine**, 2016. Importance des ROS et des radicaux : de la graine à la membrane plasmique. Thèse de Doctorat. Université PARIS-SACLAY (France).

**Bounab Sarah, Sahli Imen N.R** 2014. Etude de l'activité de la peroxydase (POD) et de la catalase (CAT) chez *Lens culinaris* contaminée par le cadmium. Mémoire de Master. Université Constantine 1.

**Calvet,R., Barriuso, E.,Bedos, C.,benoit, P.,Charnay, M.P.&Coquet,Y**, 2005. Les pesticides dans le sol : conséquences agronomiques et environnementales. Éditions France Agricole, Paris

- CRAAQ 2016.** Utilisation rationnelle et sécuritaire des pesticides. Centre de référence en agriculture et agroalimentaire du Québec (CRAAQ).
- DalCorso, G., Manara, A., Piasentin, S., Furini, A.,** 2014. Nutrient metal elements in plants. *Metallomics* 6, 1770–1788.
- Das, K., and Roychoudhury, A.** 2014. Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxydants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Front.Env.Sci.*2,53.
- Demidchik Vadim,** 2015. Mechanisms of oxidative stress in plants : From classical chemistry to cell biology. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envexpbot.2014.06.021>
- Fedda A.,** 2016. Evaluation de la biodisponibilité des contaminants dans les sols. Mémoire de Master. Université Abdelhamid Ibn Badis-Mostaganem (Algérie).
- Gallego Susana M., Liliana B. Pena, Roberto A. Barcia, Claudia E. Azpilicueta et al,** 2012. Unravelling cadmium toxicity and tolerance in plants : Insight into regulatory mechanisms. *Environmental and Experimental Botany* 83, 33-46. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envexpbot.2012.04.006>
- Gill Sarvajeet Singh, Tuteja Narendra,** 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 48, 909-930. doi:10.1016/j.plaphy.2010.08.016.
- Gupta KJ, Igamberdiev AU,** 2015. Compartmentalization of reactive oxygen species and nitric oxide production in plant cells: an overview. In : Gupta KJ, Igamberdiev AU (eds) *Reactive oxygen and nitrogen species signaling and communication in plants*. Springer International Publishing, Switzerland. 2015. doi : 10.1007/978-3-319-10079-1\_1
- Gupta Neha, Kumar Yadav Krishna, Vinit Kumar, Sandeep Kumar et al,** 2019. Trace elements in soil-vegetables interface : Translocation, bioaccumulation, toxicity and amelioration - A review. *Science of the Total Environment* 651, 2927–2942.4
- Hashem A, Abd\_Allah EF, Alqarawi AA, Alwathnani Hend A ,**2015. Alleviation of adverse impact of cadmium stress in sunflower (*Helianthus annuus L.*) by arbuscular mycorrhizal fungi. *Pak J Bot* 47(2):785–795.
- Junglee Sanders,** 2016. Implication de NO dans la régulation du recyclage de l'ascorbate dans les fruits de tomate (*Solanum lycopersicum*, cv micro-Tom) et en réponse à une contrainte environnementale. Thèse de Doctorat. L'Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse.
- Karam Elham Asadi , Maresca Viviana , Sorbo Sergion, Keramat Batool et al ,** 2017. Effects of triacontanol en ascorbate-glutathione cycle in *Brassica napus L.* exposed to

cadmium-induced oxidative stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 144, 268-274. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.06.035>.

**Khan M, Iqbal R, Nafees A. Khan,** 2017. *Reactive Oxygen Species and Antioxidant Systems in Plants : Role and Regulation under Abiotic Stress*. ISBN 978-981-10-5253-8 ISBN 978-981-10-5254-5 (eBook)

**Khan MIR, Nazir F, Asgher M, Per TS, Khan NA,** 2015. Selenium and sulfur influence ethylene formation and alleviate cadmium-induced oxidative stress by improving proline and glutathione production in wheat. *J Plant Physiol* 173:9–18

**Komárek M, adková E, Chrastný V, Bordas F, Bollinger JC,** 2010. Contamination of vineyard soils with fungicides: A review of environmental and toxicological aspects. *Environment International* 36, 138-151.

**Lane E.A., M.J. Canty , S.J.More,** 2014. Cadmium exposure and consequence for the health and productivity of farmed ruminants. *Research in Veterinary Science* 101, 132-139. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2015.06.004>.

**Liu Shiliang, Yang Rongjie, Durgesh Kumar Tripathi, Xi Li et al,** 2017. The interplay between reactive oxygen and nitrogen species contributes in the regulatory mechanism of the

**Loussouarn-Yvon M.,** 2017. L'acide carnosique et le carnosol, deux super-antioxydants du romarin (*Rosmarinus officinalis*) rôles, mécanismes, physiologie et applications. Thèse de Doctorat. Université de l'aix-marseille (France).

**Mahdjiba K.,** 2018. Enquête phytosanitaire dans la wilaya d'Ain Defla. Mémoire de Master. Université de Djilali Bounaâma de Khemis Miliana (Algérie).

**Massot Capucine,** 2010. Analyse des variations de la teneur en vitamine C dans le fruit de tomate et rôle de l'environnement lumineux. Thèse de Doctorat. Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse.

**Mittler Ron,** 2016. **ROS Are Good.** Trends in plant science. TRPLSC 1461 No. Of Pages 9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2016.08.002>.

**Molina A, Carlos Nieves, Mari´a Vero´nica Pe´rez Chaca et al ,** 2008. Cadmium-induced oxidative damage and antioxidative defense mechanisms in (*Vigna mungo L.*). *Plant Growth Regul*, 56:285–295 .DOI 10.1007/s10725-008-9308-1.

**Nabi Rizwana Begum Syed, Rupesh Tayade, Adil Hussain, Krishnanand P. Kulkarni,** et al, 2019. Nitric oxide regulates plant responses to drought, salinity, and heavy metal stress. *Environmental and Experimental Botany*. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2019.02.003>.

**Nemmiche Sai'd, 2017,** Oxidative Signaling Response to Cadmium Exposure. TOXICOLOGICAL SCIENCES 156, 4–10. doi: 10.1093/toxsci/kfw222.

**Noctor Graham, Jean-Philippe Reichheld, Christine,H. Foyer, 2017.** ROS-related redox regulation and signaling in plants. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. S1084-9521(17)30246-X : <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.semcdb.2017.07.013>

**Parent Claire, Capelli Nicolas, Dat James, 2008.** Formes réactives de l'oxygène, stress et mort cellulaire chez les plantes. *C. R. Biologies* 331, 255-261. doi:10.1016/j.crvi.2008.02.001.

**Rajaa Vaseem, Umer Majeeda, Hunseung Kangb, Khursheed Iqbal Andrabic et al, 2017.** Abiotic stress : Interplay between ROS, hormones and MAPKs. *Environmental and Experimental Botany* 137, 142–157. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envexpbot.2017.02.010>

**Ramborger, B.P. Gularte B.P, C.A., Rodrigues, D.T., Gayer et al., 2017.**The phytoremediation potentiel of *Plectranthus neochilus* on 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and the role of antioxidant capacity in herbicide tolerance, *Chemospher*. doi : 10.1016/j.chemosphere.2017.08164

**Rizwan Muhammad, Ali Shafaqat, Adrees Muhammad, Ibrahim Muhammad et al, 2017.** A critical review effects, tolerance mechanisms and management of cadmium in vegetables. *Chemosphere* 182, 90-105. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.05.013>.

**Roberts, T. 2000.** Metabolism of agrochemicals in plants. Jhon Wiley & Sons , Ltd, Chichester.

**Saddhe Ankush Ashok, Malvankar Manali Ramakant, Karle Suhas Balasaheb et al, 2019.** Reactive nitrogen species : Paradigms of cellular signaling and regulation of salt stress in plants. *Environmental and Experimental Botany* 161, 86-97. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.11.010>.

**Sahay, S., Gupta, M., 2017.** An update on nitric oxide and its benign role in plant responses under metal stress. *Nitric Oxide* 67, 39–52. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2017.04.011>.

**Salbitani Giovanna et al. 2017.** Determination of Reduced and Total Glutathione Content in Extremophilic Microalga *Galdieria phlegrea*. DOI: 10.21769/BioProtoc.2372

**Samsidar Anwar, Siddiquee Shafiquzzaman, Shaarani Sharifudin Md, 2018.** A review of extraction, analytical and advanced methods for determination of pesticides in environment and foodstuffs. *Trends in Food Science & Technology* 71, 188-201. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.11.011>

**Serra A,A**, 2015. Réponses écophysiologies et moléculaires des plantes aux stress xénobiotiques complexes de faible intensité : implications dans les capacités de protection environnementale des bandes enherbées. Thèse de Doctorat. Université de Rennes 1 *sous le sceau de l'université européenne de bretagne*.

**Serra Anne-Antonella, ALBERTO Diana, SULMON Cécile, GOUESBET Gwenola et al**, 2016. Implications des communautés végétales péri-agricoles dans la dynamique environnementale des pollutions par les pesticides. *Revue d'Ecologie (Terre et Vie)*, Vol. 71 (3) : 203-221.

**Shakir Shakirullah Khan, Shahid Irfan, Basreen Akhtar, Shafiq ur Rehman et al**, 2018. Pesticide-induced oxidative stress and antioxidant responses in tomato (*Solanum lycopersicum*) seedlings. Springer Science. Ecotoxicology. <https://doi.org/10.1007/s10646-018-1916-6>.

**Singh Anita, Prasad Sheo Mohan, Singh Rajeev Pratap**, 2016. Plant Responses to Xenobiotics. ISBN 978-981-10-2859-5 ISBN 978-981-10-2860-1 (eBook).

**Smirnoff, N.**, 2000 . Ascorbate biosynthesis and function in photoprotection. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 355, 1455–1464.

**Soares, C., Branco-Neves, S., de Sousa, A., Azenha, M., Cunha, A., Pereira, R., Fidalgo, F.**, 2018. SiO<sub>2</sub> nanomaterial as a tool to improve *Hordeum vulgare* L. tolerance to nano-NiO stress. *Sci. Total Environ.* 622–623, 517–525. <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*). Thèse de Doctorat. Université d'Auvergne Clermont Ferrand-II (France), Université de 7 Novembre A Carthage (Tunisie).

**Tandon, V., Gupta, B.M., Tandon, R.**, 2005. Free radicals/reactive oxygen species. *JK-practitioner* 12 (3), 143–148.

**Vasquez Hilarion**, 2017. Stimuler les défenses des plantes contre *Botrytis cinerea* par des rayonnements UV-C. Thèse de Doctorat. Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse.

**Zagorchev, L., Seal, C.E., Kranner, I., Odjakova, M.**, 2013. A central role for thiols in plant tolerance to abiotic stress. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 7405–7432.

**Zhao Li-juan, XIE Jing-fang, ZHANG Hong, WANG Zhen-tao**, 2018. Enzymatic activity and chlorophyll fluorescence imaging of maize seedlings (*Zea mays* L.) after exposure to low doses of chlorsulfuron and cadmium. *Journal of Integrative Agriculture* ,17(4): 826–836. doi: 10.1016/S2095-3119(17)61717-9.

**Zorrig W.,** 2010. Recherche et caractérisation de déterminants contrôlant l'accumulation de cadmium chez la laitue "*Lactuca sativa*". Thèse de doctorat. Université Montpellier II/SupAgro (France) et Université Tunis El Manar (Tunisie).

أصبح تلوث النظام البيئي للتربة الآن المصدر الرئيسي للمشاكل الإيكولوجية. يهدف هذا العمل إلى تقييم تراكم الكاديوم ودراسة أثرها على النمو والمبيدات الحشرية والتأثير المزدوج بينهما على شتلات الطماطم (*Solanum lycopersicon*.L) وأصبغة التركيب الضوئي (اليخضور أ، ب، اليخضور الكلي، أشباه الكاروتينات)، علامات الإجهاد (بيروكسيد الهيدروجين، أكسدة الليبيدات) وكذلك أثارها على الأنشطة غير الانزيمية المشاركة في نظام الأكسدة (البرولين، البوليفينول، مركبات الفلافونويد) ومركبات الأيضية الثانوية و محتوى البروتينات. تم دراسة التأثير على التشكل نباتات مزروعة سابقاً في وسط مائي بجرعة زراعية من المبيدات الحشرية و بجرعة 100 ميكرومول كلوريد الكاديوم لمدة 10 أيام. أظهرت النتائج أن الإجهاد يؤدي إلى تأثير كبير على طول و وزن الأجزاء الهوائية، و انخفاض محتوى اليخضور، بيروكسيد الهيدروجين، و انخفاض في محتويات الفلافونويد، و مركبات الفينول، و زيادة في مركبات الثانوية و محتوى البروتين.

**الكلمات المفتاحية:** الكاديوم، علامات الإجهاد، الطماطم. (*Solanum lycopersicon*.L), Decis 25 EC.

## Résumé

La pollution de l'écosystème du sol est devenue aujourd'hui une des préoccupations des problèmes écologiques majeurs. Ce travail vise à évaluer l'accumulation du cadmium (Cd) et des pesticides ainsi leurs combinaisons au niveau des organes de jeunes plants de tomate (*Solanum lycopersicum* L.). Leurs effets ont été évalué sur la croissance et les pigments photosynthétiques (chlorophylle a, b, totale et caroténoïdes), les marqueurs du stress (malondialdéhyde et peroxyde d'hydrogène), les activités non enzymatiques intervenant dans le système antioxydant y compris la proline, les flavonoïdes, les polyphénols, et les métabolites secondaires, et teneur en protéines. Une évaluation de la morphométrie a été réalisée. Des plantules préalablement cultivées sur un milieu hydroponique traitées par une dose agronomique de pesticide et une dose de 100 µM CdCl<sub>2</sub> pendant 10 jours. Les résultats montrent que le stress induit un effet significatif sur la longueur et le poids des parties aériennes, une réduction du contenu en chlorophylle, une génération de peroxyde d'hydrogène, une diminution des teneurs des flavonoïdes et polyphénols, une augmentation des métabolites secondaires et de la teneur en protéines.

**Mots clés :** Cadmium ; Decis 25 EC ; marqueurs de stress ; la tomate (*Solanum lycopersicum* L.).

## Abstract :

Pollution of the soil ecosystem has now become one of the concerns of major ecological problems. This work aims to evaluate the accumulation of cadmium (Cd) and pesticides and their combinations in the organs of young tomato plants (*Solanum lycopersicum* L.). Their effects were evaluated on growth and photosynthetic pigments (chlorophyll a, b, total and carotenoids), stress markers (malondialdehyde and hydrogen peroxide), non-enzymatic activities involved in the antioxidant system including proline, flavonoids, polyphenols, and secondary metabolites, and protein content. A morphometric evaluation was carried out. Seedlings previously grown on a hydroponic medium treated with an agronomic dose of pesticide and a dose of 100 µM CdCl<sub>2</sub> for 10 days. The results show that stress has a significant effect on the length and weight of the aerial parts, a reduction in chlorophyll content, a generation of hydrogen peroxide, a decrease in flavonoid and polyphenol levels, an increase in secondary metabolites and protein content.

**Keywords :** Cadmium ; Decis 25 EC ; stress markers ; tomato (*Solanum lycopersicum* L.).