

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

جامعة عبد الحميد بن باديس _ مستغانم

UNIVERSITE ABDELHAMID IBN BADIS DE MOSTAGANEM

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie

Filière : Biologie

Option : Sciences du Sol et Environnement

THESE

PRESENTEE EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE

DOCTORAT EN SCIENCES

Présentée par ;

M. BOUZIANI El Hadj

**Effet du plomb sur les paramètres
morphophysiologiques et enzymatiques
chez la fève (*Vicia faba* L.)**

Laboratoire de la Biodiversité et Conservation des Eaux et des sols, université de Mostaganem.

Soutenue publiquement le (14 Janvier 2021)

Devant le jury :

M. DJIBAOUI Rachid Professeur à l'université de Mostaganem	Président
M. REGUIEG YSSAAD Houcine Abdelhakim Professeur à l'université de Mostaganem	Rapporteur
M. ABABOU Adda Professeur à l'université de Chlef	Examineur
M. BELKHODJA Moulay Professeur à l'université d'Es Senia Oran	Examineur
M. BOUTIBA Abdelkader Professeur à l'université de Chlef	Examineur
M. AIT SAADA Djamal Maitre de conférences A à l'université de Mostaganem	Examineur

ANNEE UNIVERSITAIRE : 2020 / 2021

A la mémoire de ma mère

A mon père

A ma femme et mes enfants

A ma famille

A mes ami(e)s

Faire les remerciements... Ce devrait être la partie la plus facile à écrire après avoir rédigé ce manuscrit. Pourtant, il y a tant de personnes à remercier, celles qui ont contribué à la réalisation de ce travail. Il faut à la fois n'oublier personne et trouver les mots justes. Je vais essayer de faire de mon mieux.

En premier lieu, je tiens à témoigner ma reconnaissance envers mon Directeur de thèse, **Monsieur REGUIEG YSSAAD Houcine Abdel Hakim**, Professeur à l'Université de Mostaganem, qui était toujours disponible pour partager son temps et ses connaissances, je le remercie pour avoir suivi et guidé ce travail avec un grand intérêt, je le remercie également de la confiance qu'il m'a accordée au cours de la réalisation de ce travail.

Je tiens à exprimer mes reconnaissances envers mon enseignant Monsieur **DJIBAOUI Rachid**, professeur à l'université de Mostaganem, pour avoir accepté de présider mon jury.

Mes vifs remerciements vont également, à mon enseignant Monsieur **BELKHODJA Moulay**, professeur à l'université d'Oran, qui m'a honoré par sa présence et d'avoir accepté d'examiner mon travail.

Je remercie également mon enseignant Monsieur **BOUTIBA Abdelkader**, Professeur à l'université de Chlef de faire part de mon jury et d'avoir examiné mon travail, qu'il accepte mes profondes gratitude.

Je tiens à exprimer mes sincères reconnaissances envers mon enseignant Monsieur **AIT SAADA Djamel** Maître de conférences A à l'université de Mostaganem, qui m'a honoré par sa présence et de faire part de mon jury.

Mes sincères remerciements vont également à Monsieur **ABABOU Adda** Professeur à l'université de Chlef, pour avoir accepté de prendre part du jury et d'examiner mon travail.

Je voudrais exprimer ma gratitude au personnel du laboratoire de nutrition du Centre de Recherche en Biotechnologie de Constantine et de la station régionale d'expérimentation INSID de Ksar Chellala-Tiaret pour leur soutien, leurs encouragements, et de m'avoir accueilli au laboratoire pour réaliser mes analyses.

Mes vifs remerciements vont spécialement à mon ami, Monsieur **Slimane BENOUIS**, pour sa disponibilité et son soutien.

Je tiens à remercier également tous ceux qui m'ont soutenu moralement : mon père et les autres... Un « Merci » très particulier pour ma femme qui a tout fait pour que je puisse finaliser ce travail.

Je pense également à mes amis **NOURI T, DJOUDI AH et OUAINI AR**.

Enfin, je voudrais exprimer mon immense reconnaissance à tous ceux qui ont d'une manière ou d'une autre contribué à l'élaboration de ce travail et qui ont su m'apporter leur soutien...

Merci à tous.

RESUME.

Le plomb est l'élément toxique le plus important dans l'environnement qui affecte la vie des organismes vivants. Chez les plantes le plomb ne joue aucun rôle physiologique, sa présence est source de multiples perturbations même à de faibles concentrations. L'objectif de ce travail de recherche est l'étude de la toxicité du plomb sur le comportement et le développement des plantes et l'évaluation des mécanismes et les stratégies mises en place par ces plantes pour tolérer ce stress métallique. Afin d'atteindre ces objectifs, l'expérimentation est réalisée sur des plantes de la fève, qui est une plante sentinelle tolérante et qui représente des caractéristiques remarquables dans les études d'écotoxicologie, ainsi deux variétés de la fève (Sidi Aïch et super Aguadulce) sont exposées à de différentes doses de plomb (0, 50, 100, 200, 500, 1000 et 2000ppm) sous forme de nitrate de plomb ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$) ajoutées au substrat de culture qui se compose de sable et de terreau (3v/1v). L'estimation des réponses des plantes au stress appliqué est mesurée par l'ensemble des paramètres d'ordre morphologiques, physiologiques et enzymatiques. L'accumulation du plomb dans les plantes stressées est accompagnée d'une part par un ralentissement de la cinétique de la croissance, un déséquilibre du statut hydrique, d'une chute dans le rendement de la photosynthèse et du contenu protéique, de l'autre part, l'application du stress au plomb a occasionné une accumulation des osmorégulateurs (proline et sucres solubles) une surproduction des polyphénols et des flavonoïdes totaux et une suractivation des enzymes catalases et peroxydases. L'exposition des plantes au plomb dans le milieu de culture même avec des faibles concentrations est à l'origine de multiples perturbations d'ordre morphologique, physiologique, biochimique et enzymatique.

Mots clés : dose, la fève, paramètres, plomb, Sidi Aïch, stress, Super Aguadulce.

ABSTRACT.

Lead is the most important toxic element in the environment that affects the life of living organisms. In plants, lead has no physiological role, its presence is a source of multiple disturbances even at low concentrations. The objective of this research work is to study the toxicity of lead on the behaviour and development of plants and to evaluate the mechanisms and strategies used by these plants to tolerate this stress. In order to achieve these objectives, the experiment is carried out on plants of the faba-bean, which is a tolerant and sentinel plant, and which represents remarkable characteristics in ecotoxicology studies, thus two varieties of the bean (Sidi Aïch and super Aguadulce) are exposed to different doses of lead (0, 50, 100, 200, 500, 1000 and 2000ppm) in the form of lead nitrate ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$) added to the culture substrate which consists of sand and potting soil (3v/1v). The estimation of plant responses to the applied stress is measured by all morphological, physiological, and enzymatic parameters. The accumulation of lead in stressed plants is accompanied on the one hand by a slowing down of growth kinetics, an imbalance in water status, a drop in photosynthesis yield and protein content, on the other hand, the presence of lead caused an accumulation of osmoregulators (proline and soluble sugars), an overproduction of polyphenols and total flavonoids and an overactivation of catalase and peroxidase enzymes. The exposure of plants to lead in the culture medium, even at low concentrations, causes multiple morphological, physiological, biochemical, and enzymatic disturbances.

Keywords: dose, faba-bean, lead, parameters, Sidi Aïch, stress, Super Aguadulce.

ملخص.

يعد الرصاص من أهم العناصر السامة في البيئة والتي تؤثر على حياة الكائنات الحية. الرصاص من المعادن التي لا تلعب أي دور من الناحية فسيولوجية ووجوده هو مصدر اضطرابات متعددة حتى عند التراكيز المنخفضة. الهدف من هذا البحث هو دراسة سمية الرصاص على سلوك النباتات وعلى تطورها وكذلك تقييم وتقدير الآليات والاستراتيجيات التي تستخدمها هذه النباتات لمواجهة هذا الإجهاد. ولتحقيق هذه الأهداف وجب علينا إجراء التجربة على نباتات الفول وهو الذي يعتبر من النبات المحذرة لوجود السموم والتي تمتلك خصائص مميزة تفيد في مجال دراسات السموم البيئية، وذلك بتعريض صنفين من هذا النبات (سيدي عيش وسوبر أغوادولس) لجرعات مختلفة من الرصاص (0، 50، 100، 200، 500، 1000 و2000 جزء في المليون) على شكل نترات الرصاص ($Pb(NO_3)_2$) وتمت إضافة هذه الجرعات إلى وسط النمو الذي يتكون من الرمل وسماد عضوي متحلل. (3 حجم/1 حجم). تمّ قياس وتقدير إستجابات النبات للإجهاد المطبّق من خلال جميع التجارب على المستوى المورفولوجي والفسولوجي والإنزيمي. ترافق تراكم الرصاص في النباتات الخاضعة للإجهاد من الجانب الأول مع تباطؤ في حركية النمو، واختلال التوازن في تقديرات نسبة تواجد الماء، وانخفاض في التمثيل الضوئي وتركيز البروتينات، من الجانب الآخر، تسبب تطبيق الإجهاد بالرصاص في تراكم منظمات الضغط الحلولي (البرولين والسكريات المذابة)، والإفراط في إنتاج البوليفينول والفلافونويد ، وإفراط في تنشيط إنزيمات الكاتلاز والبيروكسيداز. إن تعرض النباتات للرصاص في الوسط، حتى ولو بالتركيزات المنخفضة، يسبب العديد من الاضطرابات المورفولوجية والفسولوجية والحيوية الكيميائية والإنزيمية.

الكلمات المفتاحية : إجهاد، تخصيصات، جرعات، رصاص، سيدي عيش، سوبار أغوادولس، فول.

☪* LISTE DES ABREVIATIONS *☪-

% : pourcentage.	kPa : kilopascal.
Ø : diamètre.	kt : kilotonne.
ΔDO : Delta Densité Optique.	l : litre.
ηm : nanomètre.	m : mètre.
°C : degrés Celsius.	M.S : matière sèche.
μg : microgramme.	Meq/100g : milliéquivalent par 100 grammes.
μm : micromètre.	mm : millimètre.
μM : micromole.	mM : millimole.
μΩ : microohm.	mol : mole.
Å : Angström.	MOS : Matière organique du sol.
ABA : acide abscissique.	p : probabilité.
ADN : acide désoxyribonucléique	Pb : plomb.
APx : ascorbate peroxydase.	PC : phytochélatine.
CAT ; EC1.11.1.6 : catalase.	pg : picogramme.
cm : centimètre	pH : potentiel d'hydrogène.
CNCCSP : Centre National de Contrôle et Certification des Semences et Plantes.	POD : peroxydase.
CRBT : Centre de Recherche en Biotechnologie.	ppd : partie par milliard.
DHTP : dose hebdomadaire tolérable provisoire	ppm : partie par million.
dS/m : deci-Simens par mètre.	QI : quotient intellectuel.
EEA : European Environment Agency.	RUBISCO : Ribulose 1,5 bisphosphate carboxylase/oxygénase.
Eh : potentiel d'oxydoréduction.	SAA : Spectrométrie d'Absorption Atomique.
ERO : Espèces Réactives à l'oxygène.	SGH : glutathionne.
ETM : élément trace métallique.	Tab : tableau.
FBC : facteur de bioconcentration.	TF : facteur de translocation.
Fig : figure.	TFC : Composés Flavonoïdes Totaux.
FPGN : fond pédo-géochimique naturel.	TPC : Composés Phénoliques Totaux.
g : gramme.	TRE : Teneur Relative en Eau.
GPx ; EC1.11.1.7 : gaïacol peroxydase.	U.S.D.A : United States Department of Agriculture.
GTP : Guanine triphosphate.	UNEP : United Nations Environnement Programme.
HPL : hydroperoxydes lipidiques.	v : volume.
ILZSG : International Lead and Zinc Study Group.	V1 : variété 1 (Sid Aïch).
J.-C. : Jésus-Christ.	V2 : variété 2 (Super Aguadulce).
kg : kilogramme.	

- ❧ * LISTE DES FIGURES * ❧ -

Figure 1 : cycle biogéochimique des ETM adapté selon **Lamand, (1991)** (**Tremel-Schaub et Feix, 2005**).

Figure 2 : Source de la pollution de l'environnement par le plomb (d'après **Dotaniya et al., 2018**).

Figure 3 : Sources anthropiques de la pollution en plomb (d'après **Sharma et Dubey, 2005**).

Figure 4 : Devenir des ETM dans un sol. Modifié de **McLaughlin (2001)** selon **Bataillard et al., (2012)**

Figure 5 : Présentation schématique de l'interaction rhizosphérique sol-plant (**Hinsinger, 2004**).

Figure 6 : Facteurs limitant la solubilisation du plomb dans le sol, l'absorption par les racines et la translocation vers la partie aérienne (**Shahid, 2010**).

Figure 7 : Coupe transversale de racine, avec le passage des ions selon les voies symplastiques et apoplastiques (**Gobat et al., 1998**).

Figure 8 : Les voies possibles d'exposition au plomb dans l'environnement (**Natasha et al., 2020**).

Figure 9 : Représentation des liens avérés (flèches pleines) et potentiels (flèches pointillées) entre le plomb, la mitose et la génotoxicité (**Pourrut, 2008**).

Figure 10 : Les différentes parties de la fève *Vicia faba* L. (**Thomé, 1885**).

Figure 11 : Dispositif expérimental adopté.

Figure 12 : Conduite de l'expérimentation.

Figure 13. Evolution du nombre de folioles de la fève (V1 : Sidi Aïch et V2 : Super Aguadulce) en fonction de la dose de plomb appliquée (ppm).

Figure 14 : Evolution de la surface foliaire (cm²) de la fève (V1 : Sidi Aïch et V2 : Super Aguadulce) en fonction de la dose de plomb appliquée (ppm).

Figure 15 : Evolution de la hauteur de tige (cm) de la fève (V1 : Sidi Aïch et V2 : Super Aguadulce) en fonction de la dose de plomb appliquée (ppm).

Figure 16 : Evolution du volume racinaire (ml) de la fève (V1 : Sidi Aïch et V2 : Super Aguadulce) en fonction de la dose de plomb appliquée (ppm).

Figure 17 : Evolution du poids sec (g) de la partie Aérienne de la fève (V1 : Sidi Aïch et V2 : Super Aguadulce) en fonction de la dose de plomb appliquée (ppm).

Figure 18 : Evolution du poids sec (g) de la partie Racinaire de la fève (V1 : Sidi Aïch et V2 : Super Aguadulce) en fonction de la dose de plomb appliquée (ppm).

Figure 19 : Régression linière des paramètres morphologiques (par unité) en fonction de la dose du plomb appliquée (en ppm) avec le R² (R-square) pour V1 (Sidi Aïch) et V2 (Super Aguadulce).

Figure 20 : Evolution de la teneur en chlorophylle **a** (mg/g) de la fève (V1 : Sidi Aïch et V2 : Super Aguadulce) en fonction de la dose de plomb appliquée (ppm).

Figure 21 : Evolution de la teneur en chlorophylle **b** (mg/g) de la fève (V1 : Sidi Aïch et V2 : Super Aguadulce) en fonction de la dose de plomb appliquée (ppm).

Figure 22 : Evolution de la teneur en caroténoïdes (mg/g) de la fève (V1 : Sidi Aïch et V2 : Super Aguadulce) en fonction de la dose de plomb appliquée (ppm).

Figure 23 : Evolution de la teneur en eau relative (%) de la fève (V1 : Sidi Aïch et V2 : Super Aguadulce) en fonction de la dose de plomb appliquée (ppm).

Figure 24 : Evolution de la teneur en sucres solubles ($\mu\text{g/g}$) de la fève (V1 : Sidi Aïch et V2 : Super Aguadulce) en fonction de la dose de plomb appliquée (ppm).

Figure 25 : Evolution de la teneur en protéines (mg/g) de la fève (V1 : Sidi Aïch et V2 : Super Aguadulce) en fonction de la dose de plomb appliquée (ppm).

Figure 26 : Evolution de la teneur en proline ($\mu\text{g/g}$) de la fève (V1 : Sidi Aïch et V2 : Super Aguadulce) en fonction de la dose de plomb appliquée (ppm).

Figure 27 : Régression linière de la teneur des pigments chlorophylliens (A : Chlorophylle a ; B : chlorophylle b et C : caroténoïdes) en fonction de la dose du plomb appliquée (en ppm) avec le R^2 (R-square) pour V1 (Sidi Aïch) et V2 (Super Aguadulce).

Figure 28 : Régression linière de la teneur en sucres solubles (A), de la teneur en proline (B), de la teneur en protéines (C) et de la Teneur en eau relative (D) en fonction de la dose du plomb appliquée (en ppm) avec le R^2 (R-square) pour V1 (Sidi Aïch) et V2 (Super Aguadulce).

Figure 29 : Evolution de la teneur en plomb accumulé (mg/g) de la fève (V1 : Sidi Aïch et V2 : Super Aguadulce) en fonction de la dose de plomb appliquée (ppm).

Figure30 : Régression linière de la teneur en plomb dans la plante (mg/g) en fonction de la dose du plomb appliquée (en ppm) avec le R^2 (R-square) pour V1 (Sidi Aïch) et V2 (Super Aguadulce).

Figure 31 : Evolution de la teneur en polyphénols totaux ($\mu\text{g/mg}$) de la fève (V1 : Sidi Aïch et V2 : Super Aguadulce) en fonction de la dose de plomb appliquée (ppm).

Figure 32 : Evolution de la teneur en flavonoïdes totaux ($\mu\text{g/mg}$) de la fève (V1 : Sidi Aïch et V2 : Super Aguadulce) en fonction de la dose de plomb appliquée (ppm).

Figure 33 : Evolution de l'activité de la catalase ($\Delta\text{DO}_{240}/\text{mg}$ protéine) de la fève (V1 : Sidi Aïch et V2 : Super Aguadulce) en fonction de la dose de plomb appliquée (ppm).

Figure 34 : Evolution de l'activité de la peroxydase ($\Delta\text{DO}_{470}/\text{mg}$ protéine) de la fève (V1 : Sidi Aïch et V2 : Super Aguadulce) en fonction de la dose de plomb appliquée (ppm).

Figure35 : Régression linière de la teneur en polyphénols (A) et en Flavonoïdes (B) ($\mu\text{g/g}$) en fonction de la dose du plomb appliquée (en ppm) avec le R^2 (R-square) pour V1 (Sidi Aïch) et V2 (Super Aguadulce).

Figure36 : Régression linière de l'activité de la catalase (A) et de la peroxydase (B) (unité) en fonction de la dose du plomb appliquée (en ppm) avec le R^2 (R-square) pour V1 (Sidi Aïch) et V2 (Super Aguadulce).

-☪* LISTE DES TABLEAUX *☪-

Tableau 1 : Evolution de la production mondiale de plomb de 2015 à 2020 (kt/an) (**ILZSG, 2020**).

Tableau 2 : Principales propriétés physico-chimiques du plomb (**Pourrut, 2008**).

Tableau 3 : Effets du plomb sur la concentration en éléments minéraux des parties aériennes et racinaires (**Pourrut, 2008**).

Tableau 4 : Effets du plomb sur les activités d'enzymes intervenant dans différents processus métaboliques (modifié d'après **Sharma et Dubey, 2005**).

Tableau 5 : Caractéristiques du terreau.

Tableau 6 : Propriétés du substrat.

Tableau 7 : Composition de la solution nutritive.

Tableau 8 : Effet du plomb sur le nombre des folioles des deux variétés V1 (Sidi Aïch) et V2 (Super Aguadulce).

Tableau 9 : Effet du plomb sur la surface foliaire des deux variétés V1 (Sidi Aïch) et V2 (Super Aguadulce).

Tableau 10 : Effet du plomb sur la hauteur de la tige des deux variétés V1 (Sidi Aïch) et V2 (Super Aguadulce).

Tableau 11 : Effet du plomb sur le volume racinaire des deux variétés V1 (Sidi Aïch) et V2 (Super Aguadulce).

Tableau 12 : Effet du plomb sur le poids sec en g de la partie aérienne (ADW) et partie racinaire (RDW) des deux variétés V1 (Sidi Aïch) et V2 (Super Aguadulce).

Tableau 13 : analyse de la variance des paramètres morphologiques.

Tableau 14 : Effet du plomb sur la teneur en chlorophylle a des deux variétés V1 (Sidi Aïch) et V2 (Super Aguadulce).

Tableau 15 : Effet du plomb sur la teneur en chlorophylle b des deux variétés V1 (Sidi Aïch) et V2 (Super Aguadulce).

Tableau 16 : Effet du plomb sur la teneur en caroténoïdes (mg/g) des deux variétés V1 (Sidi Aïch) et V2 (Super Aguadulce).

Tableau 17 : Effet du plomb sur la teneur en eau relative (%) des deux variétés V1 (Sidi Aïch) et V2 (Super Aguadulce).

Tableau 18 : Effet du plomb sur la teneur en sucres solubles ($\mu\text{g/g}$) des deux variétés V1 (Sidi Aïch) et V2 (Super Aguadulce).

Tableau 19 : Effet du plomb sur la teneur en protéines (mg/g) des deux variétés V1 (Sidi Aïch) et V2 (Super Aguadulce).

Tableau 20 : Effet du plomb sur la teneur en proline ($\mu\text{g/g}$) des deux variétés V1 (Sidi Aïch) et V2 (Super Aguadulce).

Tableau 21 : Analyse de la variance des paramètres physiologiques.

Tableau 22 : Effet du plomb sur l'accumulation du plomb (mg/g) des deux variétés V1 (Sidi Aïch) et V2 (Super Aguadulce).

Tableau 23 : Analyse de la variance de l'accumulation du plomb dans les plantes.

Tableau 24 : Effet du plomb sur la teneur en polyphénols totaux ($\mu\text{g/mg MS}$) des deux variétés V1 (Sidi Aïch) et V2 (Super Aguadulce).

Tableau 25 : Effet du plomb sur la teneur en flavonoïdes totaux ($\mu\text{g/mg MS}$) des deux variétés V1 (Sidi Aïch) et V2 (Super Aguadulce).

Tableau 26 : Effet du plomb sur l'activité de la catalase ($\Delta\text{DO}_{240}/\text{mg protéine}$) des deux variétés V1 (Sidi Aïch) et V2 (Super Aguadulce).

Tableau 27 : Effet du plomb sur l'activité de la peroxydase ($\Delta\text{DO}_{470}/\text{mg protéine}$) des deux variétés V1 (Sidi Aïch) et V2 (Super Aguadulce).

Tableau 28 : analyse de la variance des paramètres de l'activité antioxydante chez la fève.

Tableau 29 : Récapitulatif des résultats de l'effet du plomb sur le comportement morphologiques, physiologiques et enzymatiques de la fève.

-☪* LISTE DES ANNEXES *☪-

Annexe 1 : L'analyse de la variance ANOVA (2 facteurs)

Annexe 2 : Comparaison entre les moyennes (test de Dunnett)

Annexe 3 : Régression linéaire

Annexe 4 : Utilisation le logiciel « ImageJ » pour la détermination de la surface foliaire

Table des Matières

-❧* TABLE DES MATIERES *❧-

DEDICACES

REMERCIEMENTS

RESUME

SUMMARY

ملخص

LISTE DES ABREVIATIONS

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAU

LISTE DES ANNEXES

INTRODUCTION GENERALE	1
CHAPITRE I. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	5
I. Généralités sur le plomb	6
1. Historique sur le plomb	6
2. Cycle biogéochimique.....	6
3. Propriétés physico-chimiques du plomb	7
4. Pollution par le plomb	8
4.1. Utilisations du plomb	8
4.2. Sources de contamination par le plomb	8
4.2.1. Sources naturelles.....	9
4.2.2. Sources anthropiques.....	9
5. Concentration de plomb dans l'environnement.....	9
II. Présence du plomb dans le système Sol-plante.....	11
1. Dans le sol	11
1.1. Interaction du plomb avec les différents constituants du sol.....	11
1.1.1. Argiles	11
1.1.2. Matière organique du sol (MOS).....	12
1.1.3. Oxydes et hydroxydes de fer et de manganèse.....	13
1.1.4. Carbonates et Phosphates	13
1.2. Mobilité du plomb dans le sol	13
1.2.1. Facteurs modifiant la mobilité du plomb.....	13
1.3. Action du plomb sur le sol	15
2. Interaction Sol-Plantes	15
2.1. Mécanismes d'interaction sol-plante : impact des activités racinaires.....	16
2.1.1. Modification du pH	16

2.1.2. Modification des concentrations ioniques dans la rhizosphère	16
2.1.3. Exsudation racinaire dans la rhizosphère	16
3. Transfert du plomb du sol vers les racines	16
4. Dans la plante	17
4.1. Phytodisponibilité.....	18
4.2. Absorption.....	18
4.4. Translocation du plomb.....	19
4.5. Accumulation	20
III. Toxicité du plomb	21
1. Effets du Plomb sur la santé humaine	21
1.1. Toxicité du plomb	21
1.3. Voies d'expositions	21
1.4. L'intoxication au plomb chez les enfants.....	22
2. Effets du plomb sur les plantes.....	24
2.2.1. Action sur la germination et la croissance.....	24
2.2.2. Effets sur le statut hydrique.....	25
2.2.3. Effets sur la nutrition minérale.....	26
2.2.4. Action sur les activités enzymatiques.....	26
2.2.5. Action sur les protéines.	29
2.2.6. Effets sur la photosynthèse.....	30
2.2.7. Effets sur la respiration.....	30
2.2.8. Effets antimutogène et génotoxicité du plomb	31
IV. Modèle biologique <i>Vicia faba</i> L.....	33
1. Classification.....	33
2. Aspect et particularités	33
3. Culture.....	34
4. Caryotype et cycle cellulaire	34
5. Intérêt en écotoxicologie	35
CHAPITRE II. MATERIEL ET METHODES	36
1. Expérimentation	37
1.1. Objectif du travail.....	37
1.2. Matériel	37
1.2.1. Matériel végétal.....	37
1.2.2. Matériel substrat	38
1.2.3. Dispositif expérimental	39
1.2.4. Conduite de l'essai	39

1.2.5. Mise en germination.....	39
1.2.6. Application du stress	40
2. Méthodes	42
2.1. Paramètres analysés.....	42
2.1.1. Paramètres morpho-physiologiques	42
2.1.1.1. Paramètres morphologiques	42
2.1.1.2. Paramètres physiologiques	42
A) Teneur relative en eau (TRE).....	42
B) Paramètres biochimiques.....	43
2.1.2. Paramètres enzymatiques	43
a. Métabolites secondaires.....	43
b. Dosage des enzymes antioxydantes.....	44
2.1.3. Dosage du plomb.....	44
2.2. Analyse Statistique.....	44
CHAPITRE III. RESULTATS ET DISCUSSION	45
I. Présentation des Résultats.....	46
I.1. Effet du plomb sur les paramètres morphologiques de la fève	46
I.1.1. Nombres des folioles.....	46
I.1.2. Surface foliaire.....	48
I.1.3. Hauteur de la tige	49
I.1.4. Volume racinaire.....	50
I.1.5. Poids sec.....	52
I.1.6. Corrélacion des paramètres morphologiques.....	54
I.2. Effet du plomb sur les paramètres physiologiques de la fève	56
I.2.1. Teneur en pigments photosynthétiques.....	56
I.2.1.1. Chlorophylle a.....	56
I.2.1.2. Chlorophylle b.....	58
I.2.1.3. Caroténoïdes.....	59
I.2.2. Teneur en eau relative (TRE).....	60
I.2.3. Teneurs en sucres solubles.....	62
I.2.4. Teneur en protéines.....	63
I.2.5. Teneur en Proline	65
I.2.6. Corrélacion des paramètres physiologiques.....	67
I.3. Accumulation du plomb dans la fève.....	70
I.4. Effet du plomb sur l'activité antioxydante non-enzymatique	72
I.4.1. Polyphénols (TPC).....	72

I.4.2. Flavonoïdes (TFC)	74
I.5. Effet du plomb sur l'activité enzymatique antioxydante	75
I.5.1. Activité de la Catalase (E.C. 1.11.1.6).....	75
I.5.2. Activité de la Peroxydase (E.C. 1.11.1.7.).....	77
I.1.6. Corrélation des paramètres de l'activité antioxydante	79
II. Discussion Générale	81
1. Paramètres morphologiques	81
2. Paramètres physiologiques	83
2.1. Teneur Relative en Eau (TRE)	83
2.2. Pigments photosynthétiques (Chlorophylles).....	84
2.3. Sucres Solubles	86
2.4. Protéines	86
2.5. Proline	87
3. Accumulation du plomb dans la plante	88
4. Système anti-oxydant	89
4.1. Polyphénols et Flavonoïdes (TPC et TFC).....	89
4.2. Catalase et Péroxydase	90
CONCLUSION GENERALE	93
Recommandations	99
Références bibliographiques	
Publication	
Annexes	

Introduction Générale

Introduction Générale

Le plomb (Pb) est un métal utilisé par l'homme depuis plusieurs milliers d'années (**Gupta et al., 2020**). Il est intégré dans la vie quotidienne dans presque toutes les activités, sa surexploitation contribue à l'épuisement de ces réserves, et de puis, le plomb utilisé est de plus en plus recyclé (**UNEP, 2010**). Actuellement, la consommation de plomb continue de diminuer, sa principale utilisation étant dans les piles et les batteries (**Külahcı, 2020**).

Le plomb est présent dans le sol, mais également dans l'eau, dans l'air et dans les organismes vivants, c'est l'élément le plus commun et le plus toxique qui affecte les organismes vivants dans l'environnement (**Shahid et al., 2011**). En fait, après l'arsenic, le plomb est considéré comme le polluant le plus dangereux (**ATSDR, 2017 ; 2020**). En raison de ses propriétés physico-chimiques importantes, le plomb est très utilisé dans la vie quotidienne, c'est un élément chimique très important, abondant mais dangereux.

Comme tout autre élément trace, sa provenance dans l'environnement est due à la fois à des sources naturelles et anthropiques. Dans la nature, on le trouve généralement sous forme de minéraux, en combinaison avec d'autres éléments. Il occupe le 37^e rang des éléments présents dans la croûte terrestre avec une concentration moyenne dans les sols d'environ 50 ppm (**Meena et al., 2020**). Le plomb est introduit dans la nature par les éruptions volcaniques, les feux de forêts et par divers processus d'érosion des roches et du sol (**Michalak, 2001**). La contribution anthropique de la propagation du plomb résulte de l'introduction de ce métal dans de nombreux produits, il est utilisé comme composant principal en diverses matières notamment dans la fabrication des plastiques, des tuyaux, les peintures, les articles en céramique, les cosmétiques, le vin, les émaux et les finitions, la verrerie et l'essence, il est donc largement distribué et mobilisé dans l'environnement (**Natasha et al., 2020**).

Le comportement du plomb dans un sol et son interaction avec ce dernier dépend de sa dynamique propre et aux caractéristiques pédologiques et physico-chimiques (pH, Eh, nature et proportions des argiles, matières organiques et oxydes, etc.) du sol même (**Baize, 1997**). Le plomb étant en général considéré comme un élément peu mobile dans les milieux naturels, il a donc tendance à s'accumuler dans les horizons superficiels des sols (**Cecchi, 2008 ; Baize, 2010**). De point de vue physiologique le plomb n'a aucun rôle et reste toxique même à de faibles doses (**Beak et al., 2006**). Le plomb est un élément non biodégradable, il persiste dans l'environnement et peut donc se transmettre aux plantes et à l'homme via le sol l'air et l'eau (**Natasha et al., 2020**).

L'exposition au plomb et à ses composés chez l'être humain se produit principalement dans le milieu professionnel et au cours des différents processus industriels (**Nas et Ali,**

Introduction Générale

2018). L'exposition au plomb se produit principalement soit par inhalation des particules de poussière ou aérosols contaminées par le plomb ou par ingestion d'aliments, d'eau et de peintures contaminés au plomb (**Tchounwou *et al.*, 2012**). Le plomb s'accumule dans les organes du corps comme le cerveau, les os et inhibe leur bon fonctionnement en entravant la formation d'hémoglobine et conduit souvent à l'apparition du saturnisme ou même à la mort (**Meena *et al.*, 2020**). Le plomb peut provoquer de graves lésions des globules rouges, toucher les reins, le cerveau, le système nerveux et le tractus gastro-intestinal (**Baldwin et Marshall 1999**), il peut causer des effets sur le système rénal, cardiovasculaire et reproductif (**Patra *et al.*, 2011 ; FAO/OMS 2011 ; Abdullahi 2013 ; Sun *et al.*, 2014**), une perte supplémentaire de quotient intellectuel (QI) une détérioration auditive et mentale, une hypersensibilité, une altération du fonctionnement neuro-comportemental (**Grandjean et Landrigan 2014**).

Chez les plantes, l'absorption du plomb peut se faire à partir des racines, mais également à partir des organes aériens, ou bien par l'intermédiaire des deux (**Pourrut, 2008**). La quantité de plomb présente dans les divers organes d'une plante dépend du transport de l'extérieur des racines vers l'intérieur, puis de sa translocation des racines vers les feuilles (**Patra *et al.*, 2004, Arshad *et al.*, 2008**). En premier lieu, le Pb^{2+} présent dans la solution du sol se lie au groupement carboxyle de l'acide uronique composant le mucilage autour des racines (**Sharma et Dubey, 2005**), puis se fixe sur les charges négatives des parois cellulaires (**Cecchi, 2008**). Le passage du plomb à l'intérieure des racines suit en grande partie la voie apoplasmique (**Tung et Temple, 1996 ; Seregin *et al.*, 1998 ; Patra *et al.*, 2004**). Sa translocation vers les parties aériennes est en fonction de plusieurs paramètres, elle peut varier considérablement en fonction de la forme du métal, mais également de l'espèce végétale et des conditions édaphiques (**Pourrut *et al.*, 2011**). Pour la plupart des espèces, la majorité du plomb absorbé par les plantes réside dans les racines, et seulement une faible proportion est transloquée vers les parties aériennes (**Wińska-Krysiak *et al.*, 2015**).

Les effets du plomb sur les plantes peuvent varier en fonction de la durée d'exposition, de l'intensité du stress, du stade de développement de la plante, des organes considérés et évidemment des espèces étudiées voire même du cultivar (**Pourrut *et al.*, 2011**). En présence de fortes doses, le plomb conduit à l'inhibition totale de la germination, réduit le développement de la plantule et des racelles (**Islam *et al.*, 2007; Dey *et al.*, 2007 ; Gichner *et al.*, 2008 ; Gopal et Rizvi, 2008**), réduit le pool protéique (**Jana et Choudhuri, 1982; Mohan et Hosetti, 1997; Saxena *et al.*, 2003; Mishra *et al.*, 2006b; Garcia *et al.* 2006; Piotrowska *et al.*, 2009**) et modifie la composition qualitative des protéines (**Beltagi, 2005**).

Introduction Générale

Le plomb peut affecter l'activité enzyme et cause un dysfonctionnement d'un nombre très important d'enzymes impliqués dans divers processus métaboliques (Mitra *et al.*, 2020). Il conduit à une forte inhibition de la photosynthèse, du rendement photosynthétique et à une limitation du taux d'assimilation de CO₂ (Xiong *et al.*, 2006 ; Hu *et al.*, 2007 ; Liu *et al.*, 2008 ; Piotrowska *et al.*, 2009 ; Singh *et al.*, 2010 ; Cencki *et al.*, 2010 ; Wierzbicka., 2010). Le plomb affecte également la nutrition minérale des plantes, en perturbant le prélèvement et le transport des nutriments (Xiong, 1997 ; Chatterjee *et al.*, 2004; Sharma et Dubey 2005; Gopal et Rizvi 2008). Sur le plan génétique les effets toxiques du plomb sur les plantes se traduisent par des dommages de l'ADN (Pourrut *et al.* 2011 ; Shahid *et al.*, 2011 ; Kumar *et al.*, 2017) et des anomalies chromosomiales (Rodriguez *et al.*, 2013).

Le choix de la plante est basé sur l'intérêt qu'elle présente de point de vue agronomique et éco-toxicologique. Ainsi, la plante utilisée la fève, une légumineuse annuelle botaniquement connue sous le nom de *Vicia faba* L. (Hanelt et Mettin, 1989). La fève cultivée est utilisée pour l'alimentation humaine et animale (Singh et Bhatt, 2012). C'est l'une des plus anciennes cultures au monde, elle est la troisième plus importante légumineuse fourragère au monde en termes de surface et de production après le soja (*Glycine max* L.) et le pois (*Pisum sativum* L.) (Mihailovic *et al.*, 2005). Elle peut être utilisée comme légume, verte ou séchée, fraîche ou en conserve (Gasim et Link, 2007). La production mondiale de graines de fèves vertes (1998 à 2003) a été estimée à 940 000 t/an sur 2,6 millions d'hectares, l'Algérie (118 000 tonnes/an), la Chine (114 000 tonnes/an) et le Maroc (112 000 tonnes/an) étant les principaux producteurs (FAO, 2009). En plus de son intérêt agronomique, la fève est utilisée dans les études de la réponse aux différents stress (Duan *et al.*, 1999 ; Marcato-Romain *et al.*, 2009).

Notre travail consiste d'une part à évaluer l'impact de la phytotoxicité du plomb sur le comportement et le développement de la fève et la réponse de la plante au stress provoqué par le plomb d'autre part. Cela est établi par l'étude de l'application de différentes doses de plomb sous forme Pb(NO₃)₂, dans le substrat de culture sur deux variétés de la fève (*Vicia faba* L.). Les réactions des plants soumises à ce stress sont évaluées par des paramètres d'ordres morpho-physiologiques et enzymatiques.

Pour répondre à cet objectif, cette thèse a été structurée selon les chapitres suivants :

- Chapitre I. Synthèse bibliographique
- Chapitre II. Matériel et méthodes
- Chapitre III. Résultats et discussion

Enfin une conclusion générale et les perspectives.

Chapitre I.

Synthèse bibliographique

I. Généralités sur le plomb

1. Historique sur le plomb

Le plomb (Pb) est un métal utilisé par l'homme depuis plusieurs milliers d'années. Des globules de Pb métallique fabriqués en 6400 avant J.-C. ont été découverts à **Çatalhöyük** (actuellement en République de Turquie) (**Gupta et al., 2020**).

La prise en compte des problèmes environnementaux et le développement de nouvelles technologies ont conduit à la diminution ou à l'arrêt de certaines utilisations du plomb (canalisations, soudure, peinture, pesticides, anti-détonnant dans l'essence...). Actuellement, la consommation de plomb continue de diminuer, sa principale utilisation étant dans les piles et les batteries (**Külahcı, 2020**). La production primaire de plomb dans le monde diminue (Tab.1) et le plomb recyclé représente la majeure partie du plomb utilisé (**UNEP, 2010**).

Tableau 1: Evolution de la production mondiale de plomb de 2015 à 2020 (kt/an) (**ILZSG, 2020**).

Année	2015	2016	2017	2018	2019	2020 Jan-Jun
Production (1000 tonnes)	4857	4699	4564	4625	4650	2155

2. Cycle biogéochimique

Le plomb dans l'environnement provient de sources naturelles et anthropiques. Ce métal est présent dans le sol et dans tous les autres compartiments de l'environnement : eau, air et même les êtres vivants (Fig.1).

La teneur moyenne du plomb est de 0.002% dans la croûte terrestre, il est le 37^e élément le plus abondant de la croûte terrestre, sa concentration représente environ 0,003 ppb dans l'eau de mer (**Sarkar et al., 2011**). En l'absence de toute action anthropique, les teneurs naturelles du plomb total dans le sol varient de 15 à 20 ppm (**Aubert et Pinta ; 1977**), avec une valeur moyenne d'environ 50 ppm (**Meena et al., 2020**). Dans le cas d'anomalies géochimiques, sa teneur peut atteindre plus de 3000 ppm (**Cecchi, 2008**).

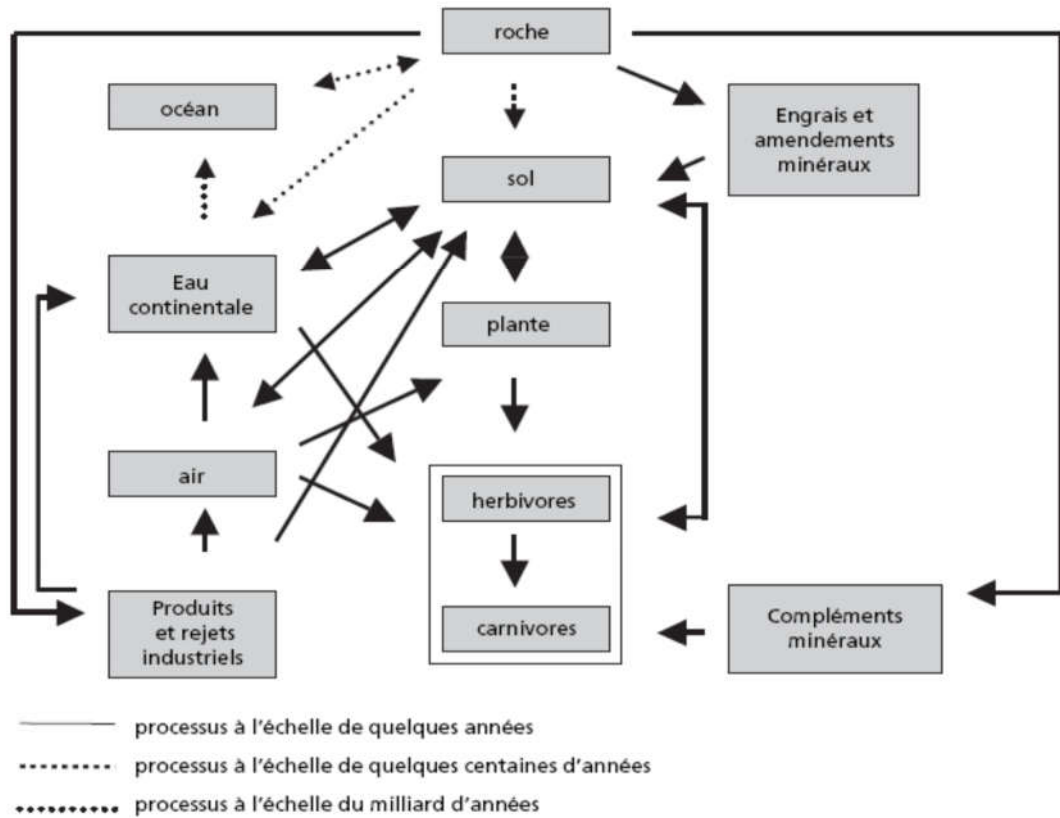


Figure 1 : cycle biogéochimique des éléments traces métalliques (ETM) adapté selon Lamand, (1991) (Tremel-Schaub et Feix, 2005).

3. Propriétés physico-chimiques du plomb

Les principales propriétés du plomb sont représentées dans le tableau suivant :

Tableau 2 : Principales propriétés physico-chimiques du plomb (Pourrut, 2008).

Symbole	Pb
Numéro Atomique	82
Masse atomique	207,2 g.mol ⁻¹
Point de fusion	327.42°C
Densité	11,35
Configuration électronique	[Xe] 0, +2, +4 4f ¹⁴ 5d ¹⁰ 6s ² 6p ²
Valence	0, +2, +4
Résistivité électrique à 20°C	20,65 μΩ.cm
Rayons ioniques	
Pb ²⁺	0,94 à 1,49 Å
Pb ⁴⁺	+ 0,78 à 0,94 Å

4. Pollution par le plomb

Le plomb est l'élément le plus toxique parmi les métaux présents dans l'environnement qui affectent négativement les organismes vivants (Shahid *et al.*, 2011). En fait, après l'arsenic, le plomb est considéré comme le polluant le plus dangereux par l'Agency of Toxic Substance and Disease Registry (ATSDR 2020).

4.1. Utilisations du plomb

Les utilisations du plomb sont diverses (Natasha *et al.*, 2020):

- les plastiques,
- les tuyaux,
- les peintures,
- les articles en céramique,
- les cosmétiques,
- le vin,
- les glaces et les vernis,
- la verrerie,
- l'essence.

4.2. Sources de contamination par le plomb

La contamination au plomb de l'environnement, du sol et de la chaîne alimentaire augmente à un rythme plus rapide et entraîne la contamination des écosystèmes naturels (Natasha *et al.*, 2020). La pollution de l'environnement par le plomb est due à des sources naturelles ou anthropiques (Fig.2).

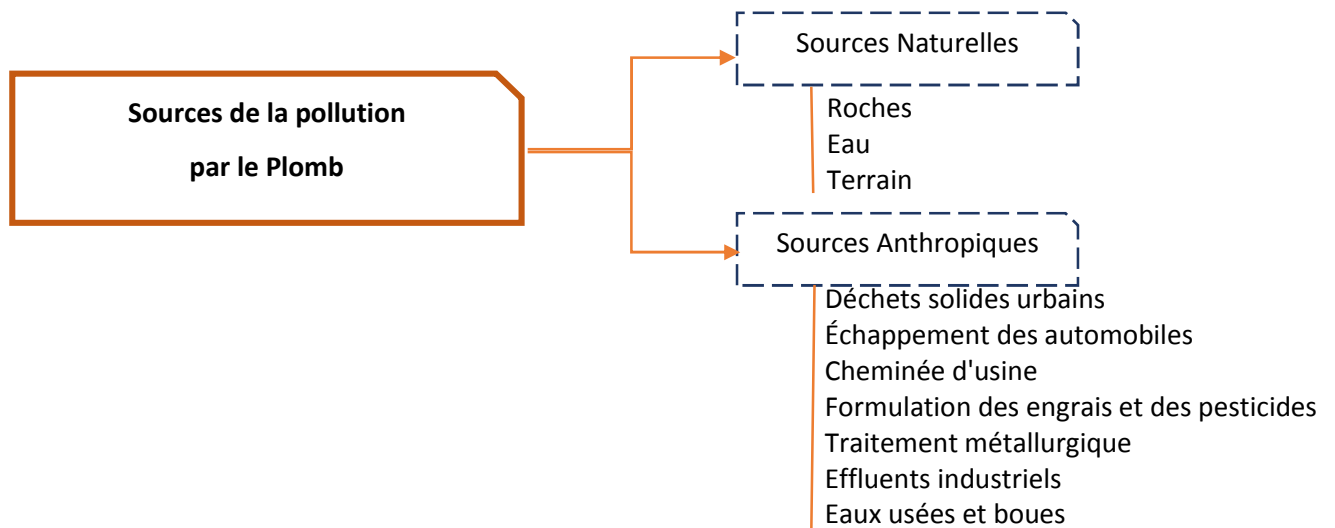


Figure 2 : Source de la pollution de l'environnement par le plomb (d'après Dotaniya *et al.*, 2018a).

4.2.1. Sources naturelles

Les phénomènes majeurs intervenant dans l'enrichissement du fond pédogéochimique FPGN par le plomb sont l'héritage reçu de la roche mère sur laquelle le sol s'est formé, la contribution du cycle biogéochimique dans les sols et dans les plantes et les transferts pédologiques verticaux et latéraux (**Migeon, 2009**). A cela s'ajoute les apports diffus aériens libérées par l'activité volcanique, les embruns maritimes et les vents lointains (**Migeon, 2009**).

4.2.2. Sources anthropiques

Les principales sources de la contamination en plomb sont les rejets anthropiques (Fig.3). Ils proviennent principalement des industries qui extraient et purifient le plomb naturel et qui recyclent les composants contenant du plomb comme les batteries, les retombées atmosphériques du trafic routier (**Sharma et Dubey, 2005**), les déchets industriels, la détérioration des peintures extérieures à base de plomb et les réseaux de canalisations de distribution d'eau contenant du plomb (**Migeon, 2009**).

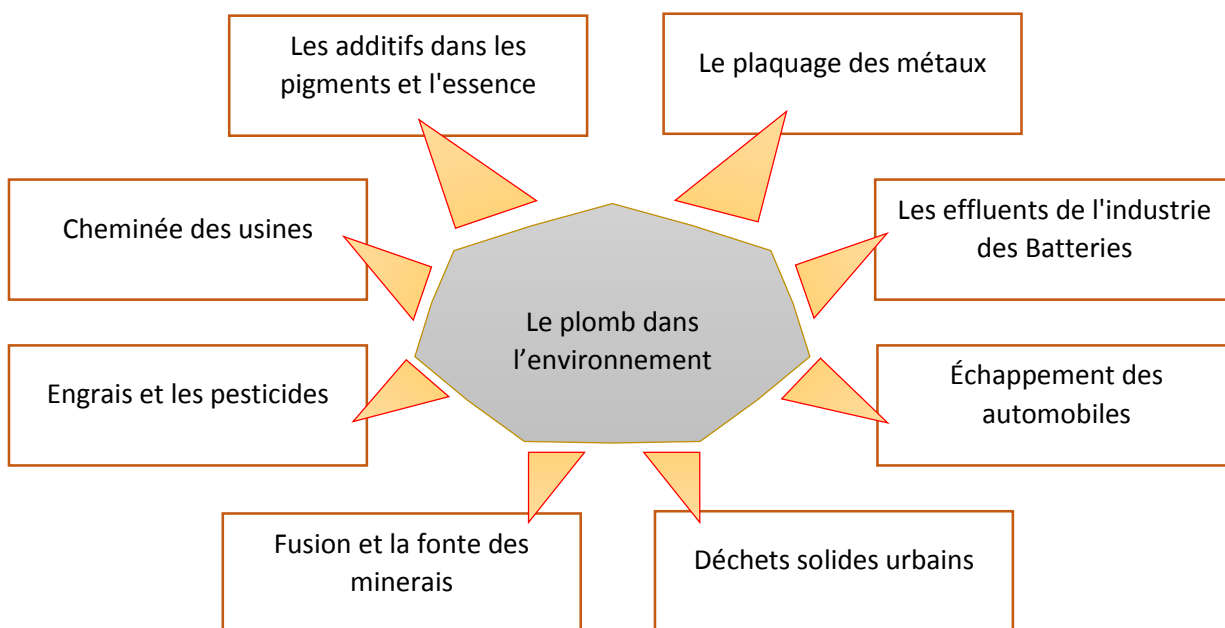


Figure 3 : Sources anthropiques de la pollution en plomb (d'après **Sharma et Dubey, 2005**).

5. Concentration de plomb dans l'environnement

La concentration du plomb dans l'environnement s'observe à différents niveaux. Premièrement, le plomb se concentre dans l'atmosphère en particulier dans les villes métropolitaines ou la contamination de l'air peut causer des problèmes pulmonaires (**Dotaniya, et al., 2020**). Les niveaux de l'accumulation du plomb dans l'atmosphère

varient en fonction de plusieurs facteurs (type du carburant, la distance par rapport à la route, le type de véhicule et la présence de la ceinture verte) (Gloag 1981). Les valeurs limites du plomb dans l'air sont évaluées à la limite de $0.5\mu\text{g}/\text{m}^3$ (E.E.A, 2017).

Les particules du plomb transportées par l'air se déposent sur le sol et s'accumulent progressivement dans les horizons de surface (Baize, 2010). Des estimations mondiales révèlent qu'environ 4,5 à 5,5 millions de tonnes de plomb utilisées dans l'essence restent pour longtemps dans le sol (Meena *et al.*, 2020). D'autres pratiques telles que l'utilisation des eaux non conventionnées et des boues d'épuration dans l'agriculture ou bien l'épandage des engrais contribuent également à l'enrichissement progressif des sols cultivés (Meena *et al.*, 2020). L'augmentation de la concentration du plomb dans le sol réduit l'activité microbienne du sol, les populations et aussi la diversité microbienne (Dotaniya *et al.*, 2020). L'accumulation du plomb influe négativement sur la dynamique des éléments nutritifs utiles pour le développement des plantes, ce qui affecte le métabolisme de celles-ci et, en fin de compte, réduit la croissance et le rendement des cultures (Natasha *et al.*, 2020) et produit des aliments contaminés (Dotaniya, *et al.*, 2020).

Parmi les voies de la concentration du plomb dans l'environnement, la contamination de la chaîne alimentaire est la principale source de contamination par le Pb dans le corps humain (Dotaniya, *et al.*, 2020). Les cultures sur des sols pollués produisent des aliments contaminés qui sont absorbés lors de l'ingestion. Les cultures de feuilles absorbent une plus grande quantité de Pb des sols pollués que les cultures de céréales (Dotaniya *et al.*, 2018b). L'application de substances organiques comme les résidus de culture, le fumier de ferme, le lombricompostage réduisent le transfert de Pb du sol vers les parties comestibles des plantes (Dotaniya, *et al.*, 2020).

L'eau est également une source primordiale de la contamination par le plomb chez les êtres humains (Dotaniya, *et al.*, 2020). La concentration géogénique de Pb entraîne une pollution des eaux souterraines (Tanouayi *et al.*, 2015) et réduit les chances de minimiser la toxicité à l'échelle planétaire (Dotaniya, *et al.*, 2020). L'épandage à long terme d'eaux usées ou d'effluents industriels (Tanouayi *et al.*, 2015) et le déversement de déchets industriels sans aucun traitement sur des sols sains ou dans des masses d'eau douce accélère la pollution des eaux souterraines (Dotaniya, *et al.*, 2020).

II. Présence du plomb dans le système Sol-plante

1. Dans le sol

Le plomb est un élément minéral naturellement présent dans la croûte terrestre, son origine dans les sols est liée à sa présence dans les roches mères, ceci peut cependant conduire parfois à des teneurs plus élevées dans les gisements (Cecchi, 2008). Mais, ce sont surtout les activités humaines qui ont conduit à leur accumulation dans le sol (Cecchi, 2008 ; Baize, 2010).

Le comportement du plomb dans un sol dépend de différents facteurs comme sa dynamique propre mais également des caractéristiques pédologiques et physico-chimiques du sol (Baize, 1997). Il peut être soit sous forme liée aux particules de sol soit dans la phase aqueuse (Bataillard *et al.*, 2012) (Fig.4). Dans les sols contaminés, le devenir des éléments traces métalliques (ETM) est sous l'influence de la spéciation, de la forme chimique et la teneur de ces éléments dans l'environnement (Hinsinger et Gilkes, 1996 ; Dumat *et al.*, 2001 ; Ferrand *et al.*, 2006).

1.1. Interaction du plomb avec les différents constituants du sol

Les interactions entre le plomb et le sol dépendent des caractéristiques physico-chimiques du sol (pH, Eh, nature et proportions des argiles, matières organiques et oxydes, etc.)

1.1.1. Argiles

Les argiles possèdent une forte réactivité chimique et physique, ainsi qu'une importante surface de contact (Bentahar, 2016). Elles peuvent développer de grande surface spécifique, et peuvent fixer les métaux par 3 mécanismes principaux : l'échange ionique, l'adsorption physique et l'adsorption chimique (Alloway, 1995). L'adsorption du Pb varie selon le type de minéral argileux ; ainsi, la sélectivité de l'illite pour le Pb est environ 32 fois plus élevée que celle de la montmorillonite (Suzuki *et al.*, 2014). Mao *et al.*, 2014 ont signalé qu'une petite fraction de Pb a été absorbée par les $\text{Ca}(\text{ClO}_4)_2$ sur les montmorillonites par antagonisme entre Ca et Pb. Parmi les minéraux argileux, on compte aussi la vermiculite qui présente une forte affinité pour les réactions d'échange avec le plomb (Rickard et Nriagu, 1978).

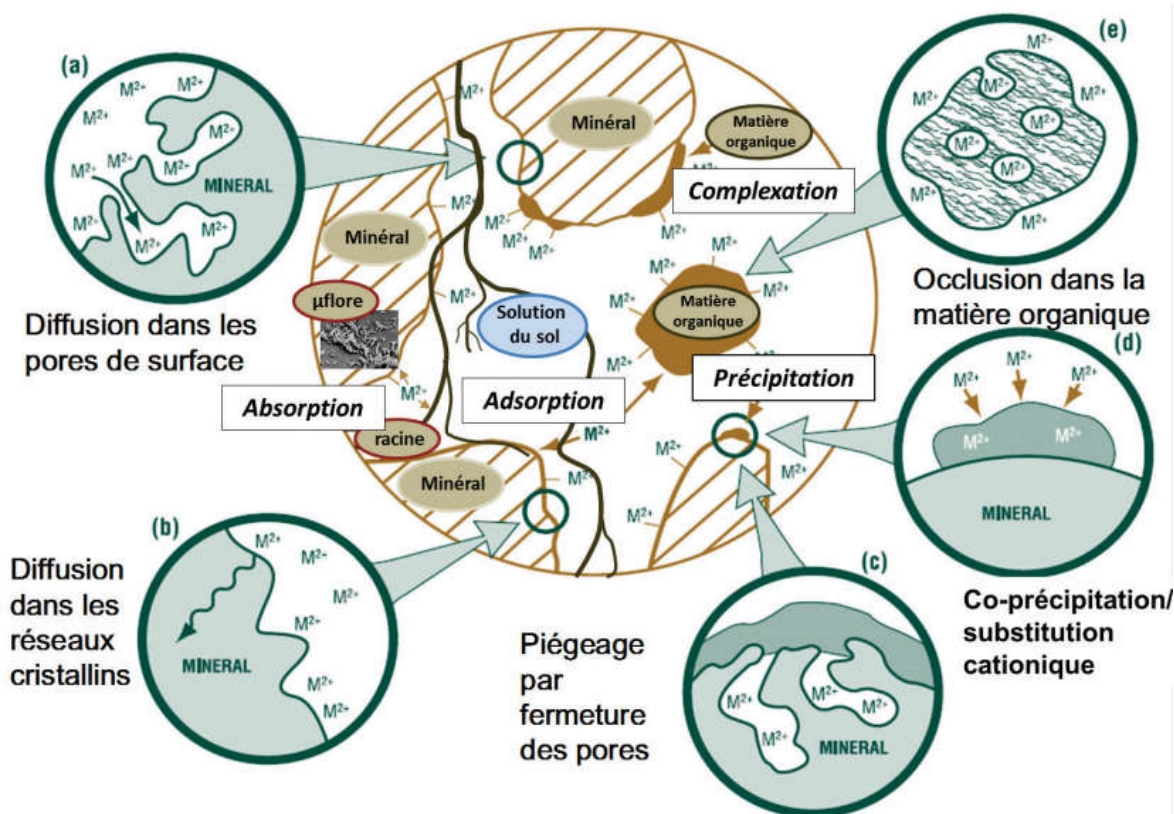


Figure 4 : Devenir des ETM dans un sol. Modifié de **McLaughlin (2001)** selon **Bataillard *et al.*, (2012)**.

En italique sont indiqués les mécanismes ou processus considérés comme rapides qui déplacent les éléments de la phase liquide vers les surfaces solides (à l'exception de l'absorption par les cellules vivantes).

Les processus notés de (a) à (e) déplacent les éléments de la surface vers l'intérieur des phases solides du sol. Ils sont considérés plus lents et plus difficilement réversibles.

1.1.2. Matière organique du sol (MOS)

De nombreux travaux ont permis de mettre en évidence l'affinité des ETM pour les MOS (**Morin *et al.*, 1999** ; **Lamy, 2002** ; **Dumat *et al.*, 2006** ; **Migeon, 2009**). Cette affinité se traduit par des réactions d'absorption, qui sont contrôlées par des complexes de sphère interne ou externes ou bien par des mécanismes d'échanges ionique (**Evans, 1989**; **Kinniburgh *et al.*, 1996**). Les métaux se complexent à des matières organiques de poids moléculaires variables (Stevenson, 1982), par des substances humiques (**Hatira *et al.*, 1990** ; **Alloway, 1995** ; **Tipping *et al.*, 1995**), la lignine, les acides organiques de faible poids moléculaire (**Baker et Walker, 1990** ; **Xin *et al.*, 2015** ; **Khan *et al.*, 2016**) et par les polysaccharides (**Mench *et al.*, 1988**).

1.1.3. Oxydes et hydroxydes de fer et de manganèse

Les oxydes et hydroxydes de fer et de manganèse jouent un rôle important dans la rétention des ions métalliques notamment le plomb (**Deschamps *et al.*, 2006**). Les oxydes hydriques de Mn et de Fe sont les composants vitaux du sol qui influencent la solubilité du plomb, les oxydes de Mn ont une affinité relativement forte pour l'adsorption du plomb que les oxydes de Fe (**Blanchard, 2000 ; Zulfikar *et al.*, 2019**). La quantité d'ion métallique absorbé par les oxydes de fer et de manganèse dépend fortement du pH du sol (**Deschamps *et al.*, 2006**).

1.1.4. Carbonates et Phosphates

La formation des carbonates ou de phosphates métalliques se produit le plus souvent lorsque les métaux quittent la solution du sol pour précipiter au sein des phases minérales (**Diyab, 2005**). Les carbonates jouent un rôle important dans le contrôle du pH du sol (**Deschamps *et al.*, 2006**). Les ions métalliques se fixent sur la surface et peuvent aussi s'incorporer dans la maille cristalline des carbonates (**Bourg *et al.*, 1988**).

D'autres associations sont possibles avec les phosphates. **Nriagu (1984)** démontre que la chloropyromorphite ($Pb_5(PO_4)_3Cl$) est un minéral très peu soluble, et qu'elle est capable de fixer le plomb dans les sols. La présence du plomb dans les sols riches en phosphates favorise la formation des minéraux qui diminuent sa mobilité, et également sa phytodisponibilité (**Sarret *et al.*, 2001 ; Diyab, 2005**).

1.2. Mobilité du plomb dans le sol.

Le plomb étant en général considéré comme un élément peu mobile dans les milieux naturels, il a donc tendance à s'accumuler dans les horizons superficiels des sols (**Cecchi, 2008**). Les travaux de **Baize (2010)** montrent que le plomb est essentiellement concentré dans les 30 premiers centimètres. Sa mobilité est principalement contrôlée par sa spéciation, par les processus d'adsorption/désorption et celles de dissolution/précipitation (**Sanyal et Majumdar 2009**), cette mobilité est fonction de certains paramètres tels que le pH, le potentiel redox, la composition minéralogique du sol ou du sédiment et la présence de ligands ou de colloïdes dans la phase (**Cecchi, 2008 ; Dotaiya *et al.*, 2020**).

1.2.1. Facteurs modifiant la mobilité du plomb

a. Texture du sol

La mobilité du Pb dépend de la texture du sol (**Jagetiya et Kumar, 2020**). Les argiles adsorbent les ions de métaux lourds par adsorption spécifique et échange d'ions (**Kamel *et al.*, 2004**). **Qian *et al.*, (1996)** ont signalé que le plomb était localisé généralement dans la fraction argileuse, tandis qu'une petite partie était localisée dans la fraction sableuse.

b. pH

Le pH influe sur la mobilité et la biodisponibilité des métaux pour les plantes (Wood, 2012). Les risques de mobilité sont plus grands dans les milieux acides, alors qu'ils diminuent avec l'élévation du pH (Meena *et al.*, 2020). L'adsorption du plomb devient significative à un pH de 3-5, et elle devient critique à un pH de 6-7 (Esbaugh *et al.*, 2012). En fait, l'adsorption spécifique du Pb dépend bien du pH du sol (Yang *et al.*, 2011a) et, à faible pH du sol, l'adsorption est le processus le plus important que la précipitation de la phase solide, cela pour réduire la concentration d'ions Pb en solution, au fur et à mesure que le pH augmente la précipitation l'emporte sur la mobilité du plomb dans le sol (Esbaugh *et al.*, 2012). L'introduction de substances inorganiques dans le sol pour neutraliser l'acide réduit la mobilité du Pb dans le sol et son absorption par les plantes cultivées (Dotaniya *et al.*, 2018a). Le stress hydrique a également réduit la mobilité et la toxicité des métaux lourds dans les sols (Dotaniya *et al.*, 2018b).

c. Potentiel redox

La mobilité du plomb est affectée par des variations de potentiels redox du milieu (Bataillard *et al.*, 2012). Ces variations peuvent modifier directement ou indirectement le pH, la dissolution de carbone organique, l'activité microbienne et l'oxydo-réduction du fer; du manganèse ; du soufre et d'azote (Frohne *et al.*, 2015; Schulz-Zunkel *et al.*, 2015). Pour le plomb, sa solubilité augmente lorsque le potentiel redox diminue (Chuang *et al.*, 1996).

d. Matière organique et l'activité biologique

L'ajout de matière organique réduit la mobilité et la toxicité des métaux lourds dans le sol (Dotaniya *et al.*, 2016, Saha *et al.*, 2017). La matière organique est source de carbone (C) élément clé pour les microorganismes du sol, et elle renforce la croissance et la diversité microbiennes, en plus les groupe carboxyliques (COO⁻) de la matière organique se lient avec les ions métalliques et réduisent leurs disponibilités (Dotaniya *et al.*, 2020 ; Li *et al.*, 2017 ; Kögel-Knabner *et al.*, 2010). Les principaux phénomènes d'action sur la mobilité des polluants métalliques sont la solubilisation, l'insolubilisation et la volatilisation (Remon, 2006).

e. La température

La température du sol dépend en premier lieu du climat, mais elle est également liée à l'activité biologique et influence rétroactivement la formation de complexes avec des ligands inorganiques, en modifiant l'activité de l'élément en solution (Deneux-Mustin *et al.*, 2003). La température a un impact direct sur la mobilité des éléments métalliques

en déplaçant les équilibres des réactions de dissolution - précipitation et co-précipitation des composés fixant ces derniers (Remon, 2006).

1.3. Action du plomb sur le sol

Les sols fortement contaminés par le plomb se sont plus déficients en fer, calcium, phosphore et zinc (Meena *et al.*, 2020). L'excès de métaux lourds entrave diverses activités enzymatiques du sol (Saha, 2013 ; Yang *et al.*, 2006) comme les phosphatases alcalines, la déshydrogénase, β -glucosidase, la protéase, l'uréase et la cellulase (Kunito *et al.*, 2001 ; Effron *et al.*, 2004 ; Oliveira et Pampulha 2006 ; Wang *et al.*, 2008).

2. Interaction Sol-Plantes

Les activités urbaines, industrielles et agricoles sont responsables d'une contamination croissante des sols et de l'eau par les ions métalliques. Organisme autotrophe, la plante est totalement tributaire de son environnement minéral. Le sol lui fournit donc la grande majorité de ses nutriments, mais elle est également directement exposée à des éléments potentiellement toxiques (Cecchi, 2008).

La plante peut modifier le milieu dans lequel elle se développe en modifiant le pH, Eh, le carbone organique dissous ... etc, et donc peut influencer la spéciation des métaux présents dans sa rhizosphère (Fig.5) (Cecchi, 2008).

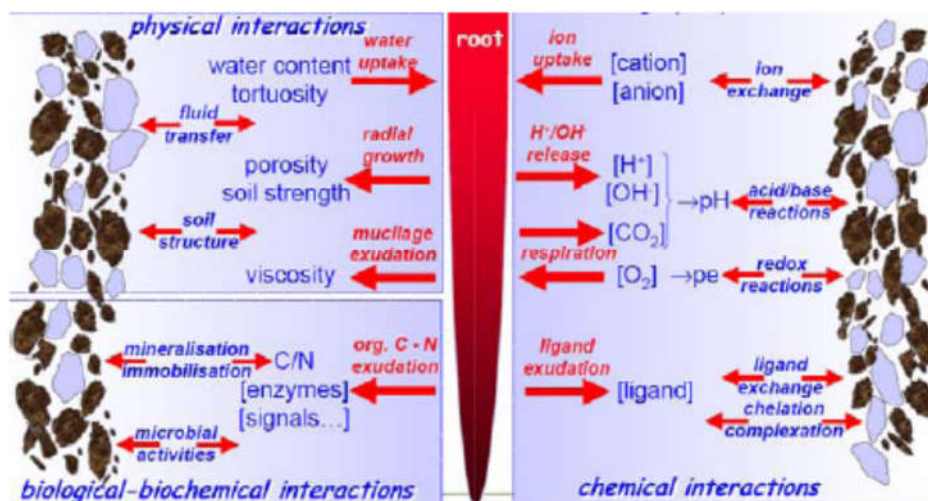


Figure 5: Présentation schématique de l'interaction rhizosphérique sol-plant (Hinsinger, 2004).

2.1. Mécanismes d'interaction sol-plante : impact des activités racinaires

2.1.1. Modification du pH

Le prélèvement des nutriments par les racines peut affecter le pH du sol. Le sens de modification induit dépend pour partie du type de prélèvement réalisé par la plante. En effet, pour maintenir leur neutralité les plantes doivent compenser leur absorption ionique par une excrétion de charges au niveau racinaire (**Romheld *et al.*, 1984 ; Lasat, 2002 ; Hinsinger, 2001**). La réduction du pH est occasionnée par la respiration racinaire, et la génération du CO₂ résultant de la dégradation de la matière organique (**Rinklebe et Shaheen, 2017 ; Shaheen *et al.*, 2014 ; Wang *et al.*, 2012**). La contribution de ce dernier phénomène à l'acidification rhizosphérique est particulièrement importante dans les sols calcaires ou dans des sols où la diffusion du CO₂ se fait mal (**Nye, 1986**).

2.1.2. Modification des concentrations ioniques dans la rhizosphère

Le prélèvement d'eau et d'éléments nutritifs en solution entraîne une modification des concentrations des ions dans la solution du sol au voisinage de la rhizosphère (**Hinsinger, 2001**).

2.1.3. Exsudation racinaire dans la rhizosphère

Les exsudats racinaires des plantes regroupent les substances libérées dans l'environnement extérieur par les racines de plantes saines et intactes (**Thomas *et al.*, 2013**). Ces substances peuvent être des sucres, des acides aminés, des peptides, des enzymes, des acides organiques (**Shukla *et al.*, 2011**), des antibiotiques et des substances allélochimiques (**Thomas *et al.*, 2014**). Ces exsudats entrent en jeu dans la nutrition et la régulation du développement de la plante, la protection des zones apicales des racines grâce aux mucilages, l'amélioration des contacts sol-plantes et la modification des conditions physico-chimiques de la rhizosphère (**Cecchi, 2008**). Sous l'effet de certains stress, tels que la carence en éléments nutritifs ou la toxicité par les métaux, les exsudats racinaires peuvent améliorer la disponibilité des nutriments dans la rhizosphère (**Pal et Rai, 2010**), et former des complexes avec les métaux lourds, ce qui augmente leurs mobilisation (**Thomas *et al.*, 2013**).

3. Transfert du plomb du sol vers les racines

La pénétration d'un élément dans une plante peut être évaluée par le facteur de transfert sol/plante ou également appelé facteur de bioconcentration, noté FBC, ce facteur représente la possibilité de transfert d'un contaminant du sol vers les plantes, et il est généralement défini comme le ratio entre la concentration dans les plantes et celle dans

le sol où ont poussé les plantes, et calculé comme suit (Chumbley et Unwin, 2004 ; Cui *et al.*, 2004 ; Zheng *et al.*, 2007) : $FBC = [Pb] \text{ plante} / [Pb] \text{ substrat de culture}$.

Ce transfert du sol vers les plantes est fonction de de la nature du métal (Zheng *et al.*, 2007), de la nature des plantes (de l'espèce ou du cultivar) et également de leur âge (Yoon *et al.*, 2006) et aussi des caractéristiques des sols telles que le pH, la teneur en matière organique, ou la capacité d'échange cationique (Roselli *et al.*, 2003 ; Yoon *et al.*, 2006 ; Zheng *et al.*, 2007).

4. Dans la plante

Les plantes peuvent absorber du plomb à partir des racines, mais également à partir des organes aériens, ou bien par l'intermédiaire des deux (Cecchi, 2008 ; Mitra *et al.*, 2020). Le Pb dans le sol et son absorption par les plantes dépend de plusieurs facteurs (Fig.6) comme le pH du sol, la taille des particules du sol, l'humidité du sol, la capacité d'échange cationique, la présence de la matière organique, la structure des racines et la rhizosphère, les exsudats racinaires et les propriétés mycorhiziennes des racines (Gupta *et al.*, 2020). Ensuite, la quantité de plomb présente dans les divers organes d'une plante dépend du transport de l'extérieur des racines vers l'intérieur, puis de sa translocation des racines vers les feuilles (Patra *et al.*, 2004 ; Arshad *et al.*, 2008).

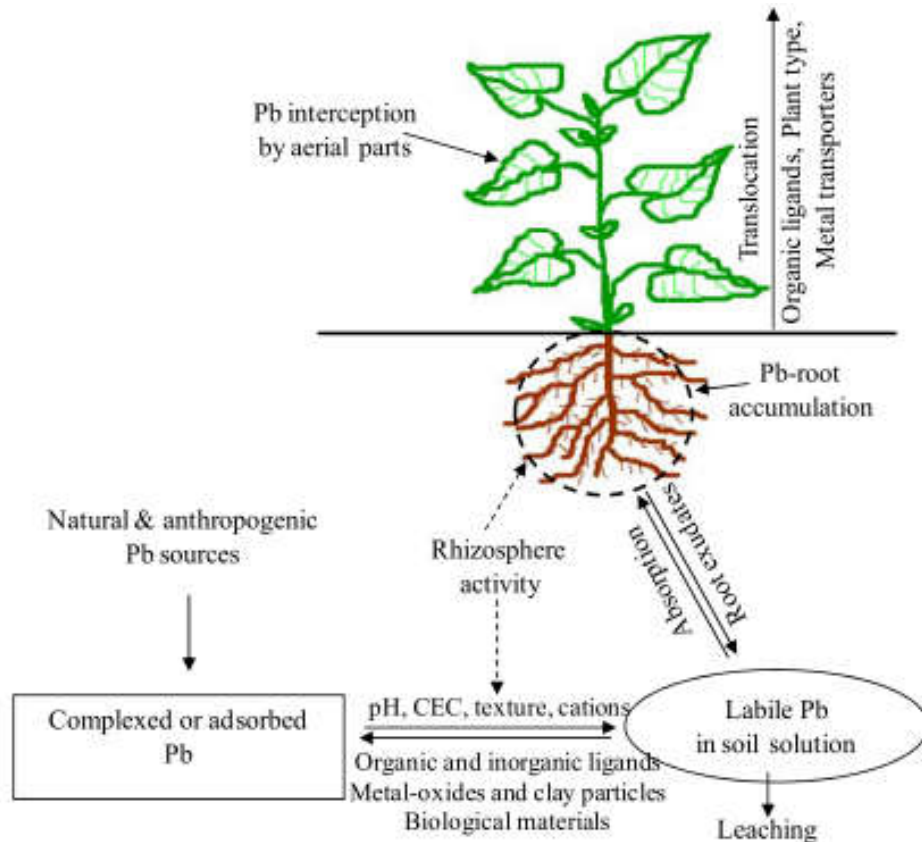


Figure 6 : Facteurs limitant la solubilisation du plomb dans le sol, l'absorption par les racines et la translocation vers la partie aérienne (Shahid, 2010).

4.1. Phytodisponibilité

La biodisponibilité est l'aptitude d'un élément à être transféré d'un compartiment du sol vers un organisme vivant (bactérie, végétal, animal, homme) (**Baize, 1997**). Lorsque l'organisme vivant est une plante, on parle de phytodisponibilité (**Tremel-Schaub et Feix, 2005**). Selon **Hinsinger *et al.*, (2005)**, la partie biodisponible pour une plante est la fraction d'un élément qui est susceptible d'être absorbée par les racines. Pour **Kabata-Pendias et Pendias (1992)**, la phytodisponibilité des éléments traces est fortement corrélée à la concentration d'espèces ioniques dans la solution du sol.

Selon **Cecchi (2008)**, le meilleur outil pour mesurer la biodisponibilité des éléments en trace est l'organisme lui-même. La plante permet de révéler la phytodisponibilité des éléments en trace dans le sol et de déterminer la teneur en élément dans les tissus végétaux à la récolte (**Cecchi, 2008**).

4.2. Absorption

Au départ, le Pb^{2+} présent dans la solution du sol se lie au groupement carboxyle de l'acide uronique composant le mucilage autour des racines (**Sharma et Dubey, 2005 ; Inoue *et al.*, 2013**). Une fois adsorbé à la surface des racines, le plomb peut être immobilisé par les charges négatives des parois cellulaires (Fig.7), il peut être absorbé par la voie apoplasmique ou par les canaux perméables du Ca^{2+} (**Pourrut *et al.*, 2011**). Il aurait donc tendance à s'accumuler dans l'espace libre, étant fortement lié aux groupements carboxyliques des composés pectocellulosiques des parois (**Cecchi, 2008**). Des études ont montré que le plomb était majoritairement présent dans l'apoplaste et que seule une faible proportion pénétrait dans l'endoderme (**Tung et Temple, 1996 ; Seregin *et al.*, 1998 ; Patra *et al.*, 2004**).

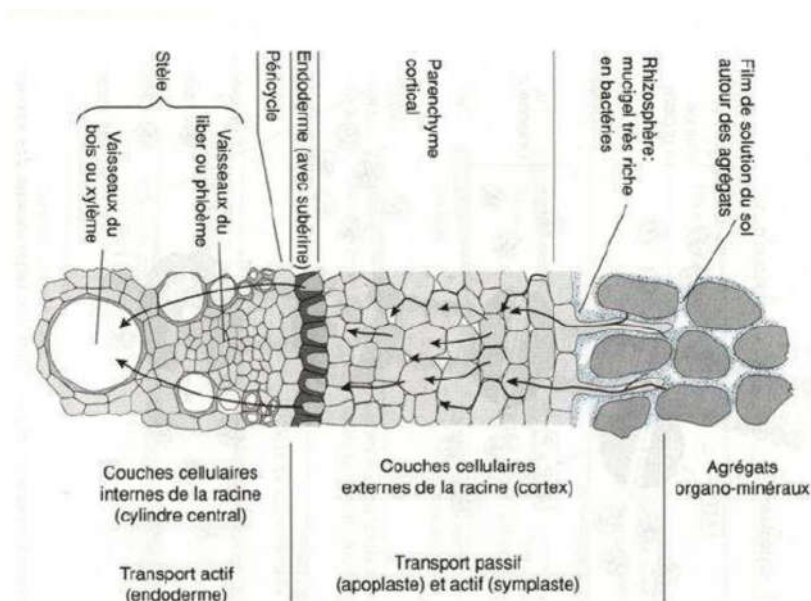


Figure 7 : Coupe transversale de racine, avec le passage des ions selon les voies symplastiques et apoplastiques (Gobat *et al.*, 1998).

4.3. Translocation du plomb

Le plomb prélevé par les racines est rapidement immobilisé, sa translocation vers les parties aériennes est faible (Bonnard, 2017). Pour être conduits vers les parties aériennes, les éléments prélevés dans le sol par les racines doivent être transportés dans le cortex puis déversés dans les vaisseaux du xylème (Cecchi, 2008). Ce flux d'ions métalliques à travers le xylème nécessite leur chélation par les groupements carboxyles des acides glucouroniques organiques ou à des acides aminés (Briat et Lebrun, 1999 ; Inoue *et al.*, 2013). Le transport limité des racines vers les feuilles peut être due à l'endoderme qui limite le passage du plomb vers le cylindre vasculaire central des racines (Estefania *et al.*, 2015). Les bandes de Caspary peuvent en effet être un facteur majeur limitant le franchissement de l'endoderme jusqu'au cylindre central (Seregin *et al.*, 2004 ; Sharma et Dubey, 2005).

Le degré de translocation du Plomb de la partie racinaire vers les parties aériennes peut être décrit par le facteur de translocation (TF) qui correspond au rapport entre les quantités de plomb dans la partie aérienne et dans les racines (Buscaroli, 2017 ; Bhatti *et al.*, 2018).

$$FT = \frac{[Pb]_{\text{parties aériennes}}}{[Pb]_{\text{racines}}}$$

4.4. Accumulation

Certaines plantes accumulent des quantités inhabituelles d'éléments métalliques (le cadmium, le nickel, le cuivre, le cobalt, le Zinc et le plomb), ces espèces sont qualifiées de plantes «hyperaccumulatrices » (*Alyssum bertolonii*, *Sebertia acuminata*, *Silene cobalticola*, *Thlaspi caerulescens*, *Brassica napus*, *Pteris vittata*) (**Brooks, 1998**). Près de 500 espèces hyperaccumulatrices ont déjà été recensées (**Prasad et Freitas, 2003**).

A l'échelle cellulaire, cette accumulation résulterait d'une compartimentation des métaux dans la vacuole, par des transporteurs protéiques (**Remon, 2006**), telles que les protéines de la famille GTP (Guanine triphosphate) (**Chardonnens *et al.*, 1999**). Chez *Rauvolfia serpentina*, le cadmium forme avec les phytochélatines des complexes de faible masse moléculaire, qui s'agrègent les uns aux autres par des ponts sulfures pour former des complexes de masse moléculaire élevée, qui seraient alors transportés dans la vacuole (**Grill *et al.*, 1985**). Le pH vacuolaire provoquerait la dissociation du complexe, et les ions seraient pris en charge par les acides organiques présents (le malate, le citrate et l'oxalate) (**Toppi et Gabbrielli, 1999**).

III. Toxicité du plomb

1. Effets du Plomb sur la santé humaine

1.1. Toxicité du plomb

Le Pb n'est pas un élément essentiel pour l'homme. Le Pb et ses composés minéraux peuvent provoquer une intoxication connue sous le nom de saturnisme (**Tremel-Schaub et Feix, 2005**). Le sol contaminé par le plomb est classé en cinq groupes en fonction du niveau de contamination par le plomb, à savoir : très faible (<150 ppm), faible (150-400 ppm), moyen (400-1000 ppm), élevé (1000-2000 ppm) et très élevé (>2000 ppm) (**Stehouwer et Macneal, 2010**). Les limites admissibles de plomb sont en moyenne 0,10 $\mu\text{g m}^{-3}$ pour l'air, 300 $\mu\text{g kg}^{-1}$ pour le sol, 5 $\mu\text{g l}^{-1}$ pour l'eau potable et 1,1 mg kg^{-1} pour les aliments (**EEA, 2017**).

1.3. Voies d'expositions

Le plomb présent dans l'organisme pénètre par la respiration ou l'ingestion de terre ou de particules de poussière et a des conséquences néfastes sur la santé en s'accumulant dans les tissus de l'organisme (Fig.8).

Trois modes d'introduction sont à retenir (**Tremel-Schaub et Feix, 2005**) :

- C'est surtout par la voie digestive que le Pb et ses composés pénètrent dans l'organisme, soit avec les aliments, soit avec les boissons et notamment avec l'eau.
- La voie respiratoire est également importante, surtout s'il s'agit d'oxydes ou de sels pulvérulents, de poussières très fines ou de vapeurs.
- L'absorption cutanée, qui est minime, est quand même possible quand la peau est lésée ou pour certains composés organiques du Pb (du fait de leur liposolubilité).

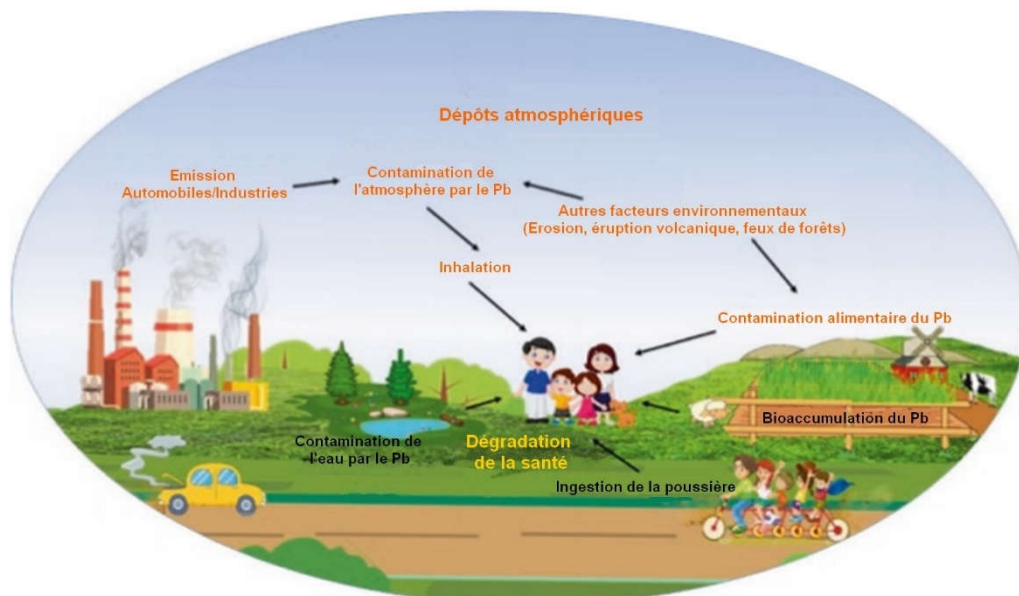


Figure 8 : Les voies possibles d'exposition au plomb dans l'environnement (Natasha *et al.*, 2020).

Les enfants sont plus sensibles à la toxicité du plomb que les adultes. Les jeunes et les personnes à jeun ont ingéré une plus grande quantité de plomb. Le taux d'absorption du plomb dans le sang varie de 3 à 80 % (FAO/OMS 2011 ; Sabath et Robles-Osorio 2012 ; Marsh et Bailey 2013) et la demi-vie du Pb dans le sang et les tissus est considérée comme étant d'environ 28-36 jours (Farzin *et al.*, 2008).

1.4. L'intoxication au plomb chez les enfants

Le plomb s'accumule dans les organes du corps comme le cerveau, les os et inhibe leur bon fonctionnement en entravant la formation d'hémoglobine et d'hémoglobine peut conduire à l'aplomb ou même à la mort (Meena *et al.*, 2020). Une concentration de plomb dans l'organisme supérieure à la limite autorisée peut provoquer de graves lésions des globules rouges, des reins, du cerveau, du système nerveux et du tractus gastro-intestinal (Baldwin et Marshall 1999), des effets sur le système rénal, cardiovasculaire et reproductif (Patra *et al.*, 2011 ; FAO/OMS, 2009 ; Abdullahi 2013 ; Sun *et al.*, 2014), une perte supplémentaire de quotient intellectuel (QI), une détérioration auditive et mentale, une hypersensibilité, une altération du fonctionnement neurocomportemental (Grandjean et Landrigan 2014) et de nombreux troubles du développement peuvent se manifester chez les enfants de moins de 6 ans. L'augmentation de la concentration en plomb est également associée à des maux de tête, au métabolisme de la vitamine D, à la perte d'appétit, à la constipation, à une mauvaise synthèse de l'hémoglobine, à une anémie franche, à des effets néphrotoxiques avec une mauvaise excrétion rénale de l'acide urique,

à des effets néphrotoxiques avec une mauvaise excrétion rénale de l'acide urique et à une faiblesse des articulations (NSC 2009). Des études ont montré que la dose hebdomadaire tolérable provisoire (DHTP) de 25000 mg kg⁻¹ de plomb réduit le QI de trois points chez les enfants et augmente la pression artérielle (PA) systolique de 3 mmHg chez les adultes (0,4 kPa) (OMS/FAO 2011 ; Tellez-Plaza *et al.*, 2012 ; Solenkova *et al.*, 2014).

2. Effets du plomb sur les plantes

La fraction de plomb pénétrant dans le symplaste est faible et rapidement séquestrée dans les cellules. Néanmoins, elle cause une grande diversité d'effets néfastes dans les plantes. Ces effets ont déjà fait l'objet de très nombreuses travaux (**Singh *et al.*, 1997** ; **Seregin et Ivanov, 2001** ; **Patra *et al.*, 2004** ; **Sharma et Dubey, 2005**).

Selon **Pourrut (2008)**, les effets du plomb sur les plantes peuvent varier en fonction de la durée d'exposition, de l'intensité du stress, du stade de développement de la plante, des organes considérés et évidemment des espèces étudiées voire même du cultivar.

2.2.1. Action sur la germination et la croissance.

Quand la plante est exposée au plomb, même à de faibles concentrations, plusieurs effets peuvent apparaître sur la germination et le développement (**Kopittke *et al.*, 2007**). En premier lieu, la germination est fortement inhibée par les ions Pb^{2+} et ce, à de très faibles concentrations (**Mishra et Choudhuri, 1998**; **Wierzbicka et Obidzinska, 1998**; **Tomulescu *et al.*, 2004**, **Islam *et al.*, 2007**; **Luan *et al.*, 2008**; **Sengar *et al.*, 2009** ; **Wang *et al.*, 2011**). De plus fortes doses conduisent à une inhibition totale de la germination chez les espèces végétales (**Wierzbicka et Obidzinska, 1998**). Le plomb réduit également fortement le développement de la plantule et des racinelles (**Mishra et Choudhuri, 1998** ; **Islam *et al.*, 2007** ; **Dey *et al.*, 2007** ; **Gichner *et al.*, 2008** ; **Gopal et Rizvi, 2008**).

Un traitement à de faibles concentrations en plomb inhibe la croissance des racines et des parties aériennes (**Garland et Wilkins, 1981** ; **Mishra et Choudhuri, 1998** ; **Wierzbicka, 1999b** ; **Makowski *et al.*, 2002** ; **An, 2006** ; **Islam *et al.*, 2007**; **Kopittke *et al.*, 2007** ; **Luan *et al.*, 2008** ; **Dirilgen, 2011**). Cette inhibition est plus importante pour la racine, ce qui peut être corrélé à la plus forte teneur en plomb de cette dernière (**Luan *et al.*, 2008**). Les racines primaires sont également plus sensibles que les racines latérales (**Obroucheva *et al.*, 1998** ; **Liu *et al.*, 2008**), **Kopittke et collaborateurs (2007)** ont pu montrer une augmentation en nombre de racines secondaires par unité de longueur de racines.

L'accroissement de biomasse végétale est diminué par de fortes doses de plomb (**Gopal et Rizvi, 2008** ; **Gichner *et al.*, 2008** ; **Islam *et al.*, 2008** ; **Piotrowska *et al.*, 2009** ; **Singh *et al.*, 2010**). Toutefois, l'effet des faibles concentrations n'est pas clairement établi et l'inhibition de la croissance observée n'est pas forcément corrélée à une diminution de biomasse (**Mishra et Choudhuri, 1998** ; **Kosobrukhov *et al.*, 2004**; **Xiong *et al.*, 2006** ; **Zheljazkov *et al.*, 2006** ; **Yan *et al.*, 2010**). **Makowski et collaborateurs (2002)** ont même montré un accroissement de la biomasse dans les zones racinaires contenant les plus

grandes quantités de plomb, comme l'apex et la zone d'élongation. Cette augmentation de biomasse peut être attribuée à la synthèse de nouveaux composants pariétaux (**Wierzbicka, 1998a**).

Sur de longues durées, les traitements au plomb, même à des doses non-létales, peuvent conduire à l'apparition de nécroses au niveau des apex racinaires et des feuilles, ainsi que des chloroses foliaires (**Khan et Frankland, 1983 ; Liu *et al.*, 2000 ; Dey *et al.*, 2007 ; Luan *et al.*, 2008 ; Gupta *et al.*, 2009, 2010**). Il faut cependant noter que, même aux plus fortes concentrations rencontrées dans l'environnement (sols miniers, usines de retraitement de batteries), le plomb induit rarement une mort des végétaux (**Cobb *et al.*, 2000 ; Arshad *et al.*, 2008**). L'ensemble des perturbations macroscopiques observées est la résultante :

- De l'interaction du plomb avec les différents composants cellulaires et les macromolécules (protéines, ADN...) (**Pourrut, 2008**) ;
- De la perturbation de nombreux processus physiologiques comme la régulation du statut hydrique (**Brunet *et al.*, 2009**), la nutrition minérale (**Kopittke *et al.*, 2007 ; Gopal et Rizvi 2008 ; Wang *et al.*, 2010**), la respiration ou la photosynthèse (**Islam *et al.*, 2008**).

2.2.2. Effets sur le statut hydrique

La distribution du statut de l'eau dans la plante a été signalée dans plusieurs études (**Brunet *et al.*, 2009**), une diminution de la transpiration des plantes exposées même à de petites doses (**Barcelo et Poschenrieder 1990 ; Patra *et al.*, 2004**) causée probablement par la réduction de la surface foliaire (**Elibieta et Miroslawa, 2005**), ainsi qu'une diminution de la teneur en eau (**Barcelo et Poschenrieder, 1990 ; Wozny *et al.*, 1995 ; Sayed, 1999**). Pour maintenir la turgescence de ces cellules, la plante synthétise massivement des osmolytes, et en particulier de la proline (**Qureshi *et al.*, 2007**). Le mécanisme d'ouverture/fermeture est sous le contrôle d'une phytohormone, l'acide abscissique ou ABA (**Roelfsema et Hedrich, 2005**). La présence d'ions Pb^{2+} entraîne une forte accumulation d'ABA dans les racines et les parties aériennes (**Parys *et al.*, 1998 ; Atici *et al.*, 2005**), induisant la fermeture des stomates (**Stefanov *et al.*, 1993 ; Kosobrukhov *et al.*, 2004 ; Elibieta et Miroslawa, 2005**). Cette fermeture limite fortement les échanges gazeux avec l'atmosphère, et par conséquent les pertes hydriques par transpiration (**Parys *et al.*, 1998 ; Vassil *et al.*, 1998**). La transpiration de la plante, via des pores foliaires est également limitée par le dépôt d'une couche de cuticule sur la surface des feuilles à la suite de l'exposition au plomb (**Elibieta et Miroslawa, 2005**).

2.2.3. Effets sur la nutrition minérale

Le plomb affecte également la nutrition minérale (Tab.3), en perturbant le prélèvement et le transport des nutriments par la plante, tels que Ca, Fe, Mg, Mn, P et Zn en bloquant leur entrée ou en se liant à eux, les rendant indisponibles pour les plantes (Xiong, 1997 ; Chatterjee *etal.*, 2004 ; Sharma et Dubey 2005 ; Gopal et Rizvi 2008). Burzynski(1987) a montré que la présence de plomb entraînait une diminution du contenu en potassium dans tous les tissus du concombre, une diminution du calcium dans les cotylédons et l'hypocotyle et aussi du fer dans les racines. Le plomb affecte aussi le métabolisme azoté en diminuant le prélèvement de nitrate et en perturbant le fonctionnement du nitrate réductase (Seregin et Ivanov, 2001 ; Beltagi, 2005).

2.2.4. Action sur les activités enzymatiques

Le plomb peut inhiber l'action de certaines enzymes (Tab.4), notamment celles qui possèdent un groupement -SH, ce dernier présentant une forte affinité pour le plomb (Sharma et Dubey, 2005). Dans la plupart des cas, l'inhibition se fait par interaction du plomb avec ce groupement qui est indispensable pour l'activité et le bon fonctionnement des enzymes (Gupta *et al.*, 2009). Le plomb affecte la conformation de nombreuses enzymes, les empêchant de fonctionner convenablement (Seregin et Ivanov, 2001). Parmi les enzymes fondamentales qui peuvent être inhibées par le plomb, se trouvent des enzymes impliquées dans la biosynthèse de la chlorophylle ou bien la RUBISCO qui permet la fixation du CO₂ (Seregin et Ivanov, 2001 ; Patra *etal.*, 2004).

Tableau 3 : Effets du plomb sur la concentration en éléments minéraux des parties aériennes et racinaires (**Pourrut, 2008**).

Element	Partie de la plante	Effet
Ca	Aérienne	↓
	Racinaire	↓↑
Cu	Aérienne	↓
	Racinaire	↓↑
Mg	Aérienne	↓
	Racinaire	↑
Fe	Aérienne	↓
	Racinaire	↓↑
Zn	Aérienne	↓
	Racinaire	↓↑
Mn	Aérienne	↓
	Racinaire	↔
K	Aérienne	↓↑
	Racinaire	↓
N	Aérienne	↓
	Racinaire	↓
P	Aérienne	↓↑
	Racinaire	↓↑
S	Aérienne	↓
	Racinaire	↓↑

↓ signifie que la concentration mesurée a diminué consécutivement à un traitement au plomb, ↑ qu'elle a augmenté, ↔ qu'elle n'a pas été modifiée ; ↓↑ signifie que les données disponibles sont contradictoires et ne permettent pas de dégager une tendance générale. En grisé apparaissent les éléments dont la concentration est modifiée significativement par l'apport de plomb.

Tableau 4 : Effets du plomb sur les activités d'enzymes intervenant dans différents processus métaboliques (modifié d'après **Sharma et Dubey, 2005**).

Processus métaboliques	Enzymes	Espèce végétales	Effet	Références
Synthèse chlorophyllienne Fixation du CO ₂	δ- aminolevulinate déshydratase	<i>Phaseolus vulgaris</i>	-	Prasad et Prasad, 1987
	Ribulose 1,5 biphosphate carboxylase/oxygénase	<i>Avena sativa</i>	-	Moustakas et al., 1997; Stiborova et al., 1986 Parys et al., 1998
	Ribulose 1,5 biphosphate carboxylase/oxygénase	<i>Hordeum vulgare</i> <i>Pisum sativum</i> (feuilles détachées)	=	
	phosphoénolpyruvate carboxylase	<i>Zea mays</i>	-	Vojtechova et Leblova, 1991 Parys et al., 1998
phosphoénolpyruvate carboxylase	<i>Pisum sativum</i> (feuilles détachées)	=		
Cycle de Calvin	Glycéraldéhyde 3-phosphate Déshydrogénase	<i>Spinach oleracea</i>	-	Vallee et Ulmer, 1972
	Ribulose 5-phosphate kinase	<i>Spinach oleracea</i>	-	Vallee et Ulmer, 1972
Voie des pentoses phosphates	Glucose-6-phosphate déshydrogénase	<i>Spinach oleracea</i>	-	Vallee et Ulmer, 1972
Métabolisme de l'azote	Nitrate réductase	<i>Cucumis sativus</i>	-	Burzynski et Grabowski, 1984 Huang et al., 1974 Lee et al., 1976
	Nitrogénase	<i>Glycine max</i>	-	
	Glutamine synthétase	<i>Glycine max</i>	-	
Enzymes nucléolytiques	Désoxyribonucléase	<i>Potamogeton pectinatus</i> <i>Hydrilla verticillata</i>	+	Jana et Choudhuri, 1982
	Ribonucléase	<i>Potamogeton pectinatus</i> <i>Hydrilla verticillata</i> <i>Raphanus sativus</i>	+	Jana et Choudhuri, 1982 Gopal et Rizvi, 2008
	Protéase	<i>Potamogeton pectinatus</i> <i>Hydrilla verticillata</i>	+	Jana et Choudhuri, 1982
Phosphohydrolase	Phosphatase	<i>Potamogeton pectinatus</i> <i>Hydrilla verticillata</i> <i>Glycine max</i> <i>Raphanus sativus</i>	+	Jana et Choudhuri, 1982 Lee et al., 1976 Gopal et Rizvi, 2008
	Phytase	<i>Pisum sativum</i>	-	Paivoke, 2002
Métabolisme des sucres	α-amylase	<i>Oryza sativa</i>	-	Mukherji et Maitra, 1976
	α-amylase	<i>Glycine max</i>	+	Lee et al., 1976
Métabolisme énergétique	ATPase	<i>Zea mays</i>	-	Kennedy et Gonsalves, 1989

(-) effet négatif

(+) effet positif

(=) sans effet

2.2.5. Action sur les protéines

L'action du plomb sur la concentration totale en protéine n'est pas claire, bien que de fortes concentrations puissent diminuer le pool protéique (**Jana et Choudhuri, 1982 ; Mohan et Hosetti, 1997 ; Saxena *etal.*, 2003 ; Mishra *etal.*, 2006b ; Garcia *etal.* 2006 ; Piotrowska *etal.*, 2009**). Cette diminution quantitative de la teneur en protéines totales apparaît comme la résultante de plusieurs conséquences de l'action du plomb :

- Modification de l'expression génique (**Kovalchuk *et al.*, 2005**) et augmentation de l'activité ribonucléasique (**Gopal et Rizvi, 2008**) ;
- Stimulation de l'activité protéasique (**Jana et Choudhuri, 1982 ; Gupta *etal.*, 2009**);
- Diminution de la teneur en acides aminés libres (**Xiong *etal.*, 2006 ; Gupta *etal.*, 2009**), corrélée à une forte perturbation du métabolisme de l'azote (**Chatterjee *etal.*, 2004**). Cependant, on constate une augmentation de certains acides aminés comme la proline (**Qureshi *etal.*, 2007 ; Hedaya, 2008 ; Wang *etal.*, 2010**) qui semble jouer un rôle important dans la tolérance de la plante au plomb (**Saradhi et Saradhi, 1991**).

De plus faibles concentrations semblent, au contraire, augmenter la teneur en protéines totales (**Mishra *etal.*, 2006b**). Cette accumulation protéique, limitée aux premiers jours d'exposition, pourrait être la conséquence de la synthèse, par la plante, de protéines de défense contre ce stress métallique (**Gupta *etal.*, 2010**), avec notamment des protéines intervenant dans le maintien du statut redox de la cellule comme l'ascorbate, ou dans la séquestration du métal par les phytochélatines et la glutathionnes (GSH, PC) (**Brunet *etal.*, 2009 ; Liu *etal.*, 2009 ; Yadav 2010 ; Jiang et Liu 2010**).

Le plomb agit sur la composition qualitative des protéines cellulaires et modifie le profil protéique des cellules racinaires de fèves exposées au plomb (**Beltagi, 2005**), ce qui peut être corrélé avec la modification du profil du transcriptome (**Kovalchuk *etal.*, 2005**). Les ions Pb^{2+} influencent également fortement les activités de nombreuses enzymes intervenant dans différents processus métaboliques (**Hu *et al.*, 2007 ; Gramigni *et al.*, 2009**). Cette forte interactivité avec les enzymes de la plante est une des causes majeures de la toxicité de ce métal (**Kovalchuk *etal.*, 2005**).

2.2.6. Effets sur la photosynthèse

L'exposition au plomb des plantes conduit à une forte inhibition de la photosynthèse, du rendement photosynthétique, et à une limitation du taux d'assimilation de CO₂ (Sharma et Dubey, 2005). Le rendement photosynthétique peut chuter de plus de 50 % (Huang *et al.*, 1974 ; Bazzaz *et al.*, 1975 ; Poskuta *et al.*, 1988 ; 1988 ; Xiong *et al.*, 2006 ; Hu *et al.*, 2007 ; Liu *et al.*, 2008 ; Piotrowska *et al.*, 2009 ; Singh *et al.*, 2010 ; Cenkci *et al.*, 2010 ; Wang *et al.*, 2010). Cette inhibition s'explique par la diminution de la synthèse de chlorophylle, de plastoquinone (Burzynski, 1987) des teneurs en chlorophylles et en caroténoïdes (Kosobrukhov *et al.*, 2004 ; Qureshi *et al.*, 2005 ; Chen *et al.*, 2007 ; Gopal et Rizvi, 2008 ; Gajić *et al.*, 2009). Toutefois, ces effets varient en fonction des espèces végétales.

Le plomb interagit en causant :

- la destruction de l'ultra-structure des chloroplastes (Choudhury et Panda, 2005 ; Sharma et Dubey, 2005 ; Elzibieta et Mirosława 2005 ; Islam *et al.*, 2007),
- la diminution l'activité de la ferrédoxine NADP⁺ réductase et δ-aminolevulinate déshydratase ou ALAD qui est à la base de la synthèse des chlorophylles et dont l'ion Zn²⁺ est remplacé par Pb²⁺ (Gupta *et al.*, 2009 ; Gajić *et al.*, 2009 ; Cenkci *et al.*, 2010),
- l'inhibition de la synthèse de la plastoquinone et des caroténoïdes (Kosobrukhov *et al.*, 2004 ; Chen *et al.*, 2007 ; Liu *et al.*, 2008 ; Cenkci *et al.*, 2010),
- la perturbation des flux d'électrons de la chaîne de transport d'électrons (Qufei *et al.*, 2009),
- le déséquilibre de la concentration de dioxyde de carbone entre l'intérieure et l'extérieure de la cellule à cause de la fermeture des stomates (Romanowska *et al.*, 2002, 2005, 2006),
- le déséquilibre de l'approvisionnement des éléments essentiels à la photosynthèse tels que le Mn, Fe et Cu (Chatterjee *et al.*, 2004 ; Gopal et Rizvi 2008) et la substitution des bivalons par le plomb (Gupta *et al.*, 2009 ; Cenkci *et al.*, 2010),
- l'inhibition de certaines enzymes intervenant dans le cycle de Calvin (Mishra *et al.*, 2006b ; Liu *et al.*, 2008),
- l'augmentation de l'activité de la chlorophyllase (Liu *et al.*, 2008).

2.2.7. Effets sur la respiration

L'effet du plomb sur l'activité respiratoire a été peu étudié (Seregin et Ivanov, 2001). L'ensemble des études concernant les feuilles, l'effet des ions Pb²⁺ sur l'activité respiratoire des racines reste inconnu (Pourrut *et al.*, 2011). Des feuilles de pois traitées avec du nitrate de plomb voient leur concentration en CO₂ augmenter de façon significative (Parys *et al.*, 1998). Cette augmentation résulte de la diminution de l'activité photosynthétique et de l'augmentation de la respiration (Pourrut *et al.*, 2011).

Romanowska et collaborateurs (2002) ont mis en évidence que l'augmentation de la respiration, induite par les ions Pb^{2+} , était uniquement due à la respiration sombre. La photorespiration ne serait pas affectée (**Romanowska et al., 2002**) voire inhibée (**Poskuta et al., 1988 ; Poskuta et al., 1988**). L'augmentation globale de la respiration conduit à une élévation de la concentration en ATP pouvant correspondre à un besoin élevé d'énergie de la plante pour lutter contre les effets du métal (**Pourrut et al., 2011**).

La stimulation de la respiration sombre par le plomb a été observée sur des plantules de pois (**Łukaszek et Poskuta, 1998**), des feuilles détachées ou des protoplastes de pois et d'orge (**Parys et al., 1998 ; Romanowska et al., 2002 ; 2005 ; 2006**). Il a été proposé, pour expliquer ce phénomène, que dans les conditions d'une fixation moindre du CO_2 , les équivalents redox produits par la photosynthèse pourraient être transférés aux mitochondries et ainsi augmenter la respiration (**Poskuta et al., 1996**).

L'inhibition de la respiration à de fortes doses peut être la conséquence de la fixation du plomb sur la membrane mitochondriale, perturbant le transport d'électron (**Bittell et al., 1974**) et pouvant conduire à un découplage de l'étape de phosphorylation, comme c'est le cas pour le cadmium ou le zinc (**Romanowska, 2002**).

2.2.8. Effets antimittotique et génotoxicité du plomb

L'effet antimittotique du plomb est l'un des aspects les plus connus de sa toxicité (**Pourrut et al., 2011**). En effet, il y a 80 ans, **Hammett (1928)** démontrait que le plomb induisait une diminution de l'activité mitotique dans des cellules de racines d'oignon. Beaucoup plus tard, **Wierzbicka (1999b) et Patra et al., (2004)** ont étudié ce phénomène pour en comprendre les mécanismes (Fig.9). Le premier point important est la liaison des ions Pb^{2+} aux membranes cellulaires et à la paroi, induisant une rigidification de ces structures et perturbant la division cellulaire. Le second point important est la désorganisation des microtubules dont l'organisation est essentielle pour la mitose (**Pourrut et al., 2011**). Il est à signaler que de faibles doses de plomb semblent ne pas affecter la mitose de façon significative (**Hammett, 1928 ; Loudes, 2002 ; Cecchi, 2008**).

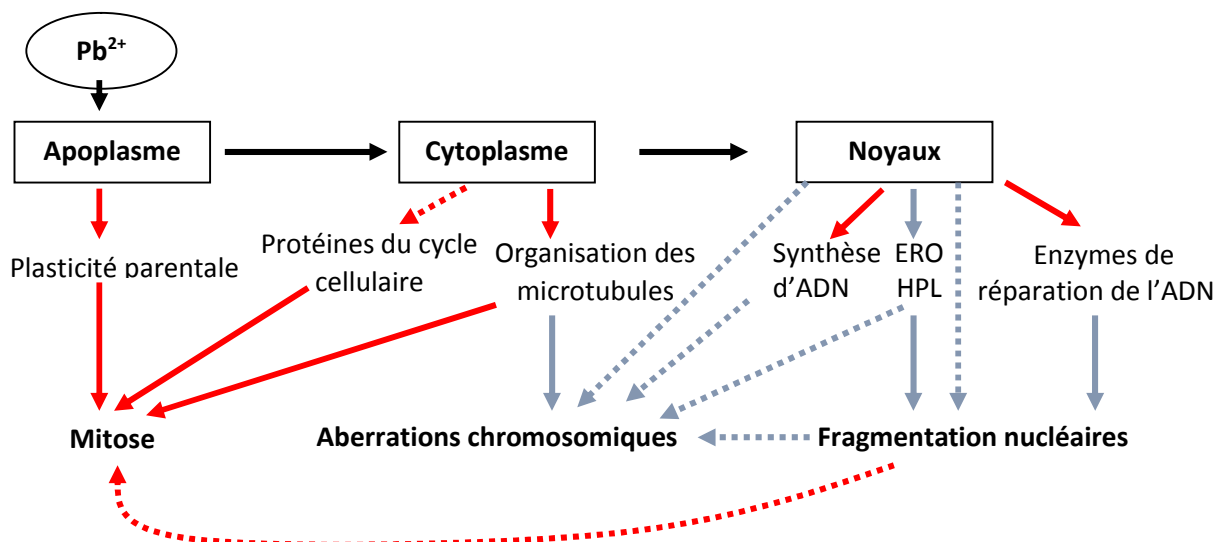


Figure 9: Représentation des liens avérés (flèches pleines) et potentiels (flèches pointillées) entre le plomb, la mitose et la génotoxicité (Pourrut, 2008).

En rouge : interaction négative ; en bleu : interaction positive. En noir : mouvement du plomb. ERO : Espèces Réactives à l'oxygène. HPL : hydroperoxydes lipidiques.

Si l'action antimitotique du plomb et ses mécanismes sont bien connus chez les plantes, il n'en est pas de même concernant son action génotoxique (Pourrut *et al.*, 2011). Même à de faibles concentrations en métal, les traitements au plomb induisent la formation d'aberrations caractéristiques des ETM (Patra *et al.*, 2004 ; Cecchi *et al.*, 2008 ; Marcato-Romain *et al.*, 2009 ; Grover *et al.*, 2010 ; Barbosa *et al.*, 2010 ; Shahid *et al.*, 2011).

Les aberrations chromosomiques peuvent s'expliquer en partie par les perturbations du réseau de microtubules (Pourrut *et al.*, 2011). Le plomb crée des cassures simples et doubles brins sur l'ADN, des liaisons transversales entre ADN-ADN ou ADN-protéines (Rucińska *et al.*, 2004 ; Gichner *et al.*, 2008 ; Shahid *et al.*, 2011).

IV. Modèle biologique *Vicia faba* L.

1. Classification

Décrite par **Linné en 1753**, la fève *Vicia faba* L. (broad bean en anglais) est une plante dicotylédone herbacée originaire d'Asie ou du Moyen-Orient (**Duc, 1997**). Sa culture est très ancienne et pratiquée dans le monde entier (**Tanno et Willcox, 2006**).

Sa classification systématique est la suivante :

- Règne *Plantae*
- Sous-règne *Tracheobionta*
- Division *Magnoliophyta*
- Classe *Magnoliopsida*
- Sous-classe *Rosidae*
- Ordre des *Fabales*
- Famille des *Fabaceae*
- Genre *Vicia*
- Espèce *faba*

Il en existe 2 sous-espèces, paucijuga et eu-faba. Dans la sous-espèce eu-faba, on dénombre 3 variétés différentes (**Gallais et Bannerot 1992**) :

- *Vicia faba major*, la fève maraîchère à grosses graines destinées à la consommation humaine;
- *Vicia faba minor*, la petite fève ou féverole utilisée pour l'alimentation du bétail ;
- *Vicia faba equina*, la fève à cheval à grains moyens aussi appelée féverole ou fêvette dans certaines régions. Comme son nom l'indique elle est également destinée à l'alimentation du bétail.

2. Aspect et particularités

La fève (*Vicia faba* L.) (Fig.10) est une plante robuste, grimpante, qui peut atteindre plus d'un mètre (**Peron, 2006**). Ses feuilles, composées de 2 à 7 folioles, alternées, amples et ovales (**Chaux et Foury, 1994**). Ses fleurs, disposées en racème (grappe), sont blanches ou faiblement violacées avec un point noir sur les ailes, zygomorphes (à symétrie axiale) et hermaphrodites, à pollinisation entomophile, sa floraison dépend de la photopériode et de la température (**Evans, 1959**). Ses fruits sont des gousses (**Laumonier, 1979**).



Figure 10 : Les différentes parties de la fève *Vicia faba* L. (Thomé, 1885).

3. Culture

La fève est localisée dans l'étage bioclimatique de 250 mm de pluie, tolère bien le froid (Herzog, 1984) et les hautes températures ; la somme de températures nécessaires pour accomplir son cycle végétatif varie de 1900 à 2000 °C (Carlu, 1952). Cette plante méditerranéenne est peu exigeante sur le plan type de sol, à condition que ce dernier soit bien ensoleillé et pas trop acide. Son pH optimal se situe aux environs de 6,75, mais elle tolère bien les pH compris entre 5,5 et 8. Sa température optimale de pousse se situe aux environs de 20°C (Foltete, 2010).

4. Caryotype et cycle cellulaire

Les Génotypes de la plante sont diploïdes, et possèdent six paires de grands chromosomes, dont cinq paires de chromosomes acrocentriques et une paire de chromosomes métacentriques mesurant 15 µm de long, soit environ le double



de la longueur des premiers (**Duc ,1997**). Le noyau de ses cellules renferme 26,7 pg d'ADN dont beaucoup d'hétérochromatine (**Bennett 1976**). En comparaison, le pois *Pisum sativum* n'en possède que 9,8 pg (**Grant et Owens, 2001**). Le cycle cellulaire normal de la plante dure environ 19,3h au total (**Evans et Scott, 1963**).

5. Intérêt en écotoxicologie

La fève est une plante robuste, facile à se procurer et à faire germer, elle permet, par la rapidité de sa germination et de sa croissance, de disposer très facilement de jeunes pousses dont les racines secondaires seront déjà utilisables pour les tests au bout d'une dizaine de jours seulement (**Foltete, 2010**). La simplicité de son caryotype l'a faite élire pour un grand nombre d'études de mutagénèse par le test des aberrations chromosomiques (**De Marco et al., 1995; Kanaya et al., 1994; Sang et Li 2004**). De plus, la grande quantité d'ADN contenue dans son noyau (**Bennett, 1976**), la rend très sensible aux molécules génotoxiques (**Ferrara et al., 2004**). Ainsi, elle est l'un des modèles les plus utilisés dans le test des micronoyaux, pratiqué sur les cellules-filles de ses méristèmes racinaires (**Cotelle, 1999 ; Degrassi et Rizzoni, 1982 ; Duan et al., 1999 ; Marcato-Romain et al. 2009**). Un autre test de génotoxicité, le test des comètes, est également pratiqué sur différents tissus de la plante (**Cotelle, 1999 ; Koppen et Verschaeve 1996 ; Lin et al., 2007**). *Vicia faba* L. est en outre aussi employée pour étudier les réponses des marqueurs du stress oxydant (**Radetski et al., 2004**) et d'autres défenses antitoxiques de la plante comme les phytochélatines (**Béraud, 2007**).

Chapitre II.

Matériel et méthodes

1. Expérimentation

1.1. Objectif du travail

Le présent travail consiste à évaluer l'impact du plomb bio-disponible, ses effets et ses risques liés à sa présence dans l'environnement sol sur la fève (*Vicia faba*). L'objectif de ce travail est d'étudier l'effet engendré par le stress abiotique au plomb sur le comportement de la plante.

Afin de cerner les différents niveaux de ce comportement, l'étude entreprise consiste en l'application de différentes doses de plomb sous forme de nitrate de plomb [Pb(NO₃)₂] dans le substrat de culture, au cours de la période d'essai de la culture de deux variétés de la fève. Les paramètres morpho-physiologiques et enzymatiques ont été analysés afin de mesurer l'impact du stress au plomb appliqué à la plante. L'expérimentation a été réalisée dans la serre expérimentale du centre de recherche en biotechnologie (CRBT) de Constantine.

L'ensemble des paramètres étudiés sont réalisés dans les laboratoires :

- Laboratoire de Technologie Agroalimentaire de CRBT, Constantine,
- Laboratoire Biodiversité et Conservation des eaux et des sols de l'université AbdelHamid Ben Badis de Mostaganem.

1.2. Matériel

1.2.1. Matériel végétal

Deux variétés de la fève *Vicia faba* ont été utilisées :

- Variété Sidi Aïch (V1) qui est une variété locale.
- Variété Super Aguadulce (V2), une variété introduite de l'Espagne.

Les graines de ces deux variétés sont fournies soigneusement par le Centre National de Contrôle et Certification des Semences et Plantes (CNCCSP) de Constantine.

Le choix de ce model biologique est due aux caractéristiques de cette plante :

- capacité importante de germination
- croissance rapide et la biomasse importante
- sensibilité aux métaux
- taille importante de la partie végétative.

1.2.2. Matériel substrat

Le substrat utilisé dans l'expérimentation est constitué de mélange de sable et de terreau à des proportions 3v/ 1v. Le terreau est de type commercial dont les caractéristiques sont présentées dans le tableau 5. Le sable tamisé a subi plusieurs lavages à l'eau, ensuite séché à l'air libre, puis mélangé au terreau, le mélange homogénéisé et transvasé dans des pots en plastique, qui vont recevoir les plantes. Un échantillon du substrat est analysé afin de déterminer ces propriétés (Tab.6).

Tableau 5 : Caractéristiques du terreau.

Caractéristiques	Valeurs
Matière organique	70 / 80 % MS
Matière sèche	40 / 50 %
Porosité totale du volume	80 % v/v
Humidité	Min 40% - Max 60%
pH	4.5 – 7.5
Conductivité électrique CE	0.7 dS/m
Azote	50 – 300 mg/l (N)
Potassium	80 – 400 mg/l (K ₂ O)
Phosphate	80 – 300 mg/l (P ₂ O ₅)

Tableau 6 : Propriétés du substrat.

Propriétés	Valeurs
Granulométrie % (Pipette De Robinson)	
- Ø < 2µm	7.20
- 2µm < Ø < 50µm	1.50
- 50µm < Ø < 200µm	58.34
- 200µm < Ø < 2mm	32.96
pH (AFNOR X31-103 Sol/Eau : 2/5)	6.76
Conductivité Electrique (dS/m) (Iso : 11265 Sol/Eau : 1/10)	1.216
Matière Organique (%) (Méthode De Walkley)	1.34
Calcaire Total (%) Calcimètre De Bernard Iso : 10693	11.71
C.E.C En Meq/100g De Sol	9.28
U.S.D.A Texture	Sand (Sable)

1.2.3. Dispositif expérimental

Les pots utilisés pour la culture sont en plastique de volume de trois litres (3l) drainés par une coque de gravier, ces pots sont remplis par le mélange de substrat de culture en raison de 2.5 Kg /pot, les pots sont installés sur deux tables dans la serre jusqu'à la fin de l'expérimentation.

Les pots de culture sont répartis en deux lots pour chaque variété, Sidi Aïch (V1) et Super Aguadulce (V2), chaque lot est subdivisé en sept compartiments ou niveau de traitement ; D0, D1, D2, D3, D4, D5, D6, chaque niveau de traitement comporte quatre répétitions R1, R2, R3, et R4 (Fig.11).

Sidi Aïch (V1)								Super Aguadulce (V2)							
N	D0	D1	D2	D3	D4	D5	D6	N	D0	D1	D2	D3	D4	D5	D6
R1								R1							
R2								R2							
R3								R3							
R4								R4							

Dose de Pb D0: 0 ppm D1: 50 ppm D2: 100 ppm D3: 200 ppm
 D4: 500 ppm D5: 1000 ppm D6: 2000 ppm
 R1: 1ère répétition R2: 2ème répétition R3: 3ème répétition R4 : 4ème répétition

Figure 11 : Dispositif expérimental adopté.

1.2.4. Conduite de l'essai

L'expérimentation est conduite dans une serre semi-automatique au niveau du centre de recherche de biotechnologie (CRBT), Constantine. Les conditions de culture sont maintenues pour toute l'expérimentation à la température de 19°C nocturne et 23°C diurne avec une humidité relative à voisinant 70%.

1.2.5. Mise en germination

Les graines de la fève, des deux variétés sont stérilisées dans une solution d'hypochlorite de sodium à 6%, rincées à l'eau distillée, puis placées dans des boîtes en plastique alimentaire imbibées d'eau et maintenues en obscurité pour germer. Après quatre jours, les graines germées sont repiquées dans les pots de culture installés dans la serre.

Afin d'assurer un bon approvisionnement en eau, l'arrosage des plants est assuré périodiquement en maintenant le substrat à la capacité de rétention maximum par apport quotidien d'une quantité d'eau estimée par pesée des pots. L'eau d'irrigation est substituée tous les trois jours par une solution nutritive commerciale ACTIFEG (Tab.7).

Tableau 7: Composition de la solution nutritive.

Elément chimique	Quantité
N	20%
P ₂ O ₅	20%
K ₂ O	20%
S	0.8%
MgO	0.4%
Fe EDTA	650 ppm
Mn	650 ppm
Mo	50 ppm
SO ₃	0.8%
Cu	60 ppm
Zn	300 ppm
Bore (B)	300 ppm

1.2.6. Application du stress

Les différentes doses retenues pour appliquer le stress au plomb sont : 0 ppm (témoin), 50 ppm, 100 ppm, 200 ppm, 500 ppm, 1000 ppm et 2000 ppm. Le stress a été appliqué cinq jours après le repiquage des jeunes plantes, le plomb est ajouté sous forme de solution de nitrate Pb(NO₃)₂.

L'ensemble des paramètres testés et les mesures réalisées sont effectués à la fin de l'expérimentation (Fig.12).

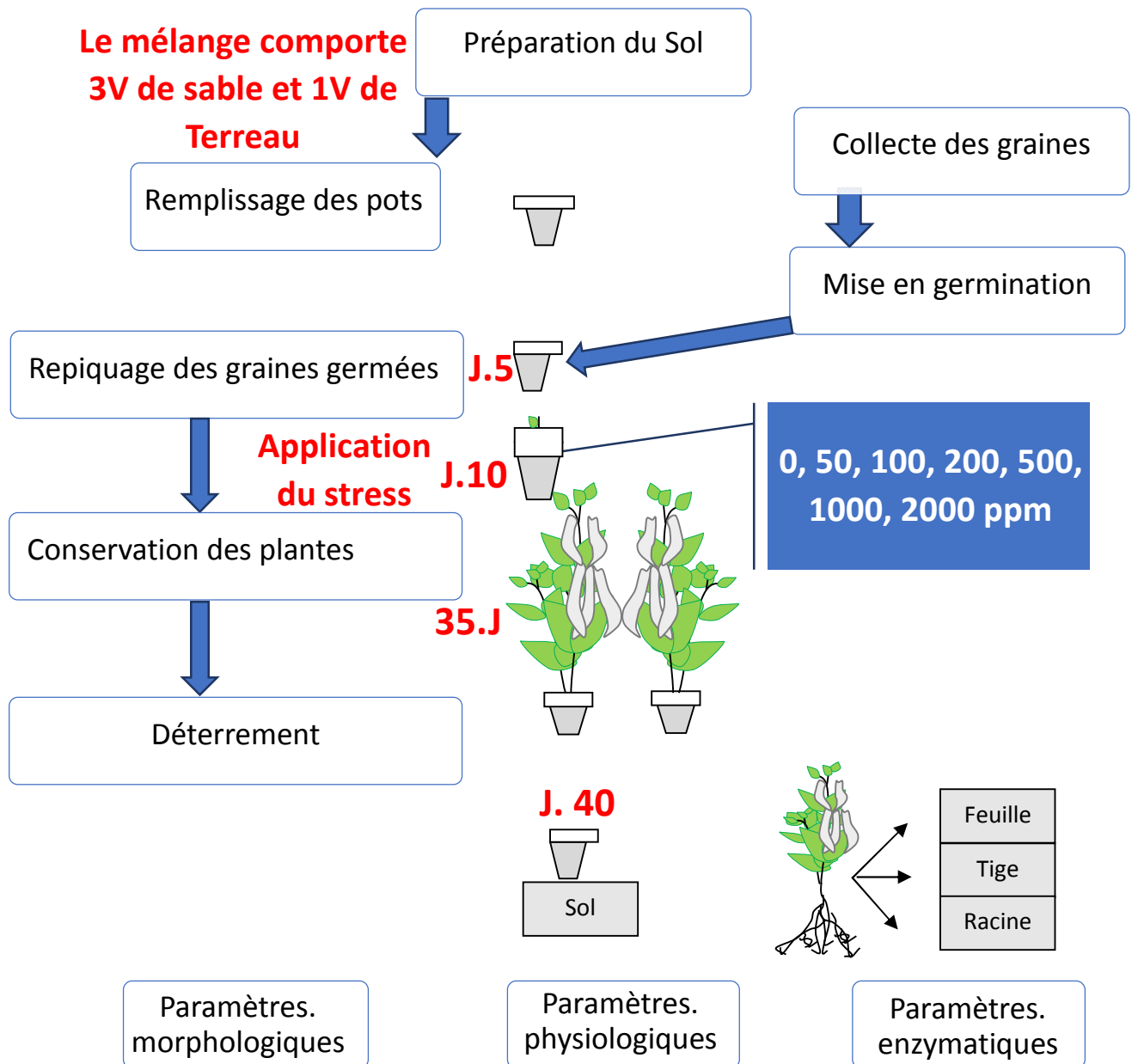


Figure 12 : Conduite de l'expérimentation.
J : jour

2. Méthodes

2.1. Paramètres analysés

Après une durée de culture de 30 jours, les plantes sont débarrassées de leurs substrat et préparées pour faire une série des tests.

2.1.1. Paramètres morpho-physiologiques

2.1.1.1. Paramètres morphologiques

L'ensemble des paramètres morphologiques ont porté sur les points suivants :

- Le nombre des folioles par plant,
- La hauteur de la tige (en cm),
- Le volume racinaire (en cm³),
- La surface foliaire (ce paramètre est déterminé par l'utilisation du logiciel « ImageJ » (annexe.4),
- Le poids sec de la partie racinaire et aérienne après séchage à 80°C pendant 48 heures.

2.1.1.2. Paramètres physiologiques

A) Teneur relative en eau (TRE)

La teneur relative en eau (TRE) estimée 30 jours après l'application du stress, la TRE est déterminée par l'équation de **Barrs et Weatheley** (1968):

$$TRE (\%) = [(FW - DW) / (TW - DW)] \times 100.$$

TW: turgescence weight (masses turgescence en g).

FW: fresh weight (masses fraîche en g).

DW: dry weight (masses sèche en g).

B) Paramètres biochimiques

a. Dosage des pigments chlorophylliens

Les concentrations en pigments chlorophylliens (chlorophylle **a**, chlorophylle **b** et caroténoïdes) sont déterminées par spectrométrie selon la procédure citée par **Lichtenthaler** (1987), les teneurs sont exprimées en mg/g de matière fraîche en utilisant les formules suivantes (**Wang et al., 2010**):

- $\text{Chlr.a} = 12,25 \times A663 - 2,79 \times A645$ (chlorophylle a).
- $\text{Chlr.b} = 21,50 \times A645 - 5,10 \times A663$ (chlorophylle b).
- $\text{CRTN} = (1000 \times A470 - 1,82 \times \text{Chlr.a} - 85,02 \times \text{Chlr.b})/198$ (caroténoïdes).

b. Dosage de la proline

La méthode suivie pour la détermination de la concentration en proline est celle de **Troll et Lindsley** (1955), simplifiée et mise au point par **Dreir et Goring** (1974). La concentration est estimée en $\mu\text{g/g}$ de matière fraîche après conversion de la densité optique lue sur un spectrophotomètre UV-Visible avec une longueur d'onde de 528nm .

c. Dosage des sucres solubles

La détermination de la quantité des sucres solubles est réalisée par la méthode à l'Anthrone de **Shields et Burnett** (1960). Les concentrations sont exprimées en $\mu\text{g/g}$ de matière fraîche par spectrophotomètre UV-Visible à 585nm .

d. Dosage des protéines

Le contenu protéinique est déterminé selon la méthode **Bradford** (1976) qui utilise le sérum albumine bovin (BSA) comme standard. Les concentrations sont calculées d'après la lecture au spectrophotomètre UV-Visible à 595nm , et sont exprimées en mg/g de matière fraîche.

2.1.2. Paramètres enzymatiques

a. Métabolites secondaires

- Polyphénols TPC

La teneur en polyphénols totaux (TPC) est déterminée selon la méthode de dosage sur microplaque décrite par **Muller et al.,** (2010) par l'utilisation du réactif Folin-Ciocalteu (**Singleton et Rossi, 1965**). Les teneurs en TPC sont exprimées en $\mu\text{g/mg}$ de matière sèche et sont établies par spectrophotomètre UV-visible à une longueur d'onde de 760nm .

- flavonoïdes TFC

Les teneurs en flavonoïdes totaux (TFC) sont déterminés par la méthode décrite par **Tupçu *et al.***, (2007), après lecture au spectrophotomètre UV-visible à 415 nm, les concentrations sont exprimées en µg/mg.

b. Dosage des enzymes antioxydantes**- Dosage de Catalase (CAT; EC1.11.1.6)**

La catalase est déterminée selon la méthode **Zhang et al.**, (2009) par spectrophotomètre UV-visible. L'activité de la catalase est déterminée par la régression de l'absorption à 240nm par intervalle d'une minute, elle est donnée en ΔDO 240/mg de protéines.

- Dosage de peroxydase Gaïacol (GPx; CE1.11.1.7)

La peroxydase est déterminée selon la méthode citée par **Zhang et al.**, (2009) par spectrophotomètre UV-Visible à une longueur d'onde de 470nm. L'activité de la peroxydase est calculée par la progression de l'absorption par ½ minute d'intervalle, elle est exprimée en ΔDO 470/mg de protéines.

2.1.3. Dosage du plomb

La détermination de la teneur en plomb dans la plante est effectuée par spectrométrie d'absorption atomique (SAA) après attaque par l'acide nitrique et l'acide perchlorique selon la méthode décrite par **Vogel-Milkus *et al.***, (2005).

2.2. Analyse Statistique

Les résultats des paramètres testés sont présentés en moyennes ± écart-type. L'ensemble des données obtenues ont fait l'objet d'une étude statistique basée sur une analyse de variance ANOVA à deux facteurs, plus une comparaison entre les moyennes selon le test de Dunnett à $p < 0.05$, et enfin, un test de régression linéaire entre les paramètres testés a été réalisé pour établir le coefficient de régression (r) et le coefficient de détermination (R -carré).

Chapitre III.

Résultats et discussion

I. Présentation des Résultats

I.1. Effet du plomb sur les paramètres morphologiques de la fève

I.1.1. Nombres des folioles

Selon les résultats obtenus (Fig.13), le nombre des folioles diminue avec l'augmentation de la dose du plomb présente dans le milieu. Cette diminution est d'environ 29% pour V1 et 36% pour V2 en présence de 2000 ppm de Pb par rapport au témoin, alors qu'elle n'est que de 15% pour V1 (Sidi Aïch) et 13% pour V2 (Super Aguadulce) à la dose 50 ppm de Pb (Tab.8). La diminution du nombre de foliole devienne notable à partir de la dose de 100 ppm pour V1 avec une réduction de l'ordre de 20%, et à partir de la dose de 200 ppm pour V2. La plus importante réduction du nombre de folioles est enregistrée à la dose 2000 ppm pour la variété Super Aguadulce (36%) par rapport à la variété Sdi Aïch (29.7%) (Tab.8).

L'analyse de la variance (Tab.13) montre que l'évolution du nombre de folioles n'est pas influencée par les variations de la dose de plomb appliquée ($p = 0.0559$ ^{NS}) ni par celles de la variété ($p = 0.086$ ^{NS}).

Tableau 8 : Effet du plomb sur le nombre des folioles des deux variétés V1 (Sidi Aïch) et V2 (Super Aguadulce).

Dose de Plomb (ppm)	V1		V2	
	Nombre de Folioles	Evolution (%)	Nombre de Folioles	Evolution (%)
0	16.0±0.8	/	18.75±5.91	/
50	13.5±1.7 ^{NS}	-15.6	16.25±4.50 ^{NS}	-13.3
100	12.8±3.3 ^{NS}	-20.3	16.25±2.36 ^{NS}	-13.3
200	13.3±1.7 ^{NS}	-17.2	15.00±1.83 ^{NS}	-20.0
500	13.8±1.3 ^{NS}	-14.1	13.00±1.41 ^{NS}	-30.7
1000	12.0±6.1 ^{NS}	-25.0	15.00±1.83 ^{NS}	-20.0
2000	11.3±3.5 **	-29.7	12.00±2.83 **	-36.0

Test de Dunnett (NS : effet non significatif ; ** : effet très significatif)

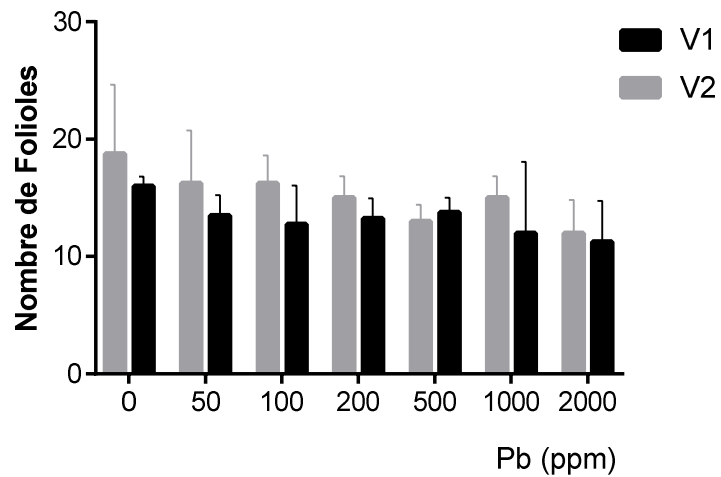


Figure 13. Evolution du nombre de folioles de la fève (V1 : Sidi Aïch et V2 : Super Aguadulce) en fonction de la dose de plomb appliquée (ppm).

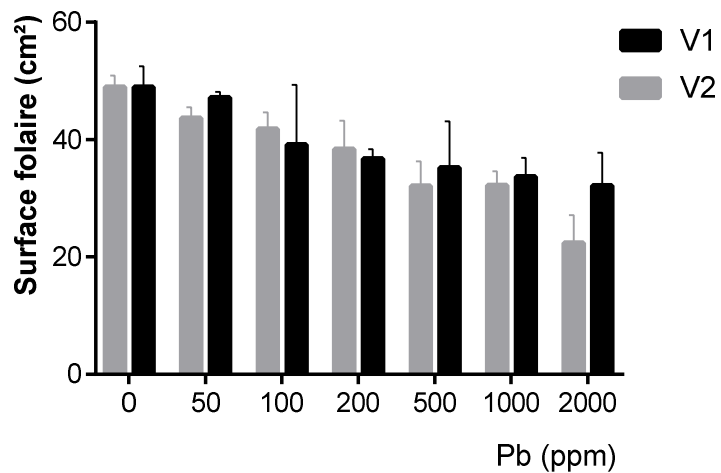


Figure 14 : Evolution de la surface foliaire (cm²) de la fève (V1 : Sidi Aïch et V2 : Super Aguadulce) en fonction de la dose de plomb appliquée (ppm).

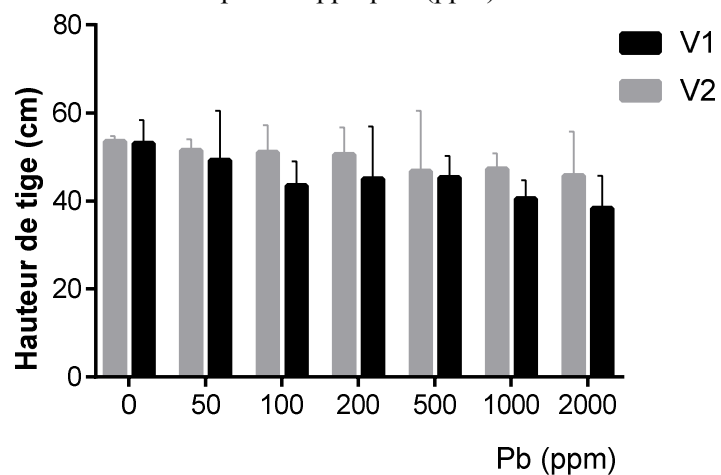


Figure 15 : Evolution de la hauteur de tige (cm) de la fève (V1 : Sidi Aïch et V2 : Super Aguadulce) en fonction de la dose de plomb appliquée (ppm).

I.1.2. Surface foliaire

L'observation de l'évolution de la surface foliaire (Fig.14) montre que ce paramètre est réduit par la présence du plomb dans le milieu de culture. La réduction de la surface foliaire est significative à partir de la dose D2 (100 ppm) où elle est de 20% pour la variété Sidi Aïch et 14% pour la variété Super Agadulce par rapport au témoin, cette réduction atteint plus de 34% pour la variété Sidi Aïch et plus 54% pour la variété Super Agadulce à la dose 2000 ppm (Tab.9).

Les résultats de l'analyse de la variance (Tab.13) témoignent d'une dépendance très hautement significative ($p < 0.0001$) de la surface foliaire au stress imposé par la présence du plomb dans le milieu. Le facteur variété n'a aucun effet sur les fluctuations de la surface foliaire ($p = 0.1268$ ^{NS}).

Tableau 9 : Effet du plomb sur la surface foliaire des deux variétés V1 (Sidi Aïch) et V2 (Super Agadulce).

Dose de Plomb (ppm)	V1		V2	
	Surface foliaire (cm)	Evolution (%)	Surface foliaire (cm)	Evolution (%)
0	48.93±3.6	/	48.96±1.9	/
50	47.15±1.0 ^{NS}	-3.6	43.70±1.8 ^{ns}	-10.75
100	39.13±10.2**	-20.0	41.81±2.8**	-14.60
200	36.75±1.6***	-24.9	38.35±4.9***	-21.66
500	35.24±7.9****	-28.0	32.11±4.2***	-34.41
1000	33.67±3.2****	-31.2	32.21±2.4****	-34.22
2000	32.17±5.6****	-34.3	22.37±4.8****	-54.30

Test de Dunnett (NS : effet non significatif ; ** : effet très significatif ; *** : hautement significatif ; **** : très hautement significatif).

I.1.3. Hauteur de la tige

L'observation de l'évolution de la hauteur de la tige (Fig.15) montre que la présence du plomb dans le milieu induit une réduction de ce paramètre. Ainsi à la dose 2000 ppm, les valeurs moyennes de la hauteur de la tige enregistrent une diminution de l'ordre de 27.83% pour la variété Sidi Aïch (V1) et plus de 14% pour la variété Super Agudaduce (V2), contre une diminution de l'ordre de 7% pour V1 et 3.7% pour V2 à la dose de 50 ppm par rapport aux valeurs enregistrées pour les plantes témoins (Tab.10). Les dommages ressentis sur la longueur de la tige dus à la présence du plomb sont plus significatifs à partir de la dose 100 surtout pour V1, pour la variété Super Aguadulce, les réductions sont appréciables à partir de la dose 500 ppm (Tab.10).

L'analyse de la variance (Tab.13) montre que la hauteur de la tige est sous la dépendance de la variation du facteur variétal ($p = 0.0297^*$), les valeurs moyennes enregistrées pour la variété Super Aguadulce (V2) sont supérieures à celles enregistrées pour la variété Sidi Aïch (V1) (50.035 cm contre 44.964). L'analyse montre en revanche, un effet non significatif de la variation de la dose de plomb appliquée sur les fluctuations de la hauteur de tige ($p = 0.1277^{NS}$). Les valeurs moyennes de la hauteur de la tige enregistrées par la variété Super Aguadulce sont supérieures à celles enregistrées par la variété Sidi Aïch.

Tableau 10 : Effet du plomb sur la hauteur de la tige des deux variétés V1 (Sidi Aïch) et V2 (Super Aguadulce).

Dose de Plomb (ppm)	V1		V2	
	Hauteur de la tige (cm)	Evolution (%)	Hauteur de la tige (cm)	Evolution (%)
0	53.00±5.35	/	53.50±1.29	/
50	49.25±11.21 ^{NS}	-7.08	51.50±2.52 ^{NS}	-3.74
100	43.50±5.51 ^{NS}	-17.92	55.00±10.61 ^{NS}	-4.67
200	45.00±11.92 ^{NS}	-15.09	50.50±6.19 ^{NS}	-5.61
500	45.25±4.99 ^{NS}	-14.62	46.75±13.72 ^{NS}	-12.62
1000	40.50±4.20 ^{NS}	-23.58	47.25±3.59 ^{NS}	-11.68
2000	38.25±7.46*	-27.83	45.75±10.05*	-14.49

Test de Dunnett (NS : effet non significatif ; * : effet significatif).

I.1.4. Volume racinaire

Selon les résultats obtenus (Fig.16), le volume racinaire est très diminué avec l'augmentation de la dose de plomb ajoutée dans le substrat. Ces diminutions sont très significatives même en présence des faibles doses et elles enregistrent à la dose 50 ppm plus de 39% pour V1 (la variété Sidi Aïch) et plus de 24% pour V2 (Super Aguadulce), ensuite elles passent à la dose 200 ppm (D3) à plus de 53% pour V1 et plus de 52% pour V2 et arrivant à D6 (2000 ppm) où ces réductions atteignent plus de 85% pour V1 et plus de 75% pour V2 par rapport aux valeurs enregistrées pour les plantes témoins (Tab.11).

Le tableau de la variance (Tab.13) montre que la présence du plomb dans le milieu provoque une diminution très hautement significative ($p < 0.0001$) du volume racinaire des plantes traitées. Le facteur variétal n'a aucun effet significatif sur les fluctuations de ce paramètre (0.0782^{NS}).

Tableau 11 : Effet du plomb sur le volume racinaire des deux variétés V1 (Sidi Aïch) et V2 (Super Aguadulce)

Dose de Plomb (ppm)	V1		V2	
	Volume racinaire (ml)	Evolution (%)	Volume racinaire (ml)	Evolution %
0	34.1±6.7	/	36.2±3.9	/
50	20.7±9.8**	-39.27	27.2±5.5**	-24.79
100	24.3±3.9**	-28.94	23.0±4.5**	-36.60
200	15.9±4.8****	-53.55	17.2±4.4****	-52.56
500	10.8±4.6****	-68.35	12.7±2.5****	-64.99
1000	10.1±3.0****	-70.48	10.4±3.1****	-71.34
2000	4.9±1.0****	-85.79	8.8±3.2****	-75.76

Test de Dunnett (** : effet très significatif ; **** : très hautement significatif).

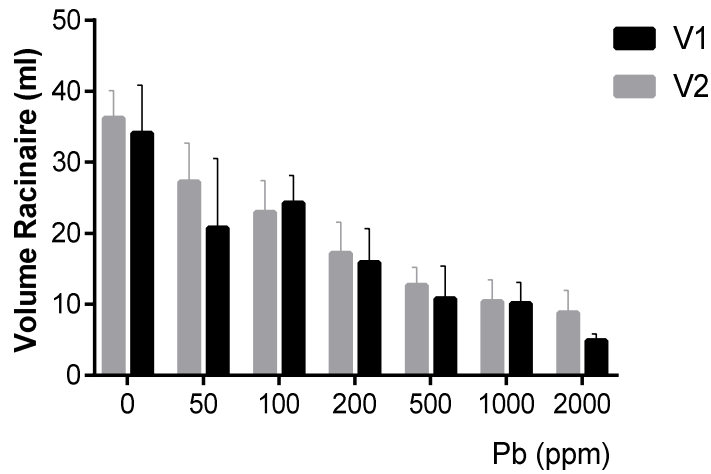


Figure 16 : Evolution du volume racinaire (ml) de la fève (V1 : Sidi Aïch et V2 : Super Aguadulce) en fonction de la dose de plomb appliquée (ppm).

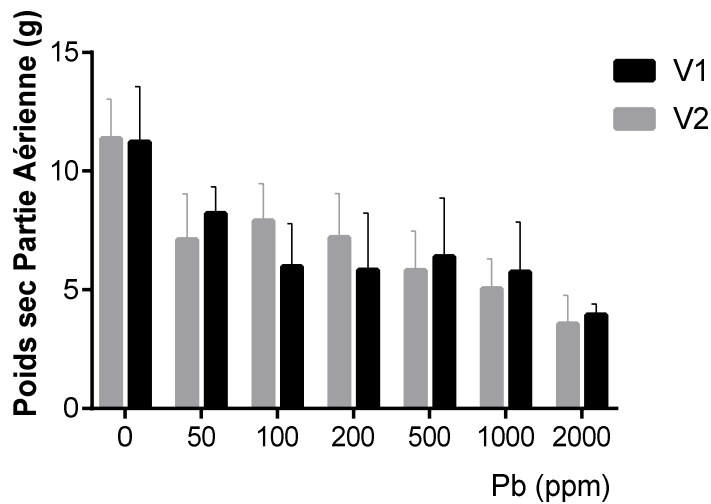


Figure 17 : Evolution du poids sec (g) de la partie Aérienne de la fève (V1 : Sidi Aïch et V2 : Super Aguadulce) en fonction de la dose de plomb appliquée (ppm).

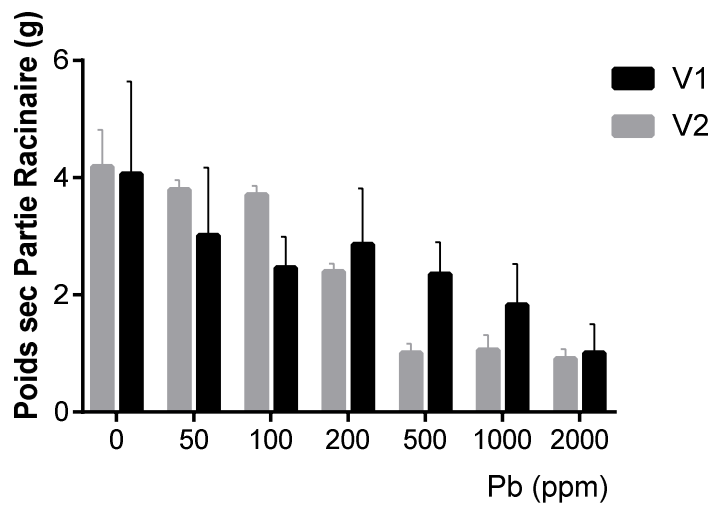


Figure 18 : Evolution du poids sec (g) de la partie Racinaire de la fève (V1 : Sidi Aïch et V2 : Super Aguadulce) en fonction de la dose de plomb appliquée (ppm).

I.1.5. Poids sec

Les résultats obtenus montrent que l'augmentation de la dose de plomb appliquée dans le substrat est accompagnée par une réduction du poids sec (Fig.17-18), ces diminutions affectent les deux parties de la plante (racinaire et aérienne). Dans les racines, les réductions du poids sont de l'ordre de plus de 75% pour V1 et plus de 78% pour V2 à la dose de 2000 ppm, alors qu'elles ne sont que de 25.83% pour V1 et 9.3% pour V2 à la dose D1 (50 ppm) par rapport aux valeurs enregistrées pour les plantes témoins (0 ppm) (Tab.12). Même allure est à constater pour le poids sec de la partie aérienne où les réductions sont plus de 64% pour Sidi Aïch et plus de 68% pour Super Agudulce à la dose D6 (2000 ppm), et elles ne sont que de 26.82% pour V1 et 37.43% pour V2 à la dose D1 (50 ppm) en comparaison avec les témoins (Tab.12).

Les résultats de l'analyse de la variance (Tab.13) montrent que les fluctuations du poids sec (de la partie racinaire et de la partie aérienne) sont très liées à la grandeur du stress au plomb imposé, ce facteur exerce un effet très hautement significatif sur la variation de ce paramètre ($p < 0.0001$). Cependant, le facteur variétal n'a aucun effet et reste non significatif ($p = 0.7542^{NS}$ pour le poids sec de la partie racinaire et $p = 0.8398^{NS}$ pour le poids sec de la partie aérienne).

Tableau 12 : Effet du plomb sur le poids sec en g de la partie aérienne (ADW) et partie racinaire (RDW) des deux variétés V1 (Sidi Aïch) et V2 (Super Agudulce)

Dose de Plomb (ppm)	V1				V2			
	RDW (g)	Evolution (%)	ADW (g)	Evolution (%)	RDW (g)	Evolution (%)	ADW (g)	Evolution (%)
0	4.19±0.63	/	11.38±1.65	/	4.06±1.58	/	11.22±2.33	/
50	3.80±0.16ns	-25.83	7.12±1.93**	-26.82	3.01±1.16ns	-9.30	8.21±1.13**	-37.43
100	3.71±0.16ns	-39.42	7.91±1.56***	-46.67	2.46±0.53ns	-11.47	5.98±1.80***	-30.49
200	2.40±0.13**	-29.64	7.21±1.84***	-48.05	2.86±0.96**	-42.72	5.83±2.40***	-36.57
500	1.01±0.16****	-42.12	5.82±1.65***	-43.02	2.35±0.55****	-75.93	6.39±2.47***	-48.82
1000	1.06±0.25****	-54.99	5.04±1.27****	-48.80	1.83±0.70****	-74.64	5.74±2.11****	-55.70
2000	0.91±0.17****	-75.15	3.57±1.21****	-64.91	1.01±0.49****	-78.26	3.94±0.46****	-68.65

Test de Dunnett (** : effet très significatif ; *** : hautement significatif ; **** : très hautement significatif).

Tableau 13 : analyse de la variance des paramètres morphologiques

	Poids Sec partie Racinaire	Poids Sec partie Aérienne	Nombre de Folioles	Hauteur Tige	Volume Racinaire	Surface Foliaire
Source de Variation	P value	P value	P value	P value	P value	P value
Facteur dose de plomb (F1)	<0.0001****	<0.0001****	0.0559 ^{NS}	0.1277 ^{NS}	<0.0001****	<0.0001****
Facteur variété (F2)	0.7542 ^{NS}	0.8398 ^{NS}	0.086 ^{NS}	0.0297*	0.0782 ^{NS}	0.1268 ^{NS}
Interaction: F1 x F2	0.0049**	0.5325 ^{NS}	0.7406 ^{NS}	0.9384 ^{NS}	0.6696 ^{NS}	0.331 ^{NS}

I.1.6. Corrélation des paramètres morphologiques

Les observations des résultats du test de la corrélation linéaire (annexe 3) ont dévoilé les points suivants :

- Une relation significative entre l'augmentation des doses du plomb appliquées dans le substrat et la diminution du nombre de folioles par plante avec une corrélation négative pour les deux variétés mais qui est significative seulement pour la variété Sidi Aïch avec un coefficient de corrélation $r=-50^*$ (Fig.19A),
- Une corrélation significative de la surface foliaire en fonction de la dose de plomb ajoutée dans le substrat de culture avec un coefficient de corrélation significatif et négatif pour V2 ($r=-0.86^*$) et pour V1 ($r=-0.57^*$) (Fig.19B),
- La hauteur des tiges est diminuée également en fonction de l'augmentation du stress en plomb, cette diminution se traduit par un coefficient de corrélation négatif mais qui est significatif seulement pour la variété Super Aguadulce ($r=-0.46^*$ pour V2 contre $r=-0.32$ pour V1) (Fig.19C).
- La diminution du volume racinaire à la suite de la présence du plomb dans le milieu, avec une corrélation négative et significative pour les deux variétés avec $r=-71^*$ (Fig.19D).
- Le poids sec est diminué en fonction de l'augmentation des doses appliquées du plomb, les diminutions de ce paramètre se traduisent par une corrélation significative et négative entre l'augmentation des doses du plomb et le poids sec des parties racinaires ($r=-76^*$ pour Sidi Aïch, $r=-65^*$ pour Super Aguadulce) et le poids sec des parties aériennes ($r=-59^*$ pour Sidi Aïch, $r=-54^*$ pour Super Aguadulce)(Fig.19.E-F).

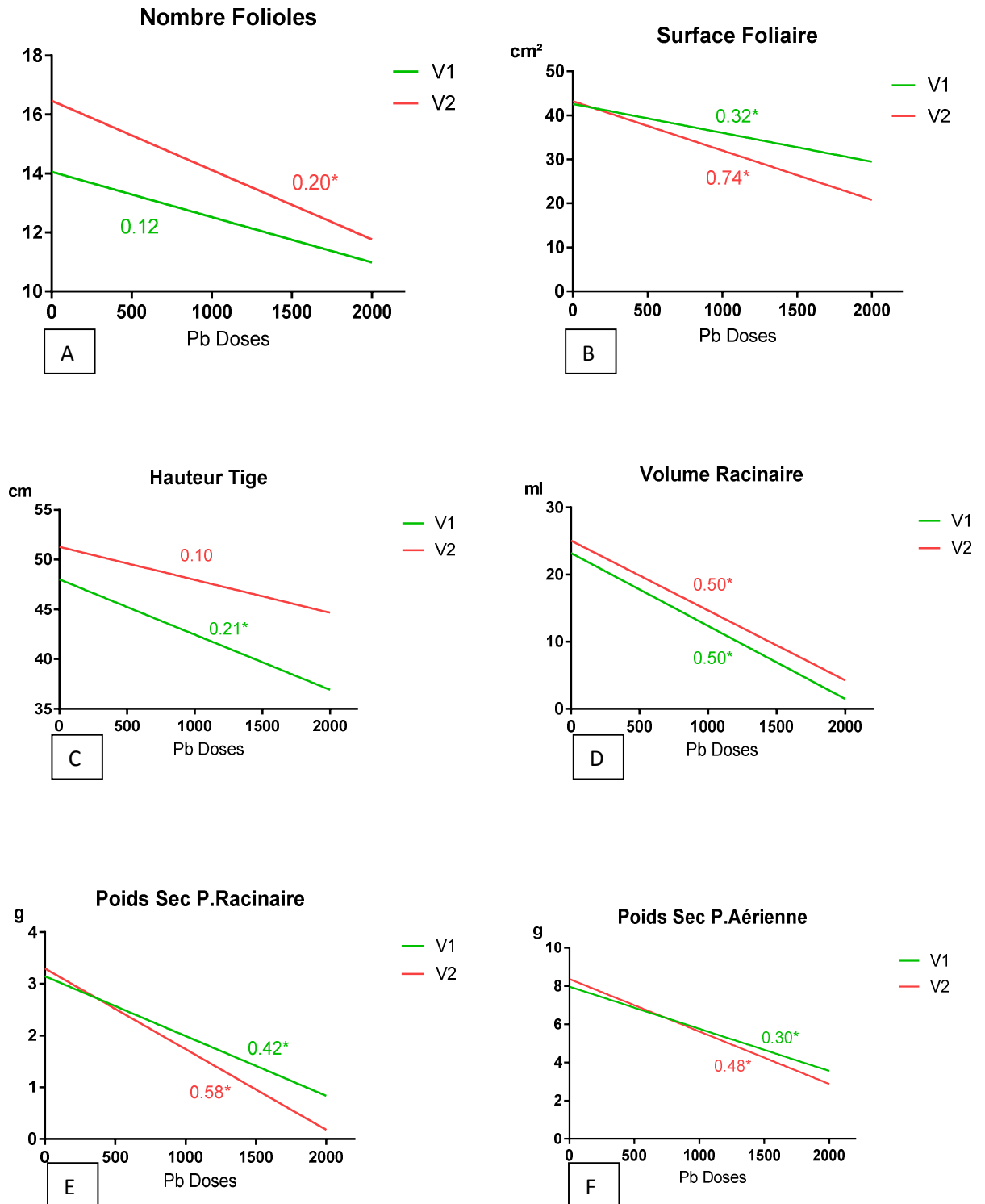


Figure 19 : Régression linière des paramètres morphologiques (par unité) en fonction de la dose du plomb appliquée (en ppm) avec le R² (R-square) pour V1 (Sidi Aïch) et V2 (Super Aguadulce).

* : régression significative.

I.2. Effet du plomb sur les paramètres physiologiques de la fève

I.2.1. Teneur en pigments photosynthétiques

I.2.1.1. Chlorophylle a

Les résultats obtenus (Fig.20) montrent que les teneurs de la chlorophylle **a** diminuent fortement en fonction de l'augmentation de la dose de plomb ajoutée dans le substrat. La régression de la teneur en chlorophylle **a** est hautement significative à partir de la dose 50 ppm où elle est de plus de 24% pour la variété Sidi Aïch et plus de 6% pour la variété Super Agudulce, cette régression arriver à plus de 81% pour V1 et plus de 63% pour V2 à la dose 2000 ppm (Tab.14). Selon les résultats obtenus (Fig.20), la variété Sidi Aïch est celle qui enregistre des réductions très importantes de la teneur en chlorophylle **a** en fonction de l'augmentation des doses ajoutées du plomb en comparaison avec la variété Super Agudulce.

D'après les résultats de la variance (Tab.21), les teneurs de la chlorophylle **a** sont très dépendantes de la variation du facteur dose de plomb ($p < 0.0001^{****}$), elles sont aussi dépendantes de la variation du facteur variétal ($p = 0.0216^*$).

Tableau 14 : Effet du plomb sur la teneur en chlorophylle a des deux variétés V1 (Sidi Aïch) et V2 (Super Agudulce).

Dose de Plomb (ppm)	V1		V2	
	Chlorophylle a (mg/g)	Evolution (%)	Chlorophylle a (mg/g)	Evolution (%)
0	1.207±0.067	/	1.184±0.217	/
50	0.907±0.196***	-24.92	1.102±0.404***	-6.89
100	0.549±0.308****	-54.50	0.822±0.080****	-30.53
200	0.350±0.297****	-71.01	0.617±0.193****	-47.87
500	0.343±0.130****	-71.56	0.599±0.197****	-49.38
1000	0.266±0.080****	-77.96	0.492±0.208****	-58.41
2000	0.228±0.109****	-81.11	0.434±0.143****	-63.38

Test de Dunnett (** : hautement significatif ; **** : très hautement significatif).

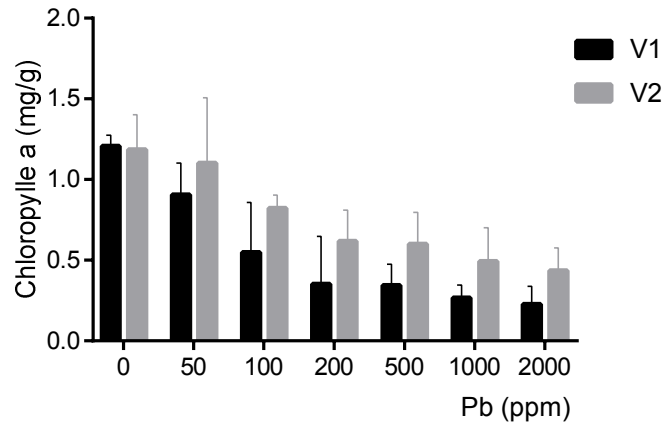


Figure 20 : Evolution de la teneur en chlorophylle a (mg/g) de la fève (V1 : Sidi Aïch et V2 : Super Aguadulce) en fonction de la dose de plomb appliquée (ppm).

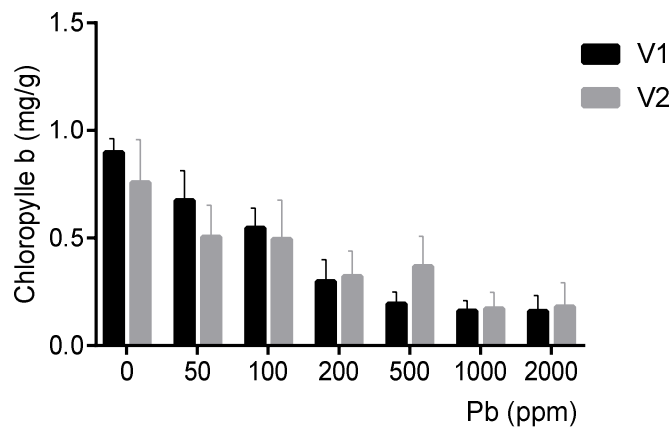


Figure 21 : Evolution de la teneur en chlorophylle b (mg/g) de la fève (V1 : Sidi Aïch et V2 : Super Aguadulce) en fonction de la dose de plomb appliquée (ppm).

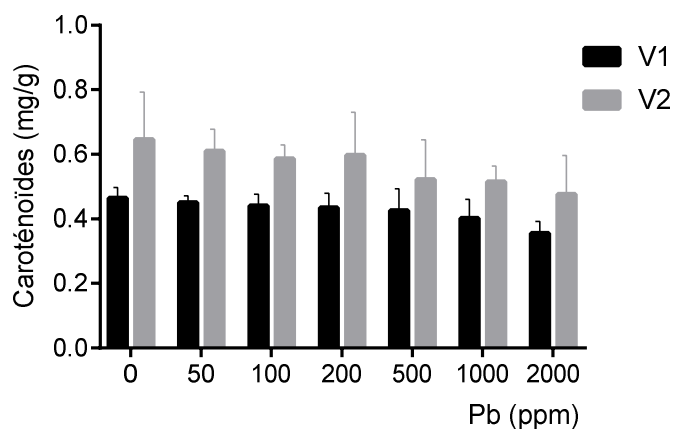


Figure 22 : Evolution de la teneur en caroténoïdes (mg/g) de la fève (V1 : Sidi Aïch et V2 : Super Aguadulce) en fonction de la dose de plomb appliquée (ppm).

I.2.1.2. Chlorophylle b

Les observations des résultats (Fig.21) montrent que l'augmentation de la dose du plomb dans le substrat de culture provoque une régression très importante de la teneur en chlorophylle **b**, ces régressions sont très significatives à partir de la dose 50 ppm ou on a enregistré une diminution par rapport au témoin de l'ordre de 24.95% pour la variété Sidi Aïch (V1) et 33.47% pour la variété Super Aguadulce (V2), ces régressions atteignent à la dose 2000 ppm plus de 82% et 76% respectivement pour V1 et pour V2 (Tab.15).

L'analyse de la variance (Tab.21) montre que les fluctuations de la teneur en chlorophylle **b** sont sous la dépendance de la variation du facteur dose de plomb ($p < 0.0001^{****}$). Cette analyse montre (Tab.21) que le facteur variétal n'exerce aucun effet significatif ($p = 0.657^{NS}$), ainsi les valeurs moyennes de la teneur en chlorophylle **b** enregistrées de pour les deux variétés sont très rapprochées (0.42 mg/g pour V1 et 0.40 mg/g pour V2).

Tableau 15 : Effet du plomb sur la teneur en chlorophylle b des deux variétés V1 (Sidi Aïch) et V2 (Super Aguadulce).

Dose de Plomb (ppm)	V1		V2	
	Chlorophylle b (mg/g)	Evolution (%)	Chlorophylle b (mg/g)	Evolution (%)
0	0.90±0.06	/	0.76±0.2	/
50	0.67±0.14**	-24.95	0.50±0.15**	-33.47
100	0.55±0.09***	-39.08	0.49±0.18***	-34.82
200	0.30±0.1****	-66.85	0.32±0.12****	-57.57
500	0.19±0.06****	-78.32	0.37±0.14****	-51.55
1000	0.16±0.05****	-82.13	0.17±0.08****	-77.33
2000	0.16±0.07****	-82.21	0.18±0.11****	-76.21

Test de Dunnett (** : hautement significatif ; **** : très hautement significatif).

I.2.1.3. Caroténoïdes

Selon les résultats enregistrés (Fig.22), la teneur en caroténoïdes dans les feuilles des deux variétés de la fève diminue légèrement avec l'augmentation de la dose de plomb ajoutée dans le substrat, cette diminution reste non significative jusqu'à la dose 2000 ppm où elle est de l'ordre de 23.59% et 26.26% respectivement pour la variété Sidi Aïch et pour la variété Super Aguadulce, alors qu'elle n'est que de 3.1% pour V1 et de 5.54% pour V2 à la dose 50 ppm (Tab.16).

L'analyse de la variance (Tab.21) montre que les fluctuations de la teneur en caroténoïdes ne sont pas influencées par les variations du facteur dose de plomb ($p = 0.1011^{NS}$). Ce paramètre est fortement influencé par la variation du facteur variétal ($p=0.0049^{**}$)(Tab.21), cette dépendance se traduit par des valeurs de la teneur en caroténoïdes très distinctes entre les deux variétés, ainsi la variété Super Aguadulce enregistre des valeurs moyennes nettement supérieures à celles enregistrées par Sidi Aïch (0.565 contre 0.425 mg/g).

Tableau 16 : Effet du plomb sur la teneur en caroténoïdes (mg/g) des deux variétés V1 (Sidi Aïch) et V2 (Super Aguadulce).

Dose de Plomb (ppm)	V1		V2	
	Caroténoïdes (mg/g)	Evolution (%)	Caroténoïdes (mg/g)	Evolution %
0	0.46±0.03		0.65±0.15	/
50	0.45±0.02 ^{NS}	-3.10	0.61±0.07 ^{NS}	-5.54
100	0.44±0.04 ^{NS}	-5.27	0.59±0.04 ^{NS}	-9.20
200	0.43±0.04 ^{NS}	-6.43	0.60±0.13 ^{NS}	-7.62
500	0.43±0.07 ^{NS}	-8.51	0.52±0.12 ^{NS}	-19.21
1000	0.40±0.06 ^{NS}	-13.46	0.51±0.05 ^{NS}	-20.32
2000	0.36±0.04*	-23.59	0.48±0.12*	-26.26

Test de Dunnett (NS : non significatif ; * : significatif).

I.2.2. Teneur en eau relative (TRE)

L'observation des résultats (Fig.23) montre que l'augmentation de la dose de plomb provoque une diminution de la teneur en eau relative chez les plantes de la fève. La réduction de la TRE est significative à partir de la dose 200 ppm, où elle est de plus de 15% pour les deux variétés (Tab.17). Cette diminution atteint son maximum à la dose 2000 ppm avec une réduction de plus de 19% pour la variété Sidi Aïch et plus de 20% pour la variété Super Aguadulce par rapport aux valeurs enregistrées pour les plantes témoins (Tab.17). Les valeurs moyennes de la TRE enregistrées des deux variétés sont très rapprochées (75.74% pour V1 contre 74.15% pour V2).

Les résultats de l'analyse de la variance (Tab.21) montrent que la teneur en eau relative est influencée par le stress imposé par la présence du plomb dans le substrat ($p < 0.05$). Le facteur variétal n'a aucun effet sur les variations de la teneur en eau relative ($p = 0.2867$).

Tableau 17 : Effet du plomb sur la teneur en eau relative (%) des deux variétés V1 (Sidi Aïch) et V2 (Super Aguadulce).

Dose de Plomb (ppm)	V1		V2	
	TRE (%)	Evolution (%)	TRE (%)	Evolution (%)
0	87.06±7.05	/	84.06±5.53	/
50	76.47±8.62 ^{NS}	-12.17	78.64±7.62 ^{NS}	-6.45
100	76.46±12.62 ^{NS}	-12.18	74.96±6.79 ^{NS}	-10.83
200	73.80±4.81*	-15.23	70.80±5.33*	-15.78
500	72.87±7.87*	-16.31	69.87±2.55*	-16.89
1000	73.36±3.81*	-15.74	73.59±7.96*	-12.46
2000	70.14±11.78**	-19.44	67.14±4.99**	-20.13

Test de Dunnett (NS : non significatif ; * : significatif ; ** : très significatif).

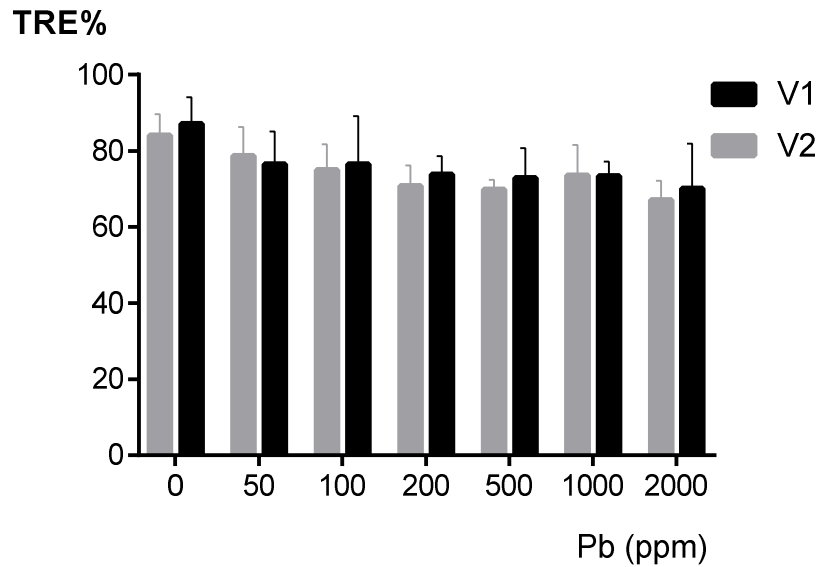


Figure 23 : Evolution de la teneur en eau relative (%) de la fève (V1 : Sidi Aïch et V2 : Super Aguadulce) en fonction de la dose de plomb appliquée (ppm).

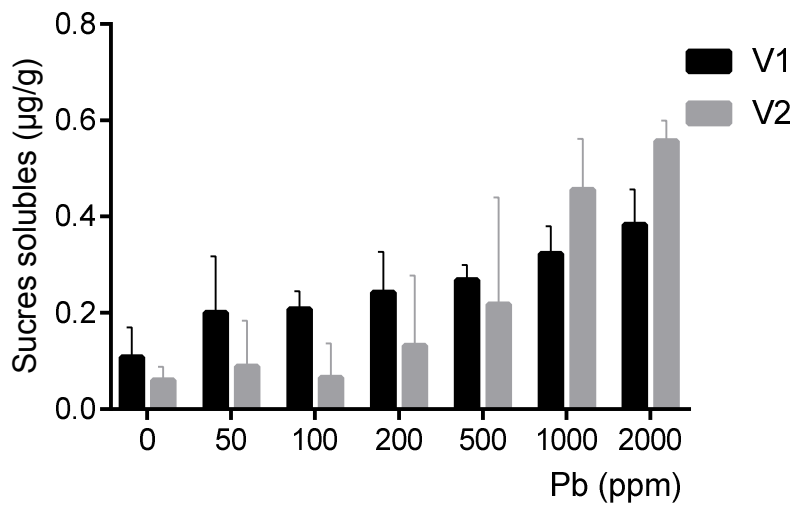


Figure 24 : Evolution de la teneur en sucres solubles (µg/g) de la fève (V1 : Sidi Aïch et V2 : Super Aguadulce) en fonction de la dose de plomb appliquée (ppm).

I.2.3. Teneurs en sucres solubles

L'observation de l'évolution de la teneur en sucres solubles dans les feuilles (Fig.24) montre que l'augmentation des doses appliquées du plomb dans le substrat de culture provoque une augmentation proportionnelle de ce paramètre. L'augmentation de la teneur en sucre devient significative à partir de la dose 500 ppm où on remarque une progression de l'ordre de plus de 149% pour Sidi Aïch et plus de 259% pour Super Aguadulce, au-delà de cette dose (500 ppm) les évolutions deviennent très importantes, 200% pour V1 et 653% pour V2 à la dose de 1000 ppm, pour arriver enfin à la dose 2000 ppm où on enregistre les plus grandes évolutions par rapport aux témoins (256% pour V1 et 821% pour V2) (Tab.18).

Les résultats de l'analyse de la variance (Tab.21) montrent que les fluctuations de la teneur en sucres solubles dans les feuilles sont très fortement liées à la variation du facteur dose de plomb ($p < 0.0001^{****}$). Le facteur variétal n'a aucun effet sur l'accumulation des sucres solubles ($p = 0.5602^{NS}$) (Tab.30), néanmoins, l'observation des résultats (Fig.24) montre que les deux variétés réagissent différemment à la variation du facteur présence de plomb, cela se traduit par un effet significatif ($p = 0.0152^*$) de l'interaction des deux facteurs étudiés (Tab.21).

Tableau 18 : Effet du plomb sur la teneur en sucres solubles ($\mu\text{g/g}$) des deux variétés V1 (Sidi Aïch) et V2 (Super Aguadulce).

Dose de Plomb (ppm)	V1		V2	
	Sucres solubles ($\mu\text{g/g}$)	Evolution (%)	Sucres solubles ($\mu\text{g/g}$)	Evolution %
0	0.11±0.06	/	0.06±0.0	/
50	0.20±0.12 ^{NS}	86.28	0.07±0.06 ^{NS}	47.52
100	0.21±0.04 ^{NS}	93.49	0.09±0.08 ^{NS}	8.68
200	0.24±0.08 ^{NS}	125.58	0.13±0.13 ^{NS}	117.77
500	0.27±0.03 [*]	149.30	0.22±0.19 [*]	259.50
1000	0.32±0.06 ^{****}	200.70	0.46±0.09 ^{****}	653.72
2000	0.38±0.07 ^{****}	256.28	0.56±0.04 ^{****}	821.07

Test de Dunnett (NS : non significatif ; * : significatif ; **** : très hautement significatif).

I.2.4. Teneur en protéines

L'observation des résultats (Fig.25) montre que l'augmentation des doses appliquées du plomb dans le substrat de culture provoque une diminution de la teneur en protéines dans les feuilles. La teneur en protéines enregistre une régression très importante à la dose de 2000 ppm où elle est de l'ordre de plus de 66% pour les deux variétés, alors qu'elle n'est que de 11.46% pour V1 et de 1.84 pour V2 à la dose 50 ppm (Tab.19) par rapport aux valeurs enregistrées pour les témoins.

L'analyse de la variance (Tab.21) montre un effet très hautement significatif ($p < 0.0001$) de la variation des doses de plomb sur la teneur en protéines dans les feuilles de la fève, l'analyse montre également un effet très hautement significatif ($p < 0.0001$) de l'interaction entre les deux facteurs étudiés, par-contre, le facteur variétal n'exerce aucun effet sur les fluctuations de ce paramètre.

Tableau 19 : Effet du plomb sur la teneur en protéines (mg/g) des deux variétés V1 (Sidi Aïch) et V2 (Super Aguadulce).

Dose de Plomb (ppm)	V1		V2	
	Protéines (mg/g)	Evolution (%)	Protéines (mg/g)	Evolution (%)
0	40.67±0.86	/	42.31±0.62	/
50	36.01±0.76****	-11.46	41.53±0.81****	-1.84
100	40.25±0.73****	-1.03	31.94±0.44****	-24.51
200	35.55±1.47****	-12.58	39.55±0.39****	-6.52
500	25.3±0.57****	-37.78	24.39±1.04****	-42.35
1000	18.73±0.10****	-53.94	18.34±0.71****	-56.65
2000	13.49±0.50****	-66.82	14.06±0.69****	-66.77

Test de Dunnett (**** : très hautement significatif).

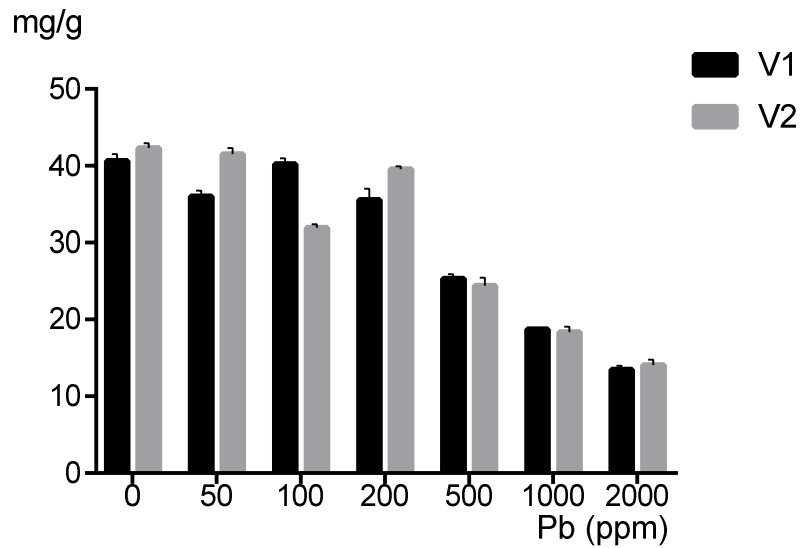


Figure 25: Evolution de la teneur en protéines (mg/g) de la fève (V1 : Sidi Aïch et V2 : Super Aguadulce) en fonction de la dose de plomb appliquée (ppm).

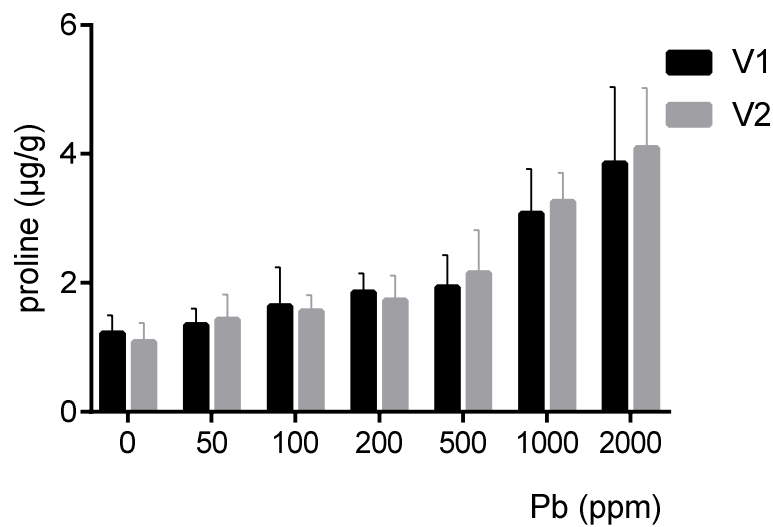


Figure 26 : Evolution de la teneur en proline (µg/g) de la fève (V1 : Sidi Aïch et V2 : Super Aguadulce) en fonction de la dose de plomb appliquée (ppm).

I.2.5. Teneur en Proline

D'après les résultats obtenus (Fig.26) l'augmentation de la dose de plomb dans le milieu provoque une augmentation de la teneur en proline dans les feuilles de la fève. L'augmentation de la teneur en proline observée est significative à partir de la dose 1000 ppm où on a enregistré une hausse de l'ordre de plus de 153% pour la variété Sidi Aïch, et de plus de 201% pour la variété Super Aguadulce par rapport aux valeurs enregistrées pour les témoins (Tab.20). Cette augmentation atteint son maximum à la dose 2000 ppm avec une hausse de 217% et 278% respectivement pour la variété Sidi Aïch et la variété Super Aguadulce (Tab.20).

Les résultats de l'analyse de la variance (Tab.21) montrent que l'évolution de la teneur en proline est fortement liée ($p < 0.0001$) à la variation de la dose de plomb appliquée. Ces résultats montrent également, que les fluctuations de la teneur en proline ne sont pas influencées par le facteur variétal ($p = 0.4579$ ^{NS}) (Tab.21), les deux variétés enregistrent des valeurs moyennes très rapprochées (2.13 $\mu\text{g/g}$ pour la variété Sidi Aïch et 2.19 $\mu\text{g/g}$ pour la variété Super Aguadulce).

Tableau 20 : Effet du plomb sur la teneur en proline ($\mu\text{g/g}$) des deux variétés V1 (Sidi Aïch) et V2 (Super Aguadulce).

Dose de Plomb (ppm)	V1		V2	
	proline ($\mu\text{g/g}$)	Evolution (%)	proline ($\mu\text{g/g}$)	Evolution %
0	1.22±0.28	/	1.08±0.29	/
50	1.35±0.26ns	10.71	1.43±0.39ns	32.31
100	1.64±0.60ns	35.17	1.56±0.25ns	44.46
200	1.85±0.30ns	52.17	1.73±0.39ns	59.46
500	1.93±0.49ns	58.79	2.15±0.66ns	99.12
1000	3.08±0.69***	153.2	3.26±0.45***	201.23
2000	3.86±1.18*****	217	4.09±0.93*****	278.41

Test de Dunnett (NS : non significatif; *** : hautement significatif; ***** : très hautement significatif).

Tableau 21 : Analyse de la variance des paramètres physiologiques.

Source de Variation	TRE	Chlorophylle A	Chlorophylle B	Caroténoïdes	Sucres Solubles	Protéines	Proline
	P value	P value	P value	P value	P value	P value	P value
Facteur dose de plomb (F1)	0.0173*	<0.0001****	<0.0001****	0.1011 ^{NS}	<0.0001****	<0.0001****	<0.0001****
Facteur variété (F2)	0.2867 ^{NS}	0.0216*	0.657 ^{NS}	0.0049*	0.5602 ^{NS}	0.247 ^{NS}	0.4579 ^{NS}
Interaction: F1 x F2	0.9832 ^{NS}	0.7743 ^{NS}	0.0436*	0.9072 ^{NS}	0.0152 ^{NS}	<0.0001****	0.9142 ^{NS}

I.2.6. Corrélation des paramètres physiologiques

Les résultats du test de la corrélation linéaire (annexe 3) permettent de montrer les points suivants :

- Une corrélation significative et négative entre l'augmentation des doses ajoutées en plomb et la teneur en chlorophylle **a** (Fig.27.A) pour la variété Sidi Aïch ($r=-0.58^*$) et pour la variété Super Aguadulce ($r=-0.61^*$),
- Une diminution de la chlorophylle **b** en fonction de l'augmentation des doses de plomb dans le substrat (Fig.27.B), avec une corrélation significative et négative pour la variété Sidi Aïch ($r=-0.67^*$) et la variété Super Aguadulce ($r=-0.63^*$),
- La diminution de la teneur en caroténoïdes en fonction de l'augmentation du stress au plomb (Fig.27.C) avec une régression linéaire de l'ordre de $r=-0.64$ pour la variété Sidi Aïch et $r=-0.47^*$ pour la variété Super Aguadulce,
- Les sucres solubles diminuent également avec l'augmentation du stress au plomb imposé, cette diminution se traduit par une corrélation significative et positive pour les deux variétés ($r=0.72^*$ pour V1, $r=0.84^*$ pour V2) (Fig.28.A),
- Une corrélation très significative et positive entre la teneur en proline enregistrée et la dose de plomb appliquée dans le milieu de culture pour les deux variétés ($r^2=0.70^*$ pour V1 et $r^2=0.79^*$ pour V2) (Fig.28.B),
- Une réduction de la teneur en protéine suit à l'augmentation des doses de plomb, avec une régression linéaire négative et significative pour les deux variétés testées ($r^2=0.86^*$ pour la variété Sidi Aïch et $r^2=0.79^*$ pour la variété Super Aguadulce) (Fig.28.C),
- L'évolution de la teneur en relative en fonction de l'augmentation des doses de plomb appliquées, montre une régression significative et négative pour la variété Super Aguadulce ($r=-0.48^*$) contrairement à la variété Sidi Aïch ($r=-0.36$) (Fig.28.D).

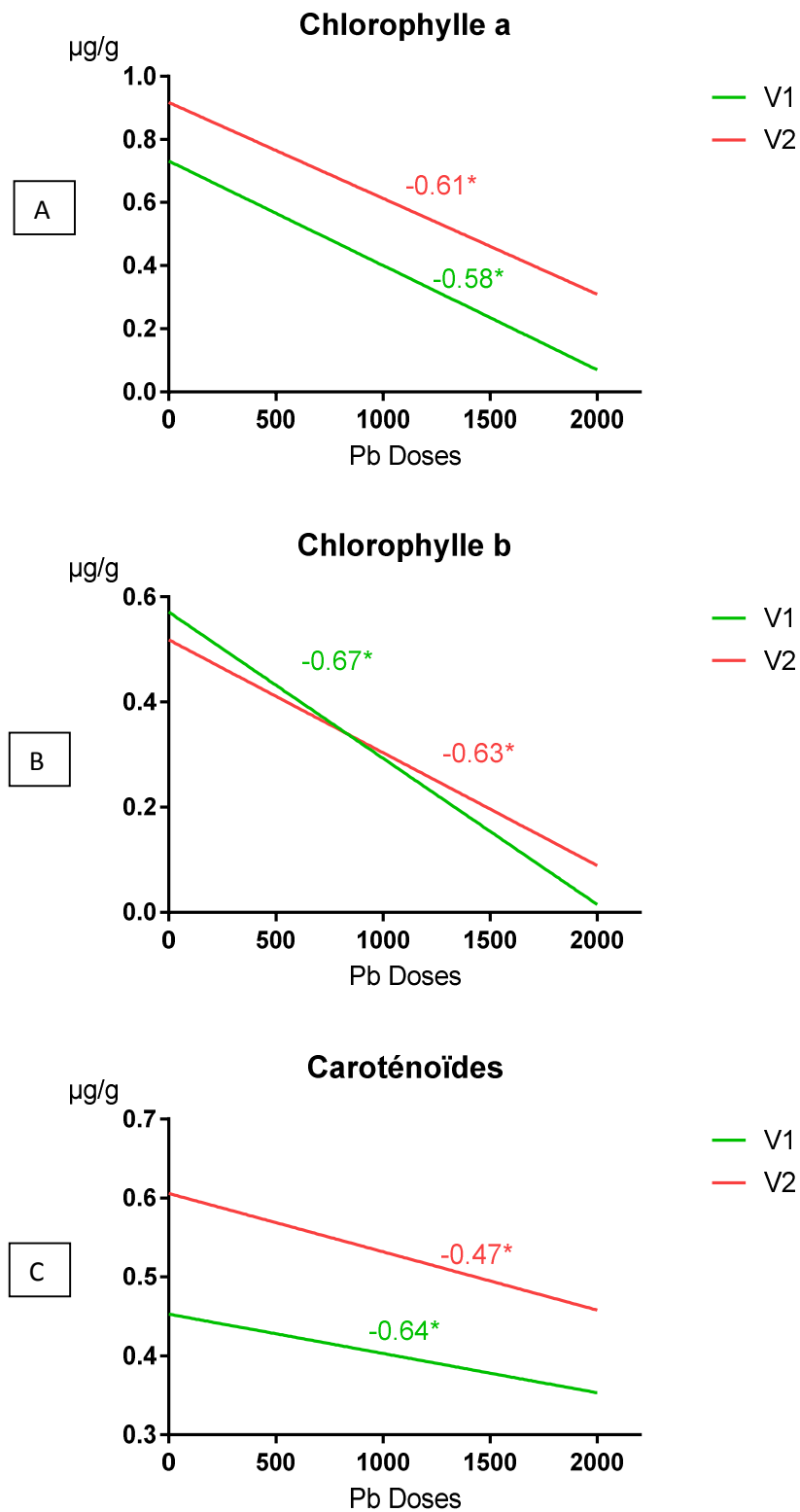


Figure 27 : Régression linéaire de la teneur des pigments chlorophylliens (A : Chlorophylle a ; B : chlorophylle b et C : caroténoïdes) en fonction de la dose du plomb appliquée (en ppm) avec le R^2 (R-square) pour V1 (Sidi Aïch) et V2 (Super Aguadulce).
* : régression significative.

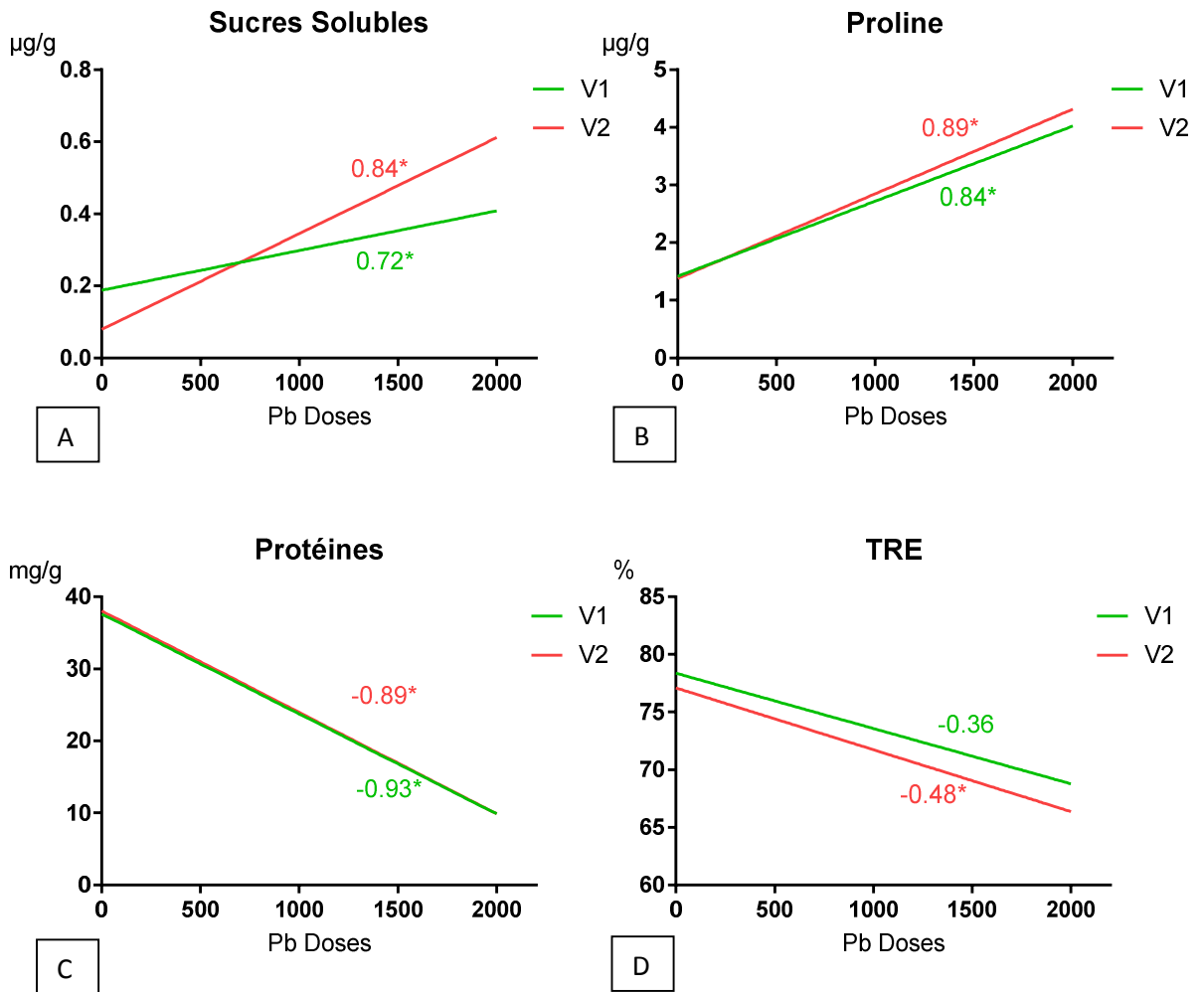


Figure 28 : Régression linière de la teneur en sucres solubles (A), de la teneur en proline (B), de la teneur en protéines (C) et de la Teneur en eau relative (D) en fonction de la dose du plomb appliquée (en ppm) avec le R² (R-square) pour V1 (Sidi Aïch) et V2 (Super Aguadulce).

* : régression significative.

I.3. Accumulation du plomb dans la fève

L'observation des résultats de l'accumulation du plomb dans les plantes (Fig.29) montre que l'augmentation des doses de plomb appliqués dans le substrat s'accompagne par une augmentation significative de la teneur en plomb dans les plantes traitées, cette accumulation atteint son maximum à la dose D6 (2000 ppm) et enregistre plus de 0.6 mg/g pour V1 (Sidi Aïch) et plus de 0.7 mg/g pour V2 (Super Aguadulce), alors qu'à la dose 50 ppm, elle n'est que de 0.056 mg/g et 0.053 mg/g successivement pour la variété Sidi Aïch et la variété Super Aguadulce (Tab.22).

L'analyse de la variance (tab.23) montre que les variations du facteur dose de plomb exercent un effet très hautement significatif ($p < 0.0001$) sur l'accumulation du plomb dans les plantes, l'analyse statistique (tab.23) montre que l'accumulation du plomb n'est pas influencée par le facteur variétal (0.314^{NS}).

L'analyse des résultats du test de la corrélation linéaire (annexe 2) montrer que l'augmentation du plomb dans les plantes est corrélée significativement avec l'augmentation des doses de plomb, cette corrélation se traduit par un coefficient de corrélation significatif et négatif ($r = -0.99^*$) pour les deux variétés (Fig.30).

Tableau 22 : Effet du plomb sur l'accumulation du plomb (mg/g) des deux variétés V1 (Sidi Aïch) et V2 (Super Aguadulce).

Dose de Plomb (ppm)	V1	V2
	Pb (mg/g)	Pb (mg/g)
0	0	0
50	0.056±0.006***	0.053±0.004***
100	0.081±0.005****	0.073±0.011****
200	0.106±0.004****	0.108±0.001****
500	0.221±0.008****	0.242±0.018****
1000	0.352±0.008****	0.361±0.008****
2000	0.676±0.004****	0.748±0.062****

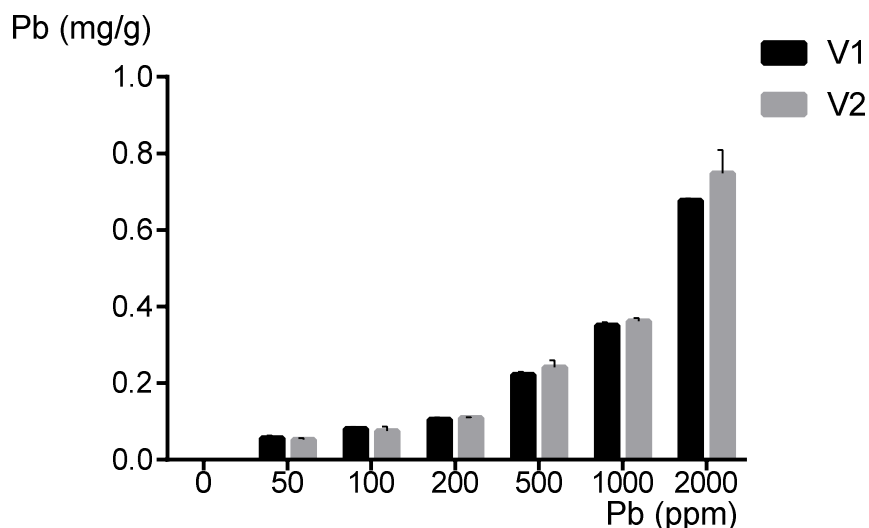


Figure 29 : Evolution de la teneur en plomb accumulé (mg/g) de la fève (V1 : Sidi Aïch et V2 : Super Aguadulce) en fonction de la dose de plomb appliquée (ppm).

Tableau 23 : Analyse de la variance de l'accumulation du plomb dans les plantes.

	Pb
Source de Variation	P value
Facteur dose de plomb (F1)	<0.0001****
Facteur variété (F2)	0.314ns
Interaction: F1 x F2	0.0175*

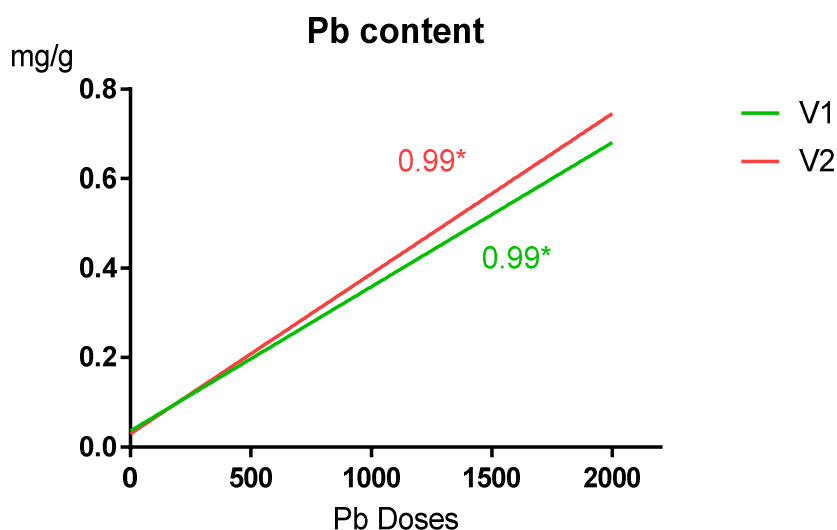


Figure30 : Régression linière de la teneur en plomb dans la plante (mg/g) en fonction de la dose du plomb appliquée (en ppm) avec le R² (R-square) pour V1 (Sidi Aïch) et V2 (Super Aguadulce).

* : régression significative.

I.4. Effet du plomb sur l'activité antioxydante non-enzymatique

I.4.1. Polyphénols (TPC)

Les résultats obtenus (Fig.31) montrent que l'augmentation des doses de plomb dans le substrat de culture provoque une augmentation de la teneur en polyphénols, cette augmentation est très significative à partir de la dose 200 ppm, où elle est de 160% pour V1 (sidi aïch) et de 143% pour V2 (Super Aguadulce) (Tab.24). A la dose 2000 ppm, l'augmentation de la teneur en polyphénols arrive à son maximum et enregistre plus de 328% pour la variété Sidi Aïch et plus de 305% pour la variété Super Aguadulce en comparaison avec les témoins (Tab.24).

Les résultats de l'analyse de la variance (Tab.28) montrent que l'accumulation des polyphénols est très influencée par le facteur dose de plomb ($p < 0.0001^{****}$), cette analyse montre également que le facteur variétal n'a aucun effet sur les fluctuations de ce paramètre ($p = 0.0811^{NS}$).

Tableau 24 : Effet du plomb sur la teneur en polyphénols totaux ($\mu\text{g}/\text{mg}$ MS) des deux variétés V1 (Sidi Aïch) et V2 (Super Aguadulce).

Dose de Plomb (ppm)	V1		V2	
	TPC ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Evolution (%)	TPC ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Evolution %
0	33.500 \pm 7.096	/	37.167 \pm 4.938	/
50	33.108 \pm 5.268 ^{NS}	-1.17	40.908 \pm 7.644 ^{NS}	10.07
100	46.533 \pm 13.190 ^{NS}	38.91	40.604 \pm 8.289 ^{NS}	9.25
200	87.329 \pm 6.218 ^{****}	160.68	90.533 \pm 9.880 ^{****}	143.59
500	100.317 \pm 6.690 ^{****}	199.45	125.833 \pm 10.969 ^{****}	238.57
1000	121.488 \pm 7.142 ^{****}	262.65	135.825 \pm 8.366 ^{****}	265.45
2000	143.475 \pm 6.272 ^{****}	328.28	150.575 \pm 13.531 ^{****}	305.13

Test de Dunnett (NS : non significatif ; **** : très hautement significatif).

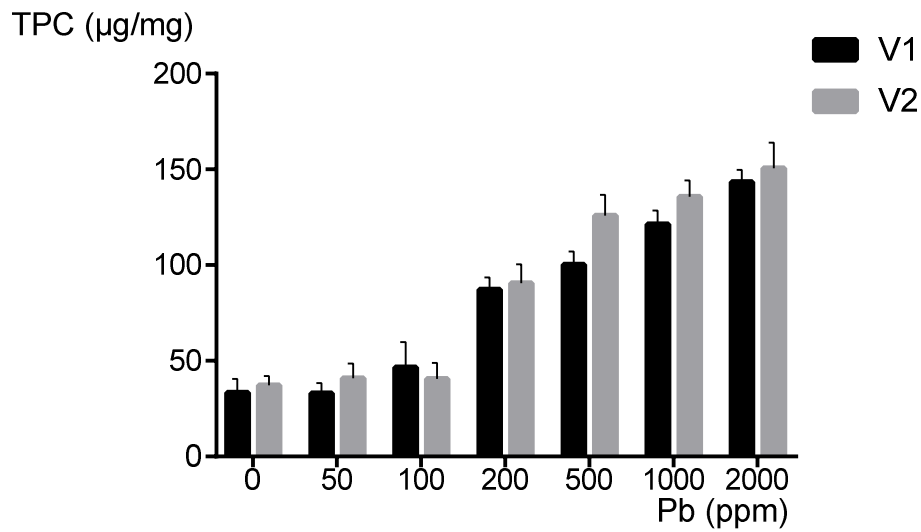


Figure 31 : Evolution de la teneur en polyphénols totaux ($\mu\text{g}/\text{mg}$) de la fève (V1 : Sidi Aïch et V2 : Super Aguadulce) en fonction de la dose de plomb appliquée (ppm).

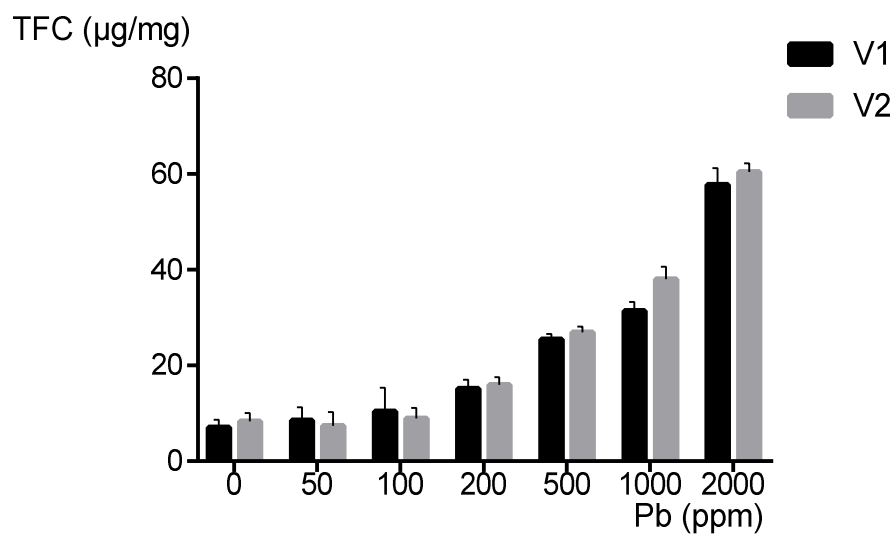


Figure 32 : Evolution de la teneur en flavonoïdes totaux ($\mu\text{g}/\text{mg}$) de la fève (V1 : Sidi Aïch et V2 : Super Aguadulce) en fonction de la dose de plomb appliquée (ppm).

I.4.2. Flavonoïdes (TFC)

L'observation des résultats (Fig.32) montre que l'augmentation de la dose de plomb provoque une augmentation importante de la teneur en flavonoïdes totaux (TFC), cette augmentation est significative à partir de la dose 200 ppm où elle est de 115% pour la variété Sidi Aïch et 91% pour la variété Super Aguadulce en comparaison avec les plantes témoins (Tab.25), au-delà de cette dose les teneurs en TFC augmentent rapidement pour atteindre son maximum à la dose D6 (2000 ppm) avec une progression de plus de 720% et plus de 626% respectivement pour la variété Sidi Aïch et pour la variété Super Aguadulce (Tab.25).

Les résultats de l'analyse de la variance (Tab.28) montrent que les fluctuations des teneurs en flavonoïdes sont très dépendantes du facteur dose de plomb (<0.0001****), l'analyse montre également que ce paramètre est influencé par la variabilité du facteur variété (p = 0.0121*), ainsi la variété Sidi Aïch enregistre des valeurs moyennes faibles (22.222 µg/mg MS) par rapport à celles enregistrées pour la variété Super Aguadulce (23.709µg/mg MS).

Tableau 25 : Effet du plomb sur la teneur en flavonoïdes totaux (µg/mg MS) des deux variétés V1 (Sidi Aïch) et V2 (Super Aguadulce).

Dose de Plomb (ppm)	V1		V2	
	TFC (µg/mg)	Evolution (%)	TFC (µg/mg)	Evolution (%)
0	7.036±1.577	/	8.328±1.679	/
50	8.500±2.704 ^{NS}	20.81	7.387±2.840 ^{NS}	-11.30
100	10.344±5.003 ^{NS}	47.02	8.919±2.170 ^{NS}	7.10
200	15.186±1.874***	115.83	15.950±1.592***	91.51
500	25.406±1.173****	261.07	26.875±1.226****	222.70
1000	31.335±1.914****	345.35	38.040±2.613****	356.75
2000	57.735±3.482****	720.55	60.464±1.775****	626.00

Test de Dunnett (NS : non significatif ; *** : hautement significatif ; **** : très hautement significatif).

I.5. Effet du plomb sur l'activité enzymatique antioxydante

I.5.1. Activité de la Catalase (E.C. 1.11.1.6)

L'évolution de l'activité de la catalase (Fig.33) montre que l'augmentation des doses du plomb dans le milieu occasionne une augmentation de l'activité de cet enzyme, cette progression est très significative au-delà de la dose 500 ppm où elle est de 143% pour les deux variétés testées (Tab.26), cette progression arrive à son maximum à la dose 2000 ppm et inscrit plus de 353% pour V1 (Sidi Aïch) et plus de 235% pour V2 (Super Agudulce) (Tab.26) en comparaison avec les valeurs enregistrées pour les témoins.

L'analyse de la variance (Tab.28) montre que les variations du facteur dose de plomb dans le milieu influent fortement sur les fluctuations de l'activité de la catalase ($<0.0001^{****}$), cette analyse montre également que la catalase est sous l'influence du facteur variétal ($p = 0.0111^*$), avec une valeur moyenne enregistrée pour la variété Sidi Aïch de 0.164 ($\Delta DO_{240}/\text{mg Protéine}$) supérieure à celle enregistrée pour la variété Super Agudulce (0.153 $\Delta DO_{240}/\text{mg Protéine}$).

Tableau 26 : Effet du plomb sur l'activité de la catalase ($\Delta DO_{240}/\text{mg protéine}$) des deux variétés V1 (Sidi Aïch) et V2 (Super Agudulce).

Dose de Plomb (ppm)	V1		V2	
	Activité de CAT ($\Delta DO_{240}/\text{mg protéine}$)	Evolution (%)	Activité de CAT ($\Delta DO_{240}/\text{mg protéine}$)	Evolution (%)
0	0.0784 \pm 0.0007	/	0.082 \pm 0.002	/
50	0.0782 \pm 0.0048 ^{NS}	-0.33	0.086 \pm 0.002 ^{NS}	5.50
100	0.0882 \pm 0.0024 ^{NS}	12.44	0.098 \pm 0.003 ^{NS}	19.81
200	0.0817 \pm 0.0163 ^{NS}	4.16	0.104 \pm 0.007 ^{NS}	26.75
500	0.1908 \pm 0.0132 ^{****}	143.22	0.199 \pm 0.022 ^{****}	143.64
1000	0.2773 \pm 0.0375 ^{****}	253.49	0.227 \pm 0.019 ^{****}	177.98
2000	0.3558 \pm 0.0073 ^{****}	353.55	0.274 \pm 0.023 ^{****}	235.05

Test de Dunnett (NS : non significatif ; **** : très hautement significatif).

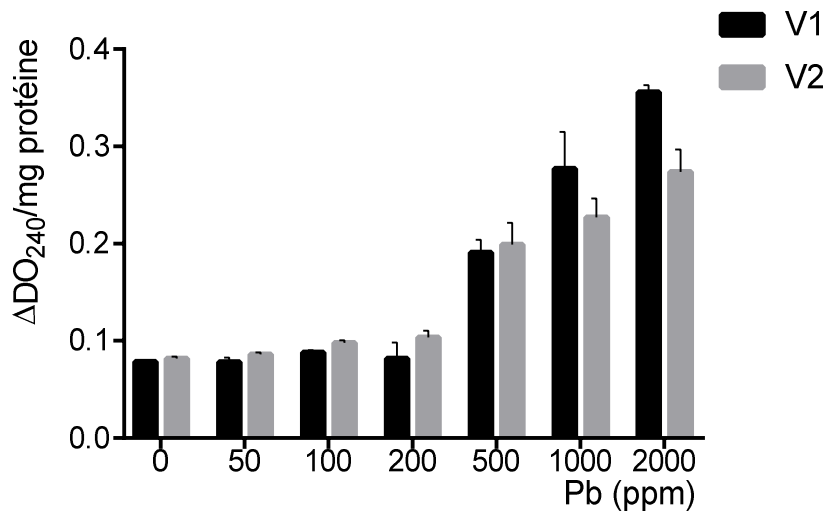


Figure 33 : Evolution de l'activité de la catalase (ΔDO_{240} /mg protéine) de la fève (V1 : Sidi Aïch et V2 : Super Aguadulce) en fonction de la dose de plomb appliquée (ppm).

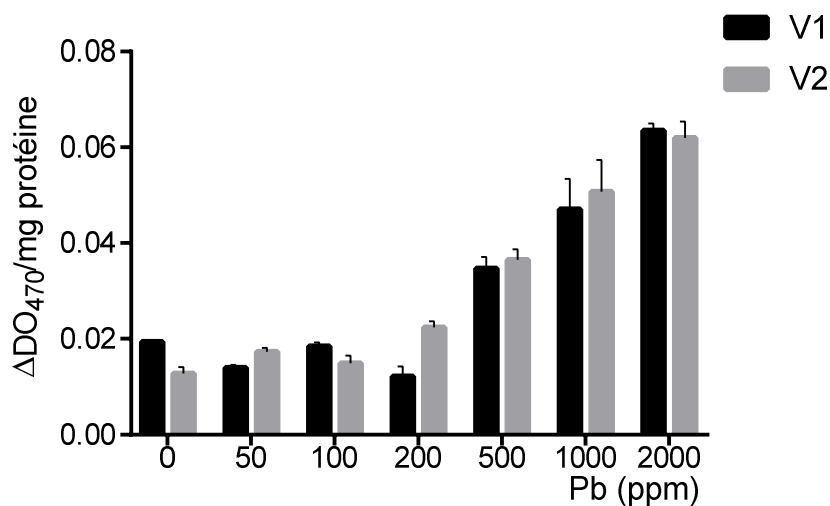


Figure 34 : Evolution de l'activité de la peroxydase (ΔDO_{470} /mg protéine) de la fève (V1 : Sidi Aïch et V2 : Super Aguadulce) en fonction de la dose de plomb appliquée (ppm).

I.5.2. Activité de la Peroxydase (E.C. 1.11.1.7.)

Selon les résultats obtenus (Fig.34), l'activité de la peroxydase augmente considérablement en fonction de l'augmentation de la concentration du Plomb dans le substrat, L'augmentation de l'activité de la peroxydase est significative à partir de la dose 500 ppm où elle est de 79% pour la variété Sidi Aïch et plus de 185% pour la variété Super Aguadulce (Tab.27), arrivant à la dose 2000 ppm cette augmentation atteint son maximum avec plus de 227% pour V1 et plus de 384% pour V2 (Tab.27). Les résultats montrent une réduction de l'activité de la peroxydase pour la variété Sidi Aïch à la suite de l'application des doses inférieures à 200 ppm (plus de 27% à la dose 50 ppm et plus de 37% à la dose 200 ppm) (Tab.27).

L'analyse de la variance (Tab.28) montre que la variation du facteur dose de plomb exerce un effet très hautement significatif ($p < 0.0001$) sur les fluctuations de l'activité de la peroxydase. Ce dernier paramètre est également très influencé ($p = 0.0009^{***}$) par la variabilité variétal (Tab.28), cette variabilité se traduit par des valeurs moyennes enregistrées pour la variété Sidi Aïch ($0.0299 \Delta DO_{470}/\text{mg Protéine}$) plus faibles que celles enregistrées pour la variété Super Agudulce ($0.0310 \Delta DO_{470}/\text{mg Protéine}$). De plus, les résultats ont montré que la Variété.

Tableau 27 : Effet du plomb sur l'activité de la peroxydase ($\Delta DO_{470}/\text{mg protéine}$) des deux variétés V1 (Sidi Aïch) et V2 (Super Aguadulce).

Dose de Plomb (ppm)	V1		V2	
	Activité de GPx ($\Delta DO_{470}/\text{mg protéine}$)	Evolution (%)	Activité de GPx ($\Delta DO_{470}/\text{mg protéine}$)	Evolution %
0	0.0194±0.0003	/	0.013±0.001	/
50	0.0140±0.0006 ^{NS}	-27.83	0.017±0.001 ^{NS}	35.65
100	0.0184±0.0008 ^{NS}	-4.98	0.015±0.002 ^{NS}	16.61
200	0.0122±0.0020 ^{NS}	-37.08	0.022±0.001 ^{NS}	75.86
500	0.0347±0.0024 ^{****}	79.00	0.036±0.002 ^{****}	185.67
1000	0.0471±0.0063 ^{****}	142.90	0.051±0.007 ^{****}	297.37
2000	0.0635±0.0014 ^{****}	227.51	0.062±0.003 ^{****}	384.85

Test de Dunnett (NS : non significatif ; **** : très hautement significatif).

Tableau 28 : analyse de la variance des paramètres de l'activité antioxydante chez la fève.

	Flavonoïdes totaux TFC	Polyphénols totaux TPC	Activité de la Catalase	Activité de la Péroxydase
Source de Variation	P value	P value	P value	P value
Facteur dose de plomb (F1)	<0.0001****	<0.0001****	<0.0001****	<0.0001****
Facteur variété (F2)	0.0121*	0.0811 ^{NS}	0.0009***	0.0111*
Interaction: F1 x F2	0.0615 ^{NS}	0.0244*	<0.0001****	<0.0001****

I.1.6. Corrélation des paramètres de l'activité antioxydante

Les résultats du test de la corrélation linéaire (annexe 2) ont montré les points suivants :

- Une forte corrélation entre l'accumulation des polyphénols et l'augmentation des doses de plomb ajoutées dans le milieu, cette corrélation est significative et positive ($r=0.88^*$ pour la variété Sidi Aïch et $r=0.83^*$ pour la variété Super Agudulce) (Fig.35.A),
- La corrélation est également significative et positive pour les teneurs en flavonoïdes totaux ($r=0.98^*$ pour les deux variétés) (Fig.35.B),
- Une nette augmentation de l'activité de la catalase (CAT) en fonction de l'augmentation des doses de plomb ajoutées (Fig.36.A) avec une corrélation linéaire significative et positive ($r=0.96^*$) pour la variété Sidi Aïch et pour la variété Super Aguadulce ($r=0.92^*$),
- Une augmentation de l'activité de la peroxydase en fonction de l'augmentation des doses appliquées du plomb, cette augmentation s'est traduite par une corrélation linéaire significative et positive ($r=0.95^*$) pour les deux variétés (Fig.36.B).

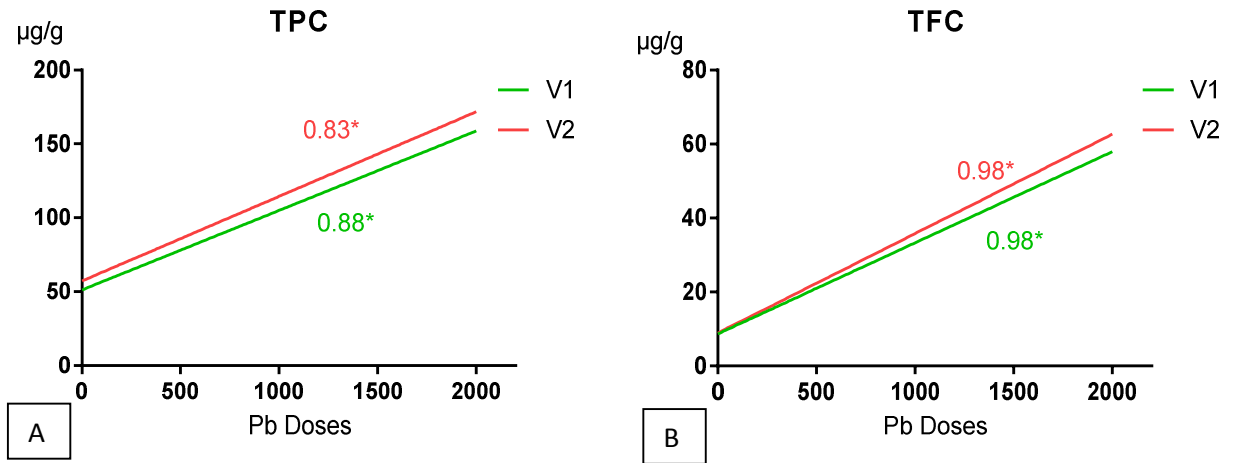


Figure35 : Régression linière de la teneur en polyphénols (A) et en Flavonoïdes (B) (µg/g) en fonction de la dose du plomb appliquée (en ppm) avec le R² (R-square) pour V1 (Sidi Aïch) et V2 (Super Aguadulce).
* : régression significative.

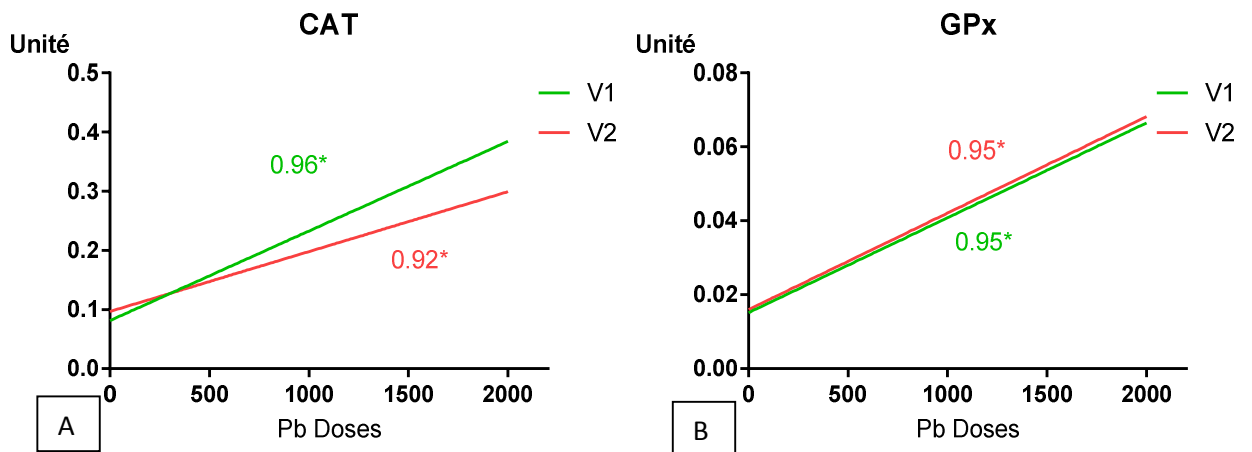


Figure36 : Régression linière de l'activité de la catalase (A) et de la peroxydase (B) (unité) en fonction de la dose du plomb appliquée (en ppm) avec le R² (R-square) pour V1 (Sidi Aïch) et V2 (Super Aguadulce).
* : régression significative.

II. Discussion Générale

1. Paramètres morphologiques

L'ensemble des paramètres morphologiques mesurés est affecté par les variations des doses du plomb appliquées sur les plantes. Les observations des résultats ont montré :

- Une réduction du nombre de folioles par plante, au fur et à mesure que les doses de plomb appliquées augmentent le nombre de folioles diminue, cette diminution atteint son maximum à la dose 2000 ppm (plus de 29% pour la variété Sidi Aïch et plus de 36% pour super Aguadulce),
- L'augmentation de la dose du plomb a provoqué également une réduction de la surface foliaire en fonction de la dose de plomb ajoutée dans le substrat de culture, cette réduction devient significative à partir de la dose 100 ppm,
- La hauteur des tiges a diminué également en fonction de l'intensité du stress au plomb appliqué, cette diminution devient significative à la dose 2000 ppm. L'évolution de la hauteur de la tige sous la contrainte stress au plomb est étroitement liée au critère variétal, ainsi la variété Sidi Aïch semble plus sensible par rapport à la variété Super Aguadulce,
- Le volume racinaire a diminué également sous le stress au plomb, l'augmentation des doses de plomb a provoqué une diminution très significative du volume des racines pour les deux variétés, cette diminution est remarquable à partir de la dose 50 ppm,
- Le poids sec a diminué significativement en fonction de l'augmentation des doses du plomb dans le milieu de culture, la diminution du poids sec a touché les des deux parties de la plante. Pour la partie racinaire, le poids sec a chuté de plus de 75% pour la variété Sidi Aïch et de plus de 78% pour la variété Super Aguadulce. Même constatation est a signalé pour le poids sec des parties aériennes (plus de 64% pour V1 et plus de 68% pour V2). La partie racinaire est la partie la plus touchée par la présence du plomb,

- Les résultats obtenus ont montré une nette diminution de la production de la biomasse des deux variétés (Sidi Aïch et Super Aguadulce) aux différents traitements au plomb.
- L'observation morphologique de la plante a montré une absence de nécroses même avec une concentration de 2000 ppm de plomb.

Les résultats obtenus sont confirmés par ceux trouvés par **Islam et al., (2008)** ; **Kopittke et al., (2007)** ; **Gupta et al., (2010)** qui ont signalés une diminution très importante de la croissance des parties souterraines et aériennes des plantes même à de faibles doses.

Nos résultats sont concordants avec ceux trouvés par **Mroczek-Zdyrska et al., (2017)** qui ont signalé des réductions très significatives ($p < 0.05$) des paramètres morphologiques (la longueur des racines, le poids frais et sec des racines, le nombre des feuilles et la longueur et la largeur des feuilles) de *Vicia faba* traité par 50 μ M de Pb.

Islam et al., (2008) ont signalé une réduction du poids frais jusqu'à plus de 50%, et jusqu'à 10% de réduction de la hauteur de la tige, et plus 15% de la surface foliaire par rapport au témoin, avec une inhibition significative du développement du végétal. La croissance des racines est davantage influencée par la toxicité du Pb (**Zhou et al., 2016**). La présence du plomb affecte également la longueur racinaire (plus de 40% de réduction) et le poids frais de la fève (**Mroczek-Zdyrska et Wójcik, 2012**).

L'inhibition de la croissance des plantes pourrait provenir de la perturbation de la division cellulaire (**Rucińska et al., 1999** ; **Kozhevnikova et al., 2009**). Les études menées sur la toxicité du plomb suggèrent que le plomb fixé sur les acides nucléiques cause l'agrégation et la condensation de la chromatine et stabilisant l'équilibre du double brin de l'ADN induisant par la suite l'inhibition du processus de la réplication, transcription et inévitablement celui de la division cellulaire (**Johnson, 1998** ; **Ruley et al., 2006**). La diminution de la division cellulaire est associée à divers mécanismes, notamment le changement de la plasticité de la paroi cellulaire, l'inhibition du développement des microtubules et de la synthèse de l'ADN, les aberrations chromosomiques induites par le plomb, l'expansion du cycle mitotique et la réduction du pool de glutathion (**Seregin et Ivanov, 2001**).

2. Paramètres physiologiques

2.1. Teneur Relative en Eau (TRE)

La teneur en eau des organes représente un excellent indicateur physiologique pour estimer l'état d'hydratation des plantes face aux contraintes abiotiques. L'effet du plomb se traduit par une action dépressive sur les teneurs en eau des feuilles, ces valeurs sont affectées par l'augmentation des doses du plomb dans le milieu, et elles restent en générale inférieures à celles enregistrée pour le témoin.

Les résultats enregistrés ont montré une réduction des teneurs en eau relative au fur et à mesure que les doses de plomb augmentent, ces réductions sont très affectées par la présence du plomb et elles deviennent très significatives à partir de la dose 200 ppm. Les résultats présentés ont montré également que les valeurs moyennes enregistrées pour la variété Sidi Aïch sont sensiblement supérieures à celles enregistrées par la variété Super Aguadulce (75.74% contre 74.15%).

Les plantes exposées au plomb subissent une modification de leurs statut hydrique, ce qui entraîne une réduction de la turgescence (**Ramasamy et al., 2011 ; Pinho et Ladeiro, 2012 ; Rucińska-Sobkowiak et al., 2013**). L'exposition au plomb réduit la plasticité de la parois cellulaires (**Pourrut et al., 2011**), et contribue à la perte de la turgescence des cellules de gardes (**Brunet et al., 2008 ; Pinho et Ladeiro, 2012**) et la fermeture des stomates (**Zulfiqar et al., 2019**). La fermeture des stomates est sous le contrôle de l'effet des phytohormones en particulier l'Acide Abscissiques (ABA) (**Roelfsema et Hedrich, 2005**). De même, il pourrait être due à la morphologie des stomates (de nombre réduit et de petites tailles) (**Weryszko-Chmielewska et Chwil, 2005**) et aussi à la réduction de la surface foliaire (**Elzbieta et Mirosława, 2005 ; Weryszko-Chmielewska et Chwil, 2005**) ce qui réduit leurs rendements, et influe fortement sur divers processus tels que la photosynthèse (**Cecchi, 2008**).

Les perturbations du statut hydrique des plantes exposées aux différentes concentrations du plomb sont signalées dans diverses cultures (**Sharma et Dubey, 2005**). Sur le tournesol (*Helianthus annuus* L.), **Kastori et al., (2008)** ont révélé une réduction de la transpiration et de la TRE avec une synthèse intense de la proline pour faire face au stress hydrique induit par la présence du plomb. Dans le cas du blé, l'exposition au plomb Pb a occasionné une réduction de la teneur relative en eau et une augmentation

de la concentration de la ABA (**Alsokari et Aldesuquy, 2011**). La réduction de la TRE est attribuée à la réduction de la surface foliaire chez les plantes de *Glycine max* L. (**Elzbieta et Mirosława, 2005**). Sur la fève les travaux de **Pourrut (2008)** ont montré une réduction de la TRE en présence du plomb, ce qui limite les pertes en eau de la plante par transpiration, cette limitation de la transpiration est à la source de réduire la translocation du plomb des racines vers les parties aériennes (**Wang et al., 2013**).

2.2. Pigments photosynthétiques (Chlorophylles)

Les résultats obtenus ont montré une diminution des teneurs en pigments chlorophylliens des deux variétés testées en fonction de la dose de plomb présente dans le milieu. Ces résultats ont montré :

- Une diminution de la teneur en chlorophylle **a** au fur et à mesure que la dose de plomb appliquée augmente, cette diminution est très significative à partir de la dose 50 ppm. La diminution de la chlorophylle **a** est également sous la dépendance de la variabilité variétale, les valeurs de la chlorophylle **a** enregistrées pour la variété Sidi Aïch sont nettement plus faibles que celles enregistrées pour la variété Super Aguadulce,
- La chlorophylle **b** a enregistré également une régression très significative en fonction de l'augmentation de la dose du plomb appliquée dans le substrat, les diminutions de la teneur en chlorophylle **b** sont très importantes à partir de la dose 50 ppm,
- Une diminution très peu significative de la teneur en caroténoïdes en fonction de l'augmentation des doses appliquées de plomb, cette diminution demeure faible jusqu'à la dose 1000 ppm, au-delà, elle devient importante. Les diminutions ressenties de la teneur en caroténoïdes sont influencées par le critère variétal, la variété Sidi Aïch a enregistré des teneurs nettement plus faibles que celles enregistrées par la variété Super Aguadulce.

Nos résultats sont conformes avec ceux obtenus par plusieurs auteurs **Singh et al., (2010)** ; **Cenkci et al., (2010)** qui ont montré des perturbations de la photosynthèse dues à la phytotoxicité du plomb. L'inhibition de la photosynthèse et la réduction du rendement photosynthétique ont été observé en présence du stress au plomb par plusieurs auteurs

(Xiong *et al.*, 2006; Hu *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2008; Piotrowska *et al.*, 2009; Singh *et al.*, 2010; Cenkci *et al.*, 2010 ; Azooz *et al.*, 2011). Les diminutions des teneurs en pigments chlorophylliens observées dans cette étude, ont été signalé par plusieurs travaux réalisés sur la fève (Hedaya, 2008 ; Pourrut, 2008 ; Wang *et al.*, 2010), ou sur d'autres espèces (Gajic *et al.*, 2009, Ashraf *et al.*, 2017).

Conformément à nos résultats, la diminution du taux du chlorophylle **a** atteint +77% (à la dose de 40 mg/L après 30 jour de traitement) par-apport au témoin chez *Lemna polyrrhiza* L. (John *et al.*, 2008). Ashraf *et al.*, (2017) ont montré que le stress au Pb inhibe significativement ($p < 0.05$) les pigments photosynthétiques (Chloro **a** , **b**, **a+b** et caroténoïdes) chez les plants du riz (+ 87% de réduction à la dose 1200 ppm). Chez *Triticum aestivum*, la présence du plomb à différentes doses (1-4 mM) dans le milieu de culture, a occasionné des réductions très notables des pigments photosynthétiques (Yang *et al.*, 2011b).

La perturbation de l'activités photosynthétique des plantes exposées au stress au plomb est la résultante de plusieurs effets indirects induits par la présence du Pb, ces effets peuvent être :

1. La mutilation de l'ultrastructure des chloroplastes (Elzbieta et Mirosława 2005 ; Sharma et Dubey, 2005 ; Islam *et al.*, 2007) ;
2. La réduction de l'activité de l'acide δ -aminolévulinique déshydratase (ALAD) et la ferrédoxine NADP⁺ réductase, (Gupta *et al.*, 2009 ; Cenkci *et al.*, 2010) et la protochlorophyllide reductase (Van Assche et Clijsters 1990), impliquées dans la biosynthèse de la chlorophylle ;
3. L'inhibition des productions de caroténoïdes et de plastoquinones (Cenkci *et al.*, 2010) ;
4. La diminution de la concentration de dioxyde de carbone due à la fermeture des stomates (Romanowska *et al.*, 2006 ; Chen *et al.*, 2017) ;
5. La réduction de l'absorption des métaux essentiels (Mg, Mn et Fe) (Chatterjee *et al.*, 2004 ; Gopal et Rizvi 2008), et le remplacement des ions Mg²⁺ associés à l'anneau tétrapyrrole de la molécule de chlorophylle (John *et al.*, 2008) ;
6. La perturbation de l'ultrastructure du grana (Zheng *et al.*, 2012) et du chloroplaste (Qiao *et al.*, 2013) provoquant l'inhibition du transport des électrons (Murkowski et Skórska, 2008) et l'altération des centres de production d'oxygène (Meitei *et al.*, 2014).
7. Et la suractivation de la chlorophyllase dans les feuilles (Liu *et al.*, 2008 ; Jayasri et Suthindhiran 2017).

2.3. Sucres Solubles

Les résultats trouvés ont montré que l'accumulation des sucres solubles augmente au fur et à mesure avec les doses croissantes du plomb (500, 1000 et 2000 ppm). Ces résultats sont identiques avec ceux obtenus par **Govindjee, (1976), Gawęda, (2007) et Sofi et al., (2014)** qui ont signalé que l'accumulation des sucres est très affectée par la contamination par le plomb. Les changements des taux des sucres solubles dans les tissus des plantes qui évoluent dans des environnements pollués par le plomb ne sont pas déterminés avec certitude (**Gawęda, 2007**). Certains auteurs (**Huang et al., 1974 ; Soheir et al., 2002 ; John et al., 2008**) ont détecté une diminution des sucres solubles, d'autres (**Azouz et al., 2011 ; Ashraf et al., 2017**) ont signalé au contraire une augmentation des sucres solubles en fonction de l'intensité du stress au Pb appliqué.

Les sucres solubles peuvent jouer un rôle dans la protection des chlorophylles et des caroténoïdes contre l'agressivité du stress métallique (**Azouz et al., 2011**). **Verma et Dubey (2001)** et **Gawęda (2007)** remettent cette accumulation à une adaptation très possible de la plante pour ajuster et maintenir un potentiel osmotique favorable. Ces hypothèses expliquent les résultats obtenus dans cette étude et qui démontrent que l'application du plomb s'accompagne d'une nette accumulation des sucres solubles.

2.4. Protéines

Les résultats ont montré que l'application de doses croissantes de plomb dans le milieu s'accompagne par une réduction de la teneur en protéines des feuilles de la fève. Cette réduction est très significative même en présence de faibles doses et elle arrive à plus de 66% (pour les deux variété) à la dose 2000 ppm.

En présence de forte concentration en plomb le pool protéique diminue fortement (**Mishra et al., 2006b ; Garcia et al., 2006 ; Piotrowska et al., 2009 ; Shu et al., 2012 ; Sofi et al., 2014**). Dans la présente étude, le plomb présent dans le milieu de culture est accompagné par une réduction de la composition protéinique des feuilles des deux variétés testées. Cela est en accordance avec les travaux antérieurs (**Mishra et al., 2006b ; Garcia et al., 2006 ; Piotrowska et al., 2009**).

L'action du plomb sur la concentration totale en protéine n'est pas claire, bien que de fortes concentrations puissent diminuer le pool protéique (**Mishra et al., 2006b ; Garcia et al., 2006 ; Piotrowska et al., 2009**). La diminution de la teneur en protéines est

due peut être à la modification de l'expression génique (Kovalchuk *et al.*, 2005, Pourrut *et al.*, 2011) et à l'augmentation de l'activité ribonucléasique (Gopal et Rizvi, 2008); à la peroxydation lipidique et à la fragmentation des protéines (Nas et Ali, 2018) sous l'action des ROS (John *et al.*, 2008, Azooz *et al.*, 2011) suite à stimulation de l'activité du protéase (Sharma et Dubey, 2005 ; Gupta *et al.*, 2009); et aussi , et aussi à la diminution de la teneur en acides aminés libres (Xiong *et al.*, 2006 ; Gupta *et al.*, 2009), corrélée à une forte perturbation du métabolisme de l'azote (Chatterjee *et al.*, 2004). Cependant, on constate une augmentation de la concentration de certains acides aminés comme la proline en présence de plomb (Qureshi *et al.*, 2007; Hedaya, 2008; Wang *et al.*, 2010).

Outre une modification quantitative, le plomb agit sur la composition qualitative des protéines cellulaires. Il modifie le profil protéique des cellules racinaires de fèves exposées au plomb (Beltagi, 2005), ce qui peut être corrélé avec la modification du profil du transcriptome (Kovalchuk *et al.*, 2005). Les ions Pb^{2+} influencent également fortement les activités de nombreuses enzymes intervenant dans différents processus métaboliques. Cette forte interactivité avec les enzymes de la plante est une des causes majeures de la toxicité de ce métal (Kovalchuk *et al.*, 2005).

2.5. Proline

Pour la proline, les résultats ont montré une augmentation relative des teneurs de la proline en fonction de l'accroissement des doses de plomb appliquées dans le substrat. L'augmentation de la teneur en proline en fonction d'accroissement des doses appliquées est significative qu'au-delà de la dose 500 ppm et elle devient très importante à la dose 2000 ppm.

La proline est parmi les acides aminés les plus présents au niveau des cellules dans les conditions de stress, il joue un rôle dans la tolérance des plantes à la contamination par les métaux lourds, notamment le plomb (John *et al.*, 2008 ; Shahid, 2010 ; Azooz *et al.*, 2011 ; Rucińska-Sobkowiak *et al.*, 2013). L'accumulation de la proline est signalée en présence de fortes doses de plomb sur la fève (Qureshi *et al.*, 2007 ; Hedaya, 2008 ; Nadgórska-Socha *et al.*, 2013), ou sur d'autres espèces (John, *et al.*, 2008 ; Jiang Wang *et al.*, 2010 ; Azooz *et al.*, 2011).

En accord avec nos résultats, les travaux de Nadgórska-Socha *et al.*, (2013) réalisés sur les plantes de la fève ont montré une augmentation significative de la teneur de

la proline dans les feuilles des plantes exposées au plomb. Cette augmentation atteint plus de 134% chez les plantes de fèves exposées à 4.8mM de nitrate de plomb (Hedaya, 2008). Chez *Glycine max* exposées aux chlorures de plomb à 50, 100 et 150 μ M, l'augmentation de la teneur en proline atteint plus 600% (Sofi *et al.*, 2014). La présence du Pb a occasionné une augmentation significative de la teneur en proline de plus de 120% chez les plantes de blé (*Triticum aestivum*) exposées à 4 mM de nitrate de plomb (Yang *et al.*, 2010), et plus de 120 % chez les plantes de riz exposées à 1200 ppm (Ashraf *et al.*, 2017)

Pour maintenir le statut hydrique, la plante secrète massivement les osmolytes en particulier la proline (Qureshi *et al.*, 2007 ; Azooz *et al.*, 2011). Selon Hedaya (2008) cet acide aminé semble jouer un rôle important dans l'ajustement osmotique, de plus, il est considéré comme un stabilisateur de macromolécules (Parys *et al.*, 2014), un chélateur de métaux grâce aux groupements thiol (-SH) et un protecteur de la structure subcellulaire (Azooz *et al.*, 2011). L'accumulation de la proline dans les tissus est peut-être due à une protéolyse (Pourrut, 2008 ; Azooz *et al.*, 2011) induite par la présence d'Espèces Réactives de l'Oxygène (ERO) résultantes de la présence de plomb (Sharma et Dubey, 2005, Wong *et al.*, 2008).

3. Accumulation du plomb dans la plante

Les résultats ont montré une augmentation de la teneur en plomb en fonction de l'augmentation de la dose du plomb appliquée, cette augmentation est proportionnelle à l'intensité du stress au plomb imposé.

Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par Hedaya *et al.*, (2008) qui montrent que le taux de plomb dans la plante augmente en fonction de la concentration du plomb dans le milieu. Les travaux de Nadgórska-Socha *et al.*, (2013) réalisés sur la fève ont montré une corrélation très significative entre la présence du plomb dans le sol et sa contenance dans les organes de la plante, $r=0.99$ dans la tige, et $r=0.97$ dans les feuilles. L'accumulation du plomb dans les feuilles de la fève est signalée également par Wang *et al.*, (2007) avec une corrélation $r=0.97$, ce qui est en accord avec nos résultats.

Le prélèvement du plomb par les plants est un problème très sérieux, il a été prouvé que les plantes peuvent l'absorber et l'accumuler surtout dans les racines (Garg et Aggarwal 2011; Mroczek-Zdyrska et Wójcik 2012). Contrairement aux autres métaux (Mn, Cd et Cu) le plomb est localisé en grande partie dans les racines (Probst *et al.*, 2009 ; Ashraf *et al.*, 2017), et une petite fraction est transférée à la partie aérienne (wang *et al.*, 2007).

4. Système anti-oxydant

4.1. Polyphénols et Flavonoïdes (TPC et TFC)

Les résultats ont montré que l'accumulation des polyphénols et les flavonoïdes est très corrélée avec l'augmentation des doses ajoutées du plomb. L'augmentation de la teneur des polyphénols totaux reste très peu sensible à l'application des faibles doses (50 et 100 ppm), au-delà, elle devient très importante au fur et à mesure que les doses de plomb augmentent. L'augmentation des doses de plomb dans le milieu a occasionné également une accumulation du contenu en flavonoïdes, cette accumulation est très importante au-delà de la dose 200 ppm. L'accumulation du contenu en flavonoïdes est conditionnée aussi par la variabilité variétale, ainsi la variété Sidi Aiche accumule moins de flavonoïdes que la variété Super Aguadulce. En revanche, l'accumulation des polyphénols n'est pas influencée par l'effet variétal.

Les résultats obtenus ont montré des teneurs croissantes en flavonoïdes et polyphénols, au fur et à mesure que les doses appliquées du plomb augmentent, ces mêmes résultats sont reportés par **Sobrinho et al., (2010)** qui ont signalé une augmentation de plus de 18.2% de TPC chez *Lemna gibba* traitée par 300mg/l de plomb. **Izbianska et al., (2014)** ont constaté que le traitement du lupin jaune avec du plomb à une concentration de 150 mg/l augmente la teneur totale en flavonoïdes à 67 % dans les cotylédons par rapport à la racine, qui passe à 54 % de la teneur totale en flavonoïdes. Une augmentation très significative de TFC chez *Fagopyrum esculentum* exposée à 0.01mM et 1 mM de Nitrate de Pb a été signalé également par **Horbowicz et al., (2013)**. Sur le blé exposé aux concentrations de Pb (0 300, 600, 900 ppm), les concentrations en TPC arrivent à plus de 17.9% (900 ppm) et plus de 17.5% pour les TFC (900 ppm) (**Pazoki, 2015**). L'augmentation des TFC a été constaté en présence de Ni et de Cd (**Kováčik et al., 2011**) et du cuivre (**Posmyk et al., 2009 ; Baskar et al., 2018**), et également en présence du fer (**Baskar et al., 2018**).

En général, le plomb a provoqué une augmentation significative des quantités totales de phénols et de flavonoïdes (**Kaimoyo et al., 2008**). Toute fois certains auteurs ont signalé une réduction de la concentration de TPC en présence de plomb (**Abdellatif et Ibrahim, 2017**).

Les conditions défavorables du milieu entraînent la production et l'accumulation de divers espèces réactive d'oxygène (ERO), les plantes combattent ces produits par

l'élaboration du système antioxydant (**Baskar et al., 2018**). Ce système antioxydant produit par les plantes lors de l'exposition au plomb fait appelle à plusieurs substances y-compris les composés phénoliques, les glutathions et les acides organiques (**Michalak 2006 ; Gill et Tuteja 2010 ; Sharma et al., 2012**). Les polyphénols sont des composés aromatiques à noyau benzénique avec un ou plusieurs groupes hydroxyles, fabriqués par les plantes principalement pour la protection contre le stress (**Pazoki, 2015**). Les phénols, en particulier les flavonoïdes, peuvent être oxydés par la peroxydase, et agissent dans le système de piégeage du H₂O₂, contre la contamination par les métaux lourds (**Michalak, 2006**).

Les composés phénoliques peuvent agir comme des chélateurs de métaux lourds afin de diminuer le stress chez la plante et d'autre part, les composés phénoliques peuvent éliminer directement les espèces réactives d'oxygène (ERO) (**Pazoki, 2015**). Dans le cas de la contamination par le plomb, les acides phénoliques pourraient améliorer l'accumulation de ce métal par chélation, par l'absorption ou par coagulation (**Kuppusamy et al., 2015**), en facilitant également l'accumulation du plomb dans les glandes épidermiques du nénuphar (**Lavid et al., 2001 ; Wiszniewska et al., 2017**).

4.2. Catalase et Peroxydase

Les résultats des paramètres enzymatiques enregistrées, ont dévoilé une augmentation de l'activité de la catalase et de la peroxydase proportionnellement avec les doses appliquées du plomb. Les résultats ont montré :

- Une nette augmentation de l'activité de la catalase (CAT) en fonction de la dose ajoutée du plomb, toutefois, l'augmentation de l'activité de cette enzyme est très importante à partir de la dose 500 ppm,
- Pour la peroxydase (GPx), les résultats ont montré également une augmentation de son activité à la suite de l'augmentation des doses appliquées du plomb, néanmoins cette augmentation n'est pas significative jusqu'à la dose 500 ppm, au-delà de cette dose, l'augmentation de l'activité de la peroxydase devient significative,
- L'évolution de l'activité enzymatique de la catalase et de la peroxydase reste conditionnée également par le critère variétal. Ainsi pour la catalase, la variété Sidi Aïch a enregistré des valeurs plus grandes de l'activité de cette enzyme comparativement à la variété Super Aguadulce,

- Pour la peroxydase, les valeurs enregistrées pour la variété Super Aguadulce sont plus grandes que celles enregistrées pour la variété Sidi Aïch.

Ces résultats sont en accord avec les résultats obtenus par **Islam *et al.*, (2008)** et par **Singh *et al.*, 2010**, ces auteurs ont montré que l'activité des enzymes antioxydantes augmente en fonction du l'ampleur du stress au plomb, de la durée de l'exposition et aussi de l'espèce végétale concernée.

En situation de stress, les plantes développent des systèmes enzymatiques antioxydants (**Dalyan *et al.*, 2020**). Ces systèmes antioxydants enzymatiques comprennent plusieurs enzymes, entre-autre, la catalase (CAT), les peroxydases (POD), le gaïacol peroxydase (GPx) et l'ascorbate peroxydase (APx) (**Hattab *et al.*, 2016 ; Alamri *et al.*, 2018 ; Khan *et al.*, 2018b**).

Nos résultats sont concordants avec les travaux de **Mroczek-Zdyrska *et al.*, (2017)** qui ont montré que la présence du plomb dans le milieu de culture se traduit par l'augmentation de l'activité enzymatiques de la CAT et de la GPx chez les plantes de la fève. L'augmentation de l'activité de la CAT et de la GPx est corrélée significativement avec l'augmentation de la dose de plomb appliquée sur les plants d'*Allium cepa* et de *Vicia faba* (**Arya *et al.*, 2013**). **Nadgórska-Socha *et al.*, (2013)** ont montré également que l'activité de la CAT et GPX sous la présence de plomb est très importantes dans les racines que dans les feuilles de la fève. Selon **Wang *et al.*, (2010)**, l'augmentation de l'activité de la APx et GPx pourraient être utilisées comme un outil de défense pour dégrader le H₂O₂ généré en présence des fortes concentrations de Pb pour les plantes de *Vicia faba*.

Dans d'autres études, il a été révélé que les différents niveaux de Pb provoquaient une augmentation plus importante dans les activités de la CAT et de la APX dans les racines de *Sedum alfredii* (**Huang *et al.*, 2012**). Chez les cultivars d'*Arachis hypogaea* L., les enzymes antioxydantes APX et GPX ont montré une augmentation sous le stress au Pb (**Nareshkumar *et al.*, 2015**). Chez les plantes de riz l'augmentation a atteint plus de 32% pour la CAT et plus 59% pour POD (à la dose 1200 ppm) (**Ashraf *et al.*, 2017**).

Le changement des activités des enzymes antioxydantes a été observée également chez *Acalypha indica* exposés au plomb (100-500 mg/L) en culture hydroponique (**Venkatachalam *et al.*, 2017**). Cette étude a révélé que les plantes traitées au Pb amélioreraient considérablement les activités CAT, APX et GPX, ce qui diminuait la phytotoxicité induite par le plomb (**Venkatachalam *et al.*, 2017**). **Dalyan *et al.*, (2018)**

ont montré également que la toxicité du Pb (à 2 mM) stimule l'augmentation des activités enzymatiques de la CAT et de la POD, dans les racines de *Brassica juncea*. Les résultats de **Gupta et al., (2009)** sur le maïs exposé aux différentes concentrations de Pb (0-200 μ M) ont montré que les enzymes antioxydantes telles que la CAT, atténuaient le stress au Pb, qui augmentait linéairement avec l'augmentation des concentrations de Pb et du temps de l'exposition.

Conclusion Générale

Conclusion Générale

La présente étude a montré que les accumulations croissantes du plomb dans le substrat sol engendre des effets délétères sur la fève, ces effets s'expliquent par le fait que le stress au plomb occasionne des réactions internes qui sont à l'origine de multiples perturbations d'ordre biométriques, physiologiques et enzymatiques. Le travail entrepris a révélé :

Sur le plan morphologique,

- Les résultats ont montré que le stress au plomb occasionne une réduction notable des indicateurs morphologiques et biométriques des plantes soumises, cette réduction est toujours liée à l'intensité du stress, à la durée d'exposition et au modèle végétal utilisé,
- Le plomb même à faibles concentrations est source de multiples perturbations sur le comportement général de la fève,
- La réduction de la production de la biomasse engendre un ralentissement de la croissance végétative, cela est l'un des principaux effets engendrés par la contamination due au plomb,
- Les résultats obtenus indiquent que les grandeurs de l'ensemble des paramètres morphologiques testés se trouvent diminués sous l'application croissante du plomb. Ces diminutions concernent le nombre des folioles (13 à 36%), la surface foliaire (3 à 54%), la hauteur de la tige (3 à 27%) et le volume racinaire (24 à 85%), Le système racinaire reste le plus touché par les doses appliquées du plomb, cela est très notable sur le poids sec avec des réductions plus importantes pour la partie racinaire (9 à 78%) que pour les parties aériennes (26 à 68%).

Sur le plan physiologique,

- Les effets du plomb sur les paramètres physiologiques étudiés restent tributaires de la nature des paramètres en question, en général les doses appliquées du plomb sont à la source des perturbations majeures qui se manifestent par des réductions notables des paramètres testés,
- L'activité photosynthétique est fortement touchée, les résultats indiquent que la contamination au plomb, induit une réduction de l'activité photosynthétique

Conclusion Générale

- des plantes. Ceci se confirme par une nette diminution des teneurs en pigments assimilateurs des organes responsables de la photosynthèse, la chlorophylle **a** (6 à 81%), la chlorophylle **b** (24 à 82%) et les caroténoïdes (3 à 26%),
- L'application du plomb s'accompagne également, d'une réduction de la teneur relative en eau. Les réactions des deux variétés testées pour l'élaboration de ce paramètre confirment cette diminution, avec une régression plus importante pour la variété Super Aguadulce (jusqu'à 20%) contre la variété Sidi Aïch (19%).
 - Le suivi du comportement des plantes sous le stress au plomb a permis de déterminer une diminution des taux des protéines pour les deux variétés en fonction des doses appliquées, ces diminutions du contenu protéique atteignent plus de 66% à la dose de 2000 ppm de plomb,
 - Sous l'action du stress au plomb les plantes accumulent davantage de la proline, les teneurs de cet acide aminé augmentent en fonction des doses appliquées de plomb, les augmentations atteignent plus de 200% à la dose 2000 ppm,
 - La synthèse des sucres solubles est affectée par le stress au plomb, les teneurs de sucres augmentent au fur et à mesure avec les doses croissantes du plomb, elles atteignent son maximum à la dose 2000 ppm.

Sur le plan anti-oxydatif

- L'augmentation des concentrations croissantes en plomb a engendré l'activation du système antioxydant enzymatique et non enzymatique que peut être ressenti par la surproduction des polyphénols et des flavonoïdes d'une part et par la suractivation des enzymes catalases et peroxydases d'autre part.
- L'accumulation des polyphénols et les flavonoïdes devient plus importante avec l'application des doses fortes en plomb,
- Ces métabolites témoignent de l'agressivité du stress.
- Une accumulation très importante des TPC (+300%) et TFC (700%) dans la plante sous les conditions du stress.

Conclusion Générale

- Une sur activation des enzymes (CAT et POX) impliquées dans la neutralité des radicaux libres oxydants (ERO), par une augmentation qui peut atteindre plus de 300% pour la Catalase et pour la Péroxydase.

Sur le plan accumulation du plomb dans la fève

- Une accumulation significative du plomb dans les plantes stressées en fonction de l'augmentation des doses appliquées du plomb.

L'exposition des deux variétés de la fève au plomb a permis de constater une différence très distincte dans la réponse de ces variétés au stress imposé. Ces différences peuvent être résumées comme suit :

- **Sur le plan morphologique**

Pour le nombre de folioles, la hauteur de la tige et le volume racinaire la variété Super Aguadulce a enregistré des valeurs supérieures à celles enregistrées pour la variété Sidi Aïch, et a été moins sensible que la variété Sidi Aïch à l'action du plomb. Les réactions exprimées par ces deux variétés pour le poids sec et la surface foliaire, sont similaires.

- **Sur le plan physiologique**

La variété Super Aguadulce a donné des valeurs supérieures que la variété Sidi Aïch pour la Chlorophylle **a**, les Caroténoïdes, les sucres solubles et légèrement pour la proline. Pour la teneur en eau relative et la chlorophylle **b**, la variété Sidi Aïch a représenté des valeurs supérieures comparativement à la variété Super Agudulce.

- **Sur le plan anti-oxydant**

Pour la synthèse des métabolites secondaires (polyphénols totaux et flavonoïdes totaux) et l'activité de la peroxydase, la réponse des deux variétés de la fève au plomb est similaire avec une légère augmentation pour la variété Super Aguadulce. Pour la Catalase, la variété Sidi Aïch a montré une augmentation par rapport la variété Super Aguadulce, pour la peroxydase la variété Sidi Aïch a présenté des réductions non significatives à la suite de l'application des doses de plomb inférieures à 200 ppm.

Conclusion Générale

- Sur le plan accumulation du plomb dans la fève

Les réactions des deux variétés sur le plan accumulation sont presque identiques avec une légère augmentation à la doses 2000 ppm pour la variété Super Aguadulce.

En conclusion, ce travail de recherche nous a permis de montrer les effets nocifs et perturbateurs du plomb sur la réduction de la hauteur des plantes et de la longueur des racines, un flétrissement, une perte de la coloration des feuilles et une réduction du nombre de folioles et de la surface foliaire. Les réductions ressenties des indicateurs biométriques et de la production de la biomasse sont liées aux dysfonctionnements internes sur le plan physiologique, biochimique et enzymatique.

Sur le plan variétal, les conclusions tirées de ce travail ont permis de signaler une différence de comportement des deux variétés étudiées face au stress imposé par la présence de plomb, cela se traduit par les réponses distinctes en fonction des paramètres testés.

Les principales conclusions des résultats obtenus sont présentées dans le tableau récapitulatif (Tab.29).

Conclusion Générale

Tableau 29 : Récapitulatif des résultats de l'effet du plomb sur le comportement morphologiques, physiologiques et enzymatiques de la fève.

Variété		Sidi Aïch						Super Aguadulce					
Dose de plomb (ppm)		50	100	200	500	1000	2000	50	100	200	500	1000	2000
Morphologie	Nombres des folioles	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Surface foliaire	-	--	---	----	-----	-----	-	--	---	----	-----	-----
	Hauteur de la tige	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Volume racinaire	--	--	---	----	-----	-----	--	--	---	----	-----	-----
	Poids sec P racinaire	-	-	--	----	-----	-----	-	-	--	----	-----	-----
	Poids sec P Aérienne	--	---	---	----	-----	-----	--	---	---	----	-----	-----
Physiologie	Chlorophylle a	---	---	---	----	-----	-----	---	---	---	----	-----	-----
	Chlorophylle b	--	---	---	----	-----	-----	--	---	---	----	-----	-----
	Caroténoïdes	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	TER	-	-	-	-	-	--	-	-	-	-	-	--
	Sucres Solubles	+	+	+	+	++++	++++	+	+	+	+	++++	++++
	Protéine	---	---	---	----	-----	-----	---	---	---	----	-----	-----
	Proline	+	+	+	+	+++	++++	+	+	+	+	+++	++++
Anti-oxydant	Polyphénols	-	+	++++	++++	++++	++++	+	+	++++	++++	++++	++++
	Flavonoïdes	+	+	+++	++++	++++	++++	-	+	+++	++++	++++	++++
	Catalase	-	+	+	++++	++++	++++	+	+	+	++++	++++	++++
	Péroxydase	-	-	-	++++	++++	++++	+	+	+	++++	++++	++++
Accumulation du plomb		+++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++++	++++	++++	++++	++++

- (-) : réduction ; (+) : augmentation ; █ : diminution significative ; █ : augmentation significative;
 - (-, +) : significatif ; (--, ++) : très significatif ; (---, +++) : hautement significatif ;
 (----, +++) : très hautement significatif.

Recommandations

Cette étude a mis en évidence l'intérêt porté à l'utilisation de la fève comme plante sentinelle pour la détermination de l'action du stress au plomb sur les développement, organisation et fonctionnement interne des plantes et de mieux comprendre les mécanismes de tolérance élaborés par la fève exposée au stress au plomb.

Ce travail de recherche a ouvert de nouvelles voies de recherche afin d'entrevoir de nombreuses perspectives d'expérimentations permettant de répondre à de telles problématiques.

Il serait intéressant pour la continuité de ce travail de proposer les perspectives suivantes :

- Utiliser les résultats de ce travail pour conseiller l'agriculteur des doses de plomb tolérées dans le sol pour la culture la fève afin d'obtenir des rendements économiques sans perturber la croissance de la plante ni nuire à la santé du consommateur ;
- Déterminer la teneur et la spéciation du plomb dans les sols cultivés ;
- Procéder à des techniques de dépollution si les concentrations en plomb dans le sol sont élevées et stressantes pour la culture de la fève ;
- Mener des recherches sur l'interaction rhizosphérique (fève-microflore) et l'implication de la microflore dans la détermination de la dynamique des polluants métalliques ;
- Tester d'autres paramètres qui peuvent expliquer la dynamique de ces éléments métalliques, tels que les paramètres anatomiques et chimiques ;
- Mener des études approfondis en biologie moléculaire en identifiant les gènes impliqués dans la tolérance des plantes au stress par le plomb.

Références bibliographiques

Abdellatif, YMR., Ibrahim, HA. 2017.Effect of Rice and Quinoa Straws on Reducing Lead Uptake in Lettuce (*Lactuca sativa*). *Journal of Horticultural Science & Ornamental Plants*. 9 (3): 94-106. DOI: 10.5829/idosi.jhsop.2017.94.106.

Abdullahi, M. 2013. Toxic effects of lead in humans: an overview. *Glob Adv J Environ Sci Toxicol*. 2:157-162.

Alamri, SA., Siddiqui, MH., Al-Khaishany, MY., Nasir Khan, M., Ali, HM., Alaraidh, IA., Mateen, M.2018. Ascorbic acid improves the tolerance of wheat plants to lead toxicity. *J Plant Interact*. 13:409-419.

Alloway, BJ.1995. Heavy metals in soils. Londres: Blackie Academic and Professional, London. 2nd Edition, 368p.

Alsokari, SS., Aldesuquy, HS.2011. Synergistic effect of polyamines and waste water on leaf turgidity, heavy metals accumulation in relation to grain yield. *J Appl Sci Res*.7, 376-384.

An, YJ.2006. Assessment of comparative toxicities of lead and copper using plant assay. *Chemosphere*. 62(8): 1359-1365.

Arshad, M., Silvestre, J., Pinelli, E., Kallerhoff, J., Kaemmerer, M., Tarigo, A., Shahid, M., Guiresse, M., Pradere, P., Dumat, C.2008. A field study of Pb phytoextraction by various scented Pelargonium cultivars. *Chemosphere*. 71, 2187-2192.

Arya, SK., Basu, A., Mukherjee, A. 2013. Lead induced genotoxicity and cytotoxicity in root cells of *Allium cepa* and *Vicia faba*. *Nucleus*. 56:183-189.

Ashraf, U., Kanu, AS., Deng, Q., Mo, Z., Pan, S., Tian, H., Tang, X. 2017. Lead (Pb) toxicity; physiobiochemical mechanisms, grain yield, quality, and Pb distribution proportions in scented rice. *Front Plant Sci*. 8:259.

Atici, Ö., Açar, G., Battal, P. 2005. Changes in phytohormone contents in chickpea seeds germinating under lead or zinc stress. *Biologia Plantarum*. 49: 215-222.

ATSDR. 2017. Environmental health and medicine education. Lead toxicity. What are routes of exposure to lead? U.S. Department of Health and Human Services. https://www.atsdr.cdc.gov/csem/lead/docs/CSEM-Lead_toxicity_508.pdf

ATSDR.2020. Agency for toxic substances and disease registry. Toxicological profile for lead. U.S. Department of Health and Human Services. <https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp13.pdf>

Aubert, H., Pinta, M.1977. Developments in Soil Science 7, Trace elements in soils. *O.R.S.T.O.M, Elsevier Scientific Publishing Company, First edition, Amsterdam*. p395.

Azouz, MM., Youssef, MM., Al-Omair, MA.2011. Comparative evaluation of zinc and lead and their synergistic effects on growth and some physiological responses of Hassawi Okra (*Hibiscus esculentus*) seedlings. *American journal of plant physiology*. 6 (6): 269-282.

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

Baize, D.2010. Teneurs totales en plomb en fonction de la profondeur dans les sols «naturels», *ArcheoSciences*. 34 :127-135.

URL :<http://journals.openedition.org/archeosciences/2709>

DOI:10.4000/archeosciences.2709

Baker, AJM., Walker, PL.1990. Ecophysiology of metal uptake by tolerant plants. In: Shaw, J. (Ed.). *Heavy Metal Tolerance in plants: Evolutionary aspects*. CRC Press, Boca Raton, Florida. pp. 155-178.

Baldwin, DR., Marshall, WJ.1999. Heavy metal poisoning and its laboratory investigation. *Anna Clin Biochem*. 36:267-300.

Barbosa, J., Cabral, T., Ferreira, D., Agnez-Lima, L., Batistuzzo de Medeiros, S.2010. Genotoxicity assessment in aquatic environment impacted by the presence of heavy metals. *Ecotoxicology Environmental Safety*. 73(3):320-325.

Barcelo, J., Poschenrieder, C.1990. Plant water relations as affected by heavy metal stress: A review." *Journal of Plant Nutrition*. 13(1): 1-37.

Barrs, C., Weatheley, PE.1968. A re-examination of the relative turgidity technique for estimating water deficit in leaves. *Australian Journal of Biological Sciences*. 15: 413-428.

Baskar, V., Venkatesh, R., Ramalingam, S. 2018 Flavonoids (Antioxidants Systems) in Higher Plants and Their Response to Stresses. In: Gupta D., Palma J., Corpas F. (eds) *Antioxidants and Antioxidant Enzymes in Higher Plants*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-75088-0_12.

Bataillard, P., Michel, J., Beaucaire, C. 2012. Guide « Caractérisation de la mobilité des éléments traces minéraux dans la zone non saturée du sol : diagnostic du site». http://ssp-infoterre.brgm.fr/sites/default/files/upload/documents/guide_mobilite_etm_zns_vf.pdf

Bazzaz, FA., Carlson, RW., Rolfe, GL.1975. Inhibition of Corn and Sunflower Photosynthesis by Lead. *Physiologia Plantarum*. 34(4): 326-329.

Beak, KH., Chang, JY., Chang, YY., Bae, BH., Kim, J., Lee, IS. 2006. Phyto-remediation of soil contaminated with cadmium and/or 2,4,6- Trinitrotoluene. *Journal of environmental biology*. 27: 311-316.

Beltagi, MS.2005. Phytotoxicity of lead (Pb) to SDS-PAGE Protein Profile in Root Nodules of Faba Bean (*Vicia Faba* L.) plants. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 8(5) : 687-690.

Bennett, MD.1976. DNA amount, latitude, and crop plant distribution. *Environ. Exp. Bot*. 16(2-3):93-98, IN1-IN2, 99-108.

Bentahar, Y. 2016. Caractérisation physico-chimique des argiles marocaines : application à l'adsorption de l'arsenic et des colorants cationiques en solution aqueuse. Autre.

COMUE Université Côte d'Azur (2015 - 2019); Université Abdelmalek Essaâdi (Tétouan), 2016. Français. NNT : 2016AZUR4081 .tel-01452518.

Béraud, E.2007. Etude des effets génotoxiques et de l'induction des phytochélatines chez *Vicia faba* (Fabaceae) exposée au cadmium. Application du test Vicia-micronoyaux à des matrices complexes. Metz: Université de Metz. 107 p.

Bhatti, SS., Kumar, V., Sambyal, V., Singh, J., Nagpal, AK. 2018. Comparative analysis of tissue compartmentalized heavy metal uptake by common forage crop: a field experiment. *Catena*. 160:185-193.

Bittell, JE., Koeppe, DE., Miller, RJ.1974. Sorption of Heavy Metal Cations by Corn Mitochondria and the Effects on Electron and Energy Transfer Reactions. *Physiologia Plantarum*. 30(3): 226-230.

Blanchard, C. 2000. Caractérisation de la mobilisation potentielle des polluants inorganiques dans les sols pollués. Thèse : Ecole Doctorale de Chimie de Lyon.

Bonnard, R. 2017. Rapport, INERIS-DRC-17-163615-01452A, Coefficients de transfert des éléments traces métalliques vers les plantes, utilisés pour l'évaluation de l'exposition. Application dans le logiciel MODUL'ERS. 35P.

<https://www.ineris.fr/sites/ineris.fr/files/contribution/Documents/ineris-drc-17-163615-01452a-etm-sol-plantes8-fl-rbn-1502453359.pdf>

Bourg, ACM. 1988. Metal in aquatic and terrestrial systems: sorption, speciation and mobilisation. In Chemistry and biology of solid waste, Salmons W., Forstner U., U. Eds., New-York: Springer Verlag. 3-30.

Bradford, MM.1976. Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*. 72, 248-254. [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)

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

Brooks, RR.1998. Plants that Hyperaccumulate Heavy Metals. In: Brooks, R.R. (Ed.). CAB International, Wallingford. pp 289-312.

Brunet, J., Repellin, A., Varrault, G., Terryn, N., Zuily-Fodil, Y.2008. Lead accumulation in the roots of grass pea (*Lathyrus sativus* L.): a novel plant for phytoremediation systems?. *Plant biology and pathology/Biologie et pathologie végétales. C.R. Biologies*. 331: 859-864.

Brunet, J., Varrault, G., Zuily-Fodil, Y., Repellin, A.2009. Accumulation of Pb in the roots of grass pea (*Lathyrus sativus* L.) plants triggers systemic variation in gene expression in the shoots. *Chemosphere* 77, 1113-1120.

Burzynski, M.1987. The influence of lead and cadmium on the absorption and distribution of potassium, calcium, magnesium and iron in cucumber seedlings. *Acta Physiologiae Plantarum*. 9: 229-238.

Buscaroli, A. 2017. An overview of indexes to evaluate terrestrial plants for phytoremediation purposes. *Ecol Indic.* 82:367-380.

Carlu J, 1952. Fèves et féveroles. Larousse agricole. 204 p.

Cecchi M, 2008. Devenir du plomb dans le système sol-plante Cas d'un sol contaminé par une usine de recyclage du plomb et de deux plantes potagères (Fève et Tomate). Thèse de doctorat de l'institut national polytechnique de Toulouse, 226p.

Cecchi, M., Dumat, C., Alric, A., Felix-Faure, B., Pradere, P., Guisresse, M.2008. Multi-metal contamination of a calcic cambisol by fallout from a lead-recycling plant. *Geoderma.* 144:287-298. doi:10.1016/j.geoderma.2007.11.023.

Cenkci, S., Cigerci, IH., Yildiz, M., Özay, C., Bozdag, A., Terzi, H.2010. Pb contamination reduces chlorophyll biosynthesis and genomic template stability in *Brassica rapa* L. *Environ Exp Bot.* 67(3):467-473.

Chardonnens, AN., Koevoets, PLM., Van Zanten, A., Schat, H., Verkleij, JAC.1999. Properties of enhanced tonoplast zinc transport in naturally selected zinc-tolerant *Silene vulgaris*. *Plant Physiology.* 120: 779-785.

Chatterjee, C., Dube, BK., Sinha, P., Srivastava, P.2004. Detrimental effects of Pb phytotoxicity on growth, yield, and metabolism of rice. *Comm Soil Sci Plant An.* 35(1-2):255-265.

Chaux, C., Foury, C. 1994. Production légumières secs, Tome 3, légumineuses potagères, légumes, fruits. Technique et documentation Lavoisier F75384 Paris Cedex 08. pp 3-15.

Chen, J., Zhu, C., Li, LP., Sun, ZY., Pan, XD. 2007. Effects of exogenous salicylic acid on growth and H₂O₂-metabolizing enzymes in rice seedlings under lead stress. *Journal of Environmental Sciences.* 19(1): 44-49.

Chen, Q., Zhang, X., Liu, Y., Wei, J., Shen, W., Shen, Z., Cui, J. 2017. Hemin-mediated alleviation of zinc, lead and chromium toxicity is associated with elevated photosynthesis, antioxidative capacity; suppressed metal uptake and oxidative stress in rice seedlings. *Plant Growth Regul.* 81:253-264.

Choudhury, S., Panda, S.2005. Toxic effects, oxidative stress and ultrastructural changes in moss *Taxithelium nepalense* (Schwaegr.) Broth. under chromium and Pb phytotoxicity. *Water Air Soil Pollut.* 167(1):73-90.

Chuang, MC., Shu, GY., Liu, JC.1996. Solubility of heavy metal in a contaminated soil: effects of redox potential and pH. *Water, Air and Soil Pollution.* 34: 543-556.

Chumbley, CG., Unwin, RJ.2004. Cadmium and lead content of vegetables crops grown on land with an history of sewage sludge application. *Environmental Pollution (Series B).* 4: 231-237.

Cobb, G., Sands, K., Waters, M., Wixson, B., Dorward-King, E.2000. Accumulation of heavy metals by vegetables grown in mine wastes. *Environmental Toxicology and Chemistry.* 19(3): 600-607.

Cotelle, S. 1999. Etude de la génotoxicité de matrices complexes à l'aide de plantes supérieures. Metz: Université de Metz. 179 p.

Cui, YL., Zhu, YG., Zhai, RH., Chen, DY., Huang, YZ., Qui, Y. 2004. Transfer of metals from soil to vegetables in an area near a smelter in Nanning, China. *Environmental Pollution*. 2: 181-188.

Dalyan, E., Yüzbaşıoğlu, E., Akpınar, I. 2018. Effect of 24-Epibrassinolide on antioxidative defence system against lead-induced oxidative stress in the roots of *Brassica juncea* L. seedlings. *Russ J Plant Physiol*. 65:570-578.

Dalyan, E., Yüzbaşıoğlu, E., Akpınar, I. 2020. Physiological and Biochemical Changes in Plant Growth and Different Plant Enzymes in Response to Lead Stress. In: Gupta D., Chatterjee S., Walther C. (eds) Lead in Plants and the Environment. Radionuclides and Heavy Metals in the Environment. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-21638-2_8

De Marco, A., De Simone, C., Raglione, M., Lorenzoni, P. 1995. Influence of soil characteristics on the clastogenic activity of maleic hydrazide in root tips of *Vicia faba*. *Mutat. Res.-Genet. Toxicol. Environ. Mutag*. 344(1-2):5-12.

Degrassi, F., Rizzoni, M. 1982. Micronucleus test in *Vicia faba* root tips to detect mutagen damage in fresh-water pollution. *Mutat. Res.-Environ. Mutag. Related Subj*. 97(1):19-33.

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

Deschamps, T., Benzaazoua, M., Bussière, B., Belem, T., Mbonimpa, M. 2006. « Mécanismes de rétention des métaux lourds en phase solide : cas de la stabilisation des sols contaminés et des déchets industriels », *Vertigo - la revue électronique en sciences de l'environnement* [En ligne], Volume 7 Numéro 2 | septembre 2006, mis en ligne le 08 septembre 2006, consulté le 08 octobre 2020. <http://journals.openedition.org/vertigo/2171>; DOI : doi.org/10.4000/vertigo.2171.

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

Dirilgen, N. 2011. Mercury and lead: Assessing the toxic effects on growth and metal accumulation by *Lemna minor*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 74, 48-54.

Diyab, C. 2005. Influence des plantes (Pois et Tomate) et des amendements phosphates (solide ou soluble) sur la spéciation et la phytodisponibilité des métaux (Pb et Zn) dans un sol contaminé par les retombées atmosphériques d'une usine pyrométallurgique. Thèse de doctorat de l'Université Pierre et Marie Curie, Paris VI, 271p.

Dotaniya, ML., Meena, VD., Kumar, K., Meena, BP., Jat, SL., Lata, M., Ram, A., Dotaniya, CK., Chari, MS. 2016. Impact of biosolids on agriculture and biodiversity. Today and Tomorrow's Printer and Publisher, New Delhi, p. 11-20.

Dotaniya, ML., Rajendiran, S., Meena, VD., Coumar, MV., Saha, JK., Kundu, S., Patra, AK. 2018a. Impact of long-term application of sewage on soil and crop quality in Vertisols of central India. *Bull Environ Contam Toxicol* 101:779-786.

Dotaniya, ML., Panwar, NR., Meena, VD., Dotaniya, CK., Regar, KL., Lata, M., Saha, JK. 2018b. Bioremediation of metal contaminated soil for sustainable crop production. In: Meena VS (ed) *Role of rhizospheric microbes in soil*. Springer, Singapore, p. 143-173.

Dotaniya, ML., Dotaniya, CK., Solanki, P., Meena, VD., Dautaniya, RK. 2020. Lead Contamination and Its Dynamics in Soil-Plant System. In: Gupta D., Chatterjee S., Walther C. (eds) *Lead in Plants and the Environment. Radionuclides and Heavy Metals in the Environment*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-21638-2_5.

Dreier, W., Göring, M. 1974. Der einfluss hoher salzkonzentration auf verschieden physiologische parameter von maiswurzeln. *Win Z. der HU Berlin, Nath. Naturwiss. R.*, 23 : 641-644.

Duan, CQ., Hu, B., Jiang, XH., Wen, CH., Wang, Z., Wang, YX. 1999. Genotoxicity of water samples from Dianchi lake detected by the *Vicia faba* micronucleus test. *Mutat. Res.-Fundam. Mol. Mech. Mutag.* 426(2):121-125.

Duc, G. 1997. Faba bean (*Vicia faba* L.). *Field Crops Res.* 53:99-109.

Dumat, C., Chiquet, A., Goody, D., Aubry, E., Morin, G., Juillot, F., Benedetti, MF. 2001. Metal ion geochemistry in smelter-impacted soils and soil solutions. *Bulletin de la Société Géologique de France.* 172 : 539-548.

Dumat, C., Quenea, K., Bermond, A., Toinen, S., Benedetti, MF. 2006. A study of the trace metal ion influence on the turn-over of soil organic matter in various cultivated contaminated soils. *Environmental Pollution.* 142: 521-529.

EEA, 2016. Air quality in Europe-2016 report, Report No 28/2016, European Environment Agency, Luxembourg: Publications Office of the European Union, <http://powietrze.gios.gov.pl>.

Effron, D., De La Horra, AM., Defrieri, RL., Fontanive, V., Palma, PM. 2004. Effect of cadmium, copper, and lead on different enzyme activities in a native forest soil. *Comm Soil Sci Plant Anal.* 35:1309-1321.

Elzbieta, W., Miroslawa, C. 2005. Pb-induced histological and ultrastructural changes in the leaves of soybean (*Glucine max* L. Merr.). *Soil Sci Plant Nutr.* 51(2):203-212.

Esbaugh, AJ., Brix, KV., Mager, EM., De Schamphelaere, K., Grosell, M. 2012. Multilinear regression analysis preliminary biotic ligand modeling, and cross species

comparison of the effects of water chemistry on chronic lead toxicity in invertebrates. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 155, 423-431.

Estefânia, RS., Marcio, PP., Evaristo, CM., Gabriel BR., Felipe, CF., Fabricio PJ. 2015. Relações da anatomia radicular na absorção, no acúmulo e na tolerância ao chumbo em *Echinodorus grandiflorus*. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 19(6), 605-612. <https://doi.org/10.1590/1807-1929/agriambi.v19n6p605-612>.

Evans, LT.1959. Environmental Control of Flowering in *Vicia faba* L. *Ann. Bot.* 23(4):521-546.

Evans, HJ., Scott, D.1963. Influence of DNA synthesis on the production of chromatid aberrations by X rays and maleic hydrazide in *Vicia faba*. *Genetics.* 49:17-38.

Evans, LJ.1989. Chemistry of metal retention by soils. *Environmental Science and technology.* 23: 1046-1056.

FAO. 2009. Données sur la production et la superficie cultivé de la fève dans le monde. <http://www.fao.org/faostat/fr/#data/QC>.

FAO/OMS. 2011. Joint FAO/WHO Food Standards Programme Codex Committee On Contaminants In Foods. Available at: ftp://ftp.fao.org/codex/meetings/CCCCF/cccf5/cf05_INF.pdf

Farzin, L., Amiri, M., Shams, H., Faghieh, MAA., Moassesi, ME. 2008. Blood levels of lead, cadmium, and mercury in residents of Tehran. *Biol Trace Elem Res.* 123:14-26.

Ferrand, E., Dumat, C., Leclerc-Cessac, E., Benedetti, M.2006. Phytoavailability of zirconium in relation to its initial added form and soil characteristics. *Plant Soil.* 287: 313-325.

Ferrara, G., Loffredo, E., Senesi, N.2004. Anticlastogenic, antitoxic and sorption effects of humic substances on the mutagen maleic hydrazide tested in leguminous plants. *Eur J Soil Sci.* 55(3):449-458.

Foltete, AS.2010. Effets génotoxiques et systèmes de détoxification chez *Vicia faba* (Fabaceae) dans le cadre de l'évaluation des sols pollués. Thèse de doctorat, Université Paul Verlaine - Metz, p245.

Frohne, T., Diaz-Bone, RA., Du Laing, G., Rinklebe, J. 2015. Impact of systematic change of redox potential on the leaching of Ba, Cr, Sr, and V from a riverine soil into water. *J Soil Sediment.* 15: 623-633.

Gajić, G., Mitrović, M., Pavlović, P., Stevanović, B., Djurdjević, L., Kostić, O.2009. An assessment of the tolerance of *Ligustrum ovalifolium* Hassk. to traffic-generated Pb using physiological and biochemical markers. *Ecotoxicology and Environmental Safety.* 72 : 1090-1101.

Gallais, A., Bannerot, H.1992. Amélioration des espèces végétales cultivées: objectifs et critères de sélection. Paris: INRA.

Garcia, JS., Gratao, PL., Azevedo, RA., Arruda, MAZ.2006. Metal Contamination Effects on Sunflower (*Helianthus annuus* L.) Growth and Protein Expression in Leaves During Development. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 54(22): 8623-8630.

Garg, N., Aggarwal, N. 2011. Effects of interactions between cadmium and lead on growth, nitrogen fixation, phytochelatin, and glutathione production in mycorrhizal *Cajanus cajan* (L.) Millsp. *J Plant Growth Regul.* 30(3):286-300. doi:[10.1007/s00344-010-9191-7](https://doi.org/10.1007/s00344-010-9191-7)

Garland, C., D Wilkins.1981. Effect of Calcium on the Uptake and Toxicity of Lead in *Hordeum vulgare* L. and *Festuca ovina* L. *New Phytologist*. 87(3): 581-593.

Gasim, S., Link, W.2007. Agronomic performance and the effect of soil fertilization on German winter faba bean. *J. Central Eur. Agric.* 8:121-127.

Gaweda, M. 2007. Changes in the contents of some carbohydrates in vegetables cumulating lead. *Polish Journal of Environmental Studies*. 16(1): 57-62.

Gichner, T., Znidar, I., Száková, J.2008. Evaluation of DNA damage and mutagenicity induced by Pb in tobacco plants. *Mutat Res/Genet Toxicol Environ Mutagen*. 652(2):186-190.

Gill, SS., Tuteja, N. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol Biochem*. 48:909-930

Gloag, D .1981. Sources of lead pollution. *Br Med J*. 282:41-44

Gobat, JM., Aragno, M., Matthey, W.1998. Le sol vivant. Bases de pédologie, biologie des sols. Presses polytechniques et universitaires romandes, vol 14, coll. gérer l'environnement. 592pp.

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

Govindjee, DW.1976. Effects of lead ions on photosystem I in isolated chloroplasts: studies on the reaction center P700. *Photosynthetica*. 10(3), 241.

Gramigni, E., Tadini-Buoninsegni, F., Bartolommei, G., Santini, S., Chelazzi, G., Moncelli, MR. 2009.Inhibitory Effect of Pb²⁺ on the Transport Cycle of the Na⁺,K⁺-ATPase. *Chem. Res. Toxicol*. 22: 1699-1704.

Grandjean, P., Landrigan, PJ.2014. Neurobehavioural effects of developmental toxicity. *Lancet Neurol*. 13:330-338.

Grant, WF., Owens, ET.2001. Chromosome aberration assays in *Pisum* for the study of environmental mutagens. *Mutat. Res. - Rev. Mut. Res*. 488(2):93-118.

Grill, E., Zenk, MH., Winnacker, E. 1985. Induction of heavy metal-sequestering phytochelatin by cadmium in cell cultures of *Rauvolfia serpentina* . *Naturwissenschaften*. 72:432-433. <https://doi.org/10.1007/BF00404887>.

- Grover, P., Rekhadevi, P., Danadevi, K., Vuyyuri, S., Mahboob, M., Rahman, M. 2010.** Genotoxicity evaluation in workers occupationally exposed to lead. *Int J Hyg Environ Health*, 213:99-106.
- Gupta, D., Huang, H., Yang, X., Razafindrabe, B., Inouhe, M. 2010.** The detoxification of Pb in *Sedum alfredii* H. is not related to phytochelatins but the glutathione. *J Hazard Mater* 177(1-3):437-444.
- Gupta, D., Nicoloso, F., Schetinger, M., Rossato, L., Pereira, L., Castro, G., Srivastava, S., Tripathi, R. 2009.** Antioxidant defense mechanism in hydroponically grown *Zea mays* seedlings under moderate Pb stress. *J Hazard Mater*. 172(1):479-484.
- Gupta, D., Chatterjee, S., Walther, C. 2020.** Lead in Plants and the Environment. 10.1007/978-3-030-21638-2.
- Hammett, FS. 1928.** Studies in the biology of metals. *Protoplasma*. 5(1): 535-542.
- Hanelt, P., Mettin, D. 1989.** Biosystematics of the genus *Vicia* L. (Leguminosae). *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 20:199-223.
- Hatira, A., Gallali, T., Rouillet, J., Guillet, B. 1990.** Stabilité et solubilité des complexes formés entre le cuivre, le plomb, le zinc et les acides fulviques. *Science du Sol*. 28 : 123-135.
- Hattab, S., Hattab, S., Flores-Casseres, ML., Boussetta, H., Doumas, P., Hernandez, LE., Banni, M. 2016.** Characterisation of lead-induced stress molecular biomarkers in *Medicago sativa* plants. *Environ Exp Bot.* 123:1-12.
- Hedaya, AK. 2008.** Lead Accumulation and its Effect on Photosynthesis and Free Amino Acids in *Vicia faba* Grown Hydroponically. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 2(3): 438-446.
- Herzog, H, 1984.** Relation of source and sink during grain filling period in wheat and some aspects of its regulation. *Physiol. Plant.* 56: 155-160.
- Hinsinger, P., Gilkes, RJ. 1996.** Mobilisation of phosphates rock and alumina-sorbed phosphate by roots of ryegrass and clover as related to rhizosphere pH. *European Journal of Soil Science*. 47: 53-544.
- Hinsinger, P. 2004.** Rhizosphere: Nutrient Movement and Availability. *Encyclop Plant Crop Sci.* 1094-1097.
- Hinsinger, P., Schneider, A., Dufey, JE. 2005.** Le sol : ressource en nutriments et biodisponibilité. In « Sols et Environnement », Dunod (ed), Paris, 285-305.
- Horbowicz, M., Dębski, H., Wiczowski, W., Szawara-Nowak, D., Koczkodaj, D., Mitrus, J., Sytykiewicz, H. 2013.** The Impact of Short-Term Exposure to Pb and Cd on Flavonoid Composition and Seedling Growth of Common Buckwheat Cultivar. *Pol. J. Environ. Stud.* 22(6): 1723-1730.

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

Huang, G., Bazzaz, FA., Vanderhoef, LN.1974. The inhibition soybean metabolism by cadmium and lead. *Plant Physiol*. 54: 122-124.

Huang, H., Gupta, DK., Tian, S., Yang, XE., Li T.2012. Lead tolerance and physiological adaptation mechanism in roots of accumulating and non-accumulating ecotypes of *Sedum alfredii*. *Environ Sci Pollut Res*. 19:1640-1651.

ILZSG, 2020. International lead and zinc study group, 2020. Lead and zinc statistics. www.ilzsg.org/static/statistics.aspx?from=1.

Inoue, H., Fukuoka, D., Tatai, Y., Kamachi, H., Hayatsu, M., Ono, M., Suzuki, S. 2013. Properties of lead deposits in cell walls of radish (*Raphanus sativus*) roots. *J Plant Res*. 126:51-61.

Islam, E., Yang, X., Li, T., Liu, D., Jin, X., Meng, F.2007. Effect of Pb toxicity on root morphology, physiology and ultrastructure in the two ecotypes of *Elsholtzia argyi*. *Journal of Hazardous Materials*. 147(3): 806-816.

Islam, E., Liu, D., Li, T., Yang, X., Jin, X., Mahmood, Q., Tian, S., Li, J.2008. Effect of Pb toxicity on leaf growth, physiology and ultrastructure in the two ecotypes of *Elsholtzia argyi*. *Journal of Hazardous Materials*. 154: 914-926.

Jagetiya, B., Kumar, S. 2020. Phytoremediation of Lead: A Review. In: Gupta D., Chatterjee S., Walther C. (eds) *Lead in Plants and the Environment. Radionuclides and Heavy Metals in the Environment*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-21638-2_10.

Jana, S., M, Choudhuri.1982. Senescence in submerged aquatic angiosperms: effects of heavy metals. *New Phytologist*. 90(3): 477-484.

Jiang, W., Liu, D.2010. Pb-induced cellular defense system in the root meristematic cells of *Allium sativum* L. *BMC Plant Biol*. 10:40-40.

John, R., Ahmad, P., Gadgil, K., Sharma, S.2008. Effect of cadmium and lead on growth, biochemical parameters and uptake in *Lemna polyrrhiza* L. *Plant Soil Environ*. 54 (6): 262-270.

Johnson, FM.1998. The genetic effects of environmental lead. *Mutation Research*. 410: 123-140.

Kabata-Pendias, A., Pendias, H.1992. Trace elements in soils and plants. 2nd edition CRC press, Boca Raton, FL.

Kaimoyo, E., Farag, MA., Sumner, LW., Wasmann, C., Cuello, JL., VanEtten, H.2008. Sublethal levels of electric current elicit the biosynthesis of plant secondary metabolites. *Biotechnology Progress*. 24(2): 377-384.

Kamel, MM., Ibrahm, MA., Ismael, AM., Motaleeb, MAE. 2004. Adsorption of some heavy metal ions from aqueous solutions by using kaolinite clay. *Ass. Univ. Bull. Environ. Res.* 7:101-109.

Kanaya, N., Gill, BS., Grover, IS., Murin, A., Osiecka, R., Sandhu, SS., Andersson, HC.1994. *Vicia faba* chromosomal aberration assay. *Mutat. Res.-Fundam. Mol. Mech. Mutag.* 310(2):231-247.

Kastori, R., Petrovic, M., Petrovic, N. 2008. Effect of excess lead, cadmium, copper, and zinc on water relations in sunflower. *J. Plant Nutr.* 15: 2427-2439.

Khan, D., Frankland, B.1983. Effects of cadmium and lead on radish plants with particular reference to movement of metals through soil profile and plant. *Plant and Soil.* 70(3): 335-345.

Khan, I., Iqbal, M., Ashraf, MY., Ashraf, MA., Ali, S.2016. Organic chelants-mediated enhanced lead (Pb) uptake and accumulation is associated with higher activity of enzymatic antioxidants in spinach (*Spinacea oleracea* L.). *J Hazard Mater.* 317:352-361.

Khan, MM., Islam, E., Irem, S., Akhtar, K., Ashraf, MY., Iqbal, J., Liu, D. 2018. Pb-induced phytotoxicity in para grass (*Brachiaria mutica*) and Castorbean (*Ricinus communis* L.): antioxidant and ultrastructural studies. *Chemosphere.* 200:257-265.

Kinniburgh, DG., Milne, CJ., Benedetti, MF., Pinheiro, JP., Filius, J., Koopal, LK., Van Riemsdijk, WH.1996. Metal ion binding by humic acid: application of the NICA-Donnan Model. *Environmental Science and Technology.* 30: 1687-1698.

Kögel-Knabner, W., Amelung, Z., Cao, S., Fiedler, P., Frenzel, R.2010. Biogeochemistry of paddy soils. *Geoderma.* 157: 1-14.

Kopittke, PM., Asher, CJ., Kopittke, RA., Menzies, NW. 2007. Toxic effects of Pb²⁺ on growth of cowpea (*Vigna unguiculata*). *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987).* 150(2): 280-287. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2007.01.011>.

Koppen, G., Verschaeve, L.1996. The alkaline comet test on plant cells: A new genotoxicity test for DNA strand breaks in *Vicia faba* root cells. *Mutat. Res.-Environ. Mutag. Related Subj.* 360(3):193-200.

Kosobrukhov, A., Knyazeva, I., Mudrik, V.2004. Plantago major plants responses to increase content of lead in soil: Growth and photosynthesis. *Plant Growth Regulation.* 42: 145-151.

Kováčik, J., Klejdus, B., Hedbavny, J., Zon, J. 2011. Significance of phenols in cadmium and nickel uptake. *Journal of Plant Physiology.* 168 : 576-584. doi:10.1016/j.jplph.2010.09.011

Kovalchuk, I., Titov, V., Hohn, B., Kovalchuk, O.2005. Transcriptome profiling reveals similarities and differences in plant responses to cadmium and lead. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis.* 570(2): 149-161.

Kozhevnikova, AD., Seregin, IV., Bystrova, EI., Belyaeva, AI., Kataeva, MN., Ivanov, VB. 2009. The effects of lead, nickel, and strontium nitrates on cell division and elongation in maize roots. *Russ J Plant Physiol.* 56:242-250.

Külahcı, F. 2020. Environmental Distribution and Modelling of Radioactive Lead (210): A Monte Carlo Simulation Application. In: Gupta D., Chatterjee S., Walther C. (eds) Lead in Plants and the Environment. Radionuclides and Heavy Metals in the Environment. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-21638-2_2.

Kumar, A., Pal, L., Agrawal, V. 2017. Glutathione and citric acid modulates lead- and arsenic induced phytotoxicity and genotoxicity responses in two cultivars of *Solanum lycopersicum* L. *Acta Physiologiae Plantarum.* 39: 151.DOI:[10.1007/s11738-017-2448-z](https://doi.org/10.1007/s11738-017-2448-z).

Kumar, B., Smita, K., Flores, LC. 2017. Plant mediated detoxification of mercury and lead. *Arabian Journal of Chemistry.* 10 (2): S2335-S2342. <http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2013.08.010>.

Kunito, T., Saeki, K., Nagaoka, K., Oyaizu, H., Matsumoto, S. 2001. Characterization of copper resistant bacterial community in rhizosphere of highly copper-contaminated soil. *Eur J Soil Biol.* 37:95-102.

Kuppusamy, S., Thavamani, P., Megharaj, M., Naidu, R.2015. Bioremediation potential of natural polyphenol rich green wastes: a review of current research and recommendations for future directions. *Environ Technol Innovation.* 4:17-28.

Lamand, M.1991. Les oligoéléments dans la biosphère. In : Chappuis P. (ed.). Les oligoéléments en médecine et biologie. SFERETE, Lavoisier Tec & Doc, Paris, 25-39.

Lamy, I.2002. Réactivité des matières organique des sols vis-à-vis des métaux. Journées nationales de l'étude des sols. 22-24 octobre, Orléans.

Lasat, MM.2002. Phytoextraction of toxic metals: a review of biological mechanisms. *Journal of Environmental Quality.* 39: 109-120.

Laumonier, R. 1979. Cultures légumières et maraîchères, Tome III. Ed.J.B. BAILLIERE, 276p.

Lavid, N., Schwartz, A., Yarden, O., Tel-Or, E. 2001. The involvement of polyphenols and peroxidase activities in heavy-metal accumulation by epidermal glands of the waterlily (*Nymphaeaceae*). *Planta.* 212(3):323-331.

Li, X., Meng, D., Li, J., Yin, H., Liu, H., Liu, X.2017. Response of soil microbial communities and microbial interactions to long-term heavy metal contamination. *Environ. Pollut.* 231: 908-917.

Lichtenthaler, HK.1987. Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembrane. *Methods Enzymology.* 148: 350-381.

Lin, AJ., Zhang, XH., Chen, MM., Cao, Q.2007. Oxidative stress and DNA damages induced by cadmium accumulation. *J. Environ. Sci. (China).* 19(5):596-602.

Liu, D., Jiang, W., Liu, C., Xin, C., Hou, W.2000. "Uptake and accumulation of lead by roots, hypocotyls and shoots of Indian mustard (*Brassica juncea* L.). *Bioresource Technology* 71(3): 273-277.;

Liu, D., Li, T., Jin, X., Yang, X., Islam, E., Mahmood, Q.2008. Pb induced changes in the growth and antioxidant metabolism of the Pb accumulating and non-accumulating ecotypes of *Sedum alfredii*. *J Integr Plant Biol.* 50(2):129-140.

Liu, T., Liu, S., Guan, H., Ma, L., Chen, Z., Gu, H. 2009. Transcriptional profiling of *Arabidopsis* seedlings in response to heavy metal Pb (Pb). *Environ Exp Bot.* 67(2):377-386.

Loudes, JP.2002. Mise au point de biotests sur les plantes pour mettre en évidence un effet toxique ou agronomique de substances exogènes (Zinc, Plomb, Substances Humiques). ENSAT. Rapport DEA. 51p.

Luan, ZQ., Cao HC., Yan BX.2008. Individual and combined phytotoxic effects of cadmium, lead and arsenic on soybean in *Phaeozem*. *Plant Soil Environ.* 54(9): 403-411.

Lukaszek, M., Poskuta, J.1998. Development of photosynthetic apparatus and respiration in pea seedlings during greening as influenced by toxic concentration of lead. *Acta Physiologiae Plantarum.* 20(1): 35-40.

Lzbianska, K., Arasimowicz-Jelonek, M., Deckert, J.2014. Phenylpropanoid pathway metabolites promote tolerance response of lupine roots to lead stress. *Ecotoxicol Environ Saf* 110:61-67.

Makowski, E., Kita, A., Galas, W., Karcz, W., Kuperberg, JM.2002. Lead distribution in corn seedlings (*Zea mays* L.) and its effect on growth and the concentrations of potassium and calcium. *Plant Growth Regulation.* 37: 69-76.

Mao, LC., Bailey, EH., Chester, J., Dean, J., Ander, EL., Chenery, SR., Young, SD. 2014. Lability of Pb in soil: effects of soil properties and contaminant source. *Environ. Chem.* 11: 690-701.

Marcato-Romain, C., Guiresse, M., Cecchi, M., Cotelle, S., Pinelli, E.2009. New direct contact approach to evaluate soil genotoxicity using the *Vicia faba* micronucleus test. *Chemosphere.* 77: 345-350.

Marsh, J., Bailey, M. 2013. A review of lung-to-blood absorption rates for radon progeny. *Radiat Prot Dosimetry.* 157:499-514.

McLaughlin, MJ.2001. Bioavailability of metals to terrestrial plants. In: Allen, H.E. (Ed.), Bioavailability of Metals in Terrestrial Ecosystems. Importance of Partitioning for Bioavailability to Invertebrates, Microbes and Plants. SETAC Press, Pensacola, FL, pp. 39-68.

Meena,V., Dotaniya ML., Saha JK., Das H., Patra AK. 2020. Impact of Lead Contamination on Agroecosystem and Human Health. In: Gupta D., Chatterjee S., Walther

C. (eds) Lead in Plants and the Environment. Radionuclides and Heavy Metals in the Environment. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-21638-2_4.

Meitei, MD., Kumar, A., Prasad, MN., Malec, P., Waloszek, A., Maleva, M., Strzalka, K. 2014. Photosynthetic pigments and pigment-protein complexes of aquatic plants under heavy metal stress. Photosynthetic pigments: chemical structure, biological function and ecology. *Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Nauka, Russia*. pp 314-329.

Mench, M., Morel, JL., Guckert, A., Guillet, B. 1988. Metal binding with roots exudates of low molecular weight. *Journal of Soil Science*. 39: 521-527.

Michalak, AM. 2001. Feasibility of contaminant source identification for property rights enforcement. In: Anderson TL, Hill PJ (eds) The technology of property rights. Rowman & Littlefield Publishers, Lanham, MD, p. 123-145.

Michalak, A. 2006. Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. *Pol J Environ Stud*. 15(4): 523-530.

Migeon, A. 2009. Etude de la variabilité naturelle dans la réponse du peuplier aux métaux : bases physiologiques et exploitation en phytoremédiation. Thèse de doctorat de l'Université Henri Poincaré, Nancy-Université, p346.

Mihailovic, V., Mikic, A., Cupina, B., Eric, P. 2005. Field pea and vetches in serbia and Montenegro. *Grain Legumes*. 44:25-26.

Mishra, A., Choudhuri, MA. 1998. Amelioration of lead and mercury effects on germination and rice seedling growth by antioxidants. *Biologia Plantarum*. 41(3): 469-473.

Mishra, S., Srivastava, S., Tripathi, RD., Govindarajan, R., Kuriakose, SV., Prasad, MNV. 2006a. Phytochelatin synthesis and response of antioxidants during cadmium stress in *Bacopa monnieri* L[lozenge]. *Plant Physiology and Biochemistry*. 44(1): 25-37.

Mishra, S., Srivastava, S., Tripathi, RD., Kumar, R., Seth, CS., Gupta, DK. 2006b. Lead detoxification by coontail (*Ceratophyllum demersum* L.) involves induction of phytochelatin and antioxidant system in response to its accumulation. *Chemosphere*. 65(6): 1027-1039.

Mitra, A., Chatterjee, S., Voronina, AV., Walther, C., Gupta, DK. 2020. Lead Toxicity in Plants: A Review. In: Gupta D., Chatterjee S., Walther C. (eds) Lead in Plants and the Environment. Radionuclides and Heavy Metals in the Environment. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-21638-2_6.

Mohan, BS., Hosetti, BB. 1997. Potential phytotoxicity of lead and cadmium to *Lemna minor* grown in sewage stabilization ponds. *Environmental Pollution*. 98(2): 233-238.

Morin, G., Ostergren, JD., Juillot, F., Ildefonse, P., Calas, G., Brown, GE Jr. 1999. XAFS determination of the chemical form of lead in smelter-contaminated soils and mine tailings: Importance of adsorption processes. *American Mineralogist*. 84: 420-434.

- Mroczek-Zdyrska, M., Wójcik M. 2012.** The Influence of Selenium on Root Growth and Oxidative Stress Induced by Lead in *Vicia faba* L. minor Plants. *Biol Trace Elem Res.* 147:320-328. DOI 10.1007/s12011-011-9292-6.
- Mroczek-Zdyrska, M., Strubińska, J., Hanaka, A. 2017.** Selenium improves physiological parameters and alleviates oxidative stress in shoots of lead-exposed *Vicia faba* L minor plants grown under phosphorus-deficient conditions. *J Plant Growth Regul.* 36:186-199.
- Müller, L., Gnoyke, S., Popken, AM., Böhm, V. 2010.** Antioxidant capacity and related parameters of different fruit formulations. *LWT -Food Science and Technology.* 43: 992-999. doi:10.1016/j.lwt.2010.02.004.
- Murkowski, A., Skórska, E.2008.** Comparison of phytotoxicity of lead and tin organic compounds by means of luminescence methods. *Acta Agrophysica.* 2008, 11(1): 131-140.
- Nadgórska-Socha, A., Kafel, A., Kandziora-Ciupa, M., Gospodarek, J., Zawisza-Raszka, A.2013.** Accumulation of heavy metals and antioxidant responses in *Vicia faba* plants grown on monometallic contaminated soil. *Environ Sci Pollut Res.* 20:1124-1134. DOI 10.1007/s11356-012-1191-7.
- Nareshkumar, A., Veeranagamallaiah, G., Pandurangaiah, M., Kiranmai, K., Amaranathareddy, V., Lokesh, U., Sudhakar, C. 2015.** Pb-stress induced oxidative stress caused alterations in antioxidant efficacy in two groundnut (*Arachis hypogaea* L) cultivars. *Agric Sci.* 6:1283-1297.
- Nas, FS., Ali, M.2018.** The effect of lead on plants in terms of growing and biochemical parameters: a review. *MOJ Eco Environ Sci.* 3(4):265-268. [DOI:10.15406/mojes.2018.03.00098](https://doi.org/10.15406/mojes.2018.03.00098).
- Natasha, N., Dumat, C., Shahid, M., Khalid, S., Murtaza, B.2020.** Lead Pollution and Human Exposure: Forewarned is Forearmed, and the Question Now Becomes How to Respond to the Threat! https://doi.org/10.1007/978-3-030-21638-2_3.
- Nriagu, JO., Moore, PB.1984.** Phosphate minerals Springer -Verlag, New-York.
- Nriagu, J.** 1990. Global Metal Pollution: Poisoning the Biosphere. *Environment ENVITAR* 32(7): 7-11; 28-33.
- NSC. 2009.** Lead Poisoning, National Safety Council, 2009. [http://www.nsc.org/newsresources/Resources/Documents/Lead Poisoning.pdf](http://www.nsc.org/newsresources/Resources/Documents/Lead%20Poisoning.pdf)
- Nye, PH.1986.** Acid-base changes in the rhizosphere. *Advance in Plant Nutrition.* 2: 129-1253.
- Obroucheva, NV., Bystrova, EI., Ivanov, VB., Antipova, OV., Seregin, IV.1998.** Root growth responses to lead in young maize seedlings. *Plant and Soil.* 200: 55-61.
- Oliveira, A., Pampulha, ME.2006.** Effects of long-term heavy metal contamination on soil microbial characteristics. *J Biosci Bioeng.* 102:157-161.

OMS. 2009. Levels of lead in children's blood.

OMS. 2011. Guidelines for quality drinking-water.

Pal, R., Rai, J. 2010 Phytochelatins: Peptides involved in heavy metal detoxification. *Applied Biochem Biotech.* 160:945-963.

Parys, E., Romanowska, E., Siedlecka, M., Poskuta, JW.1998. The effects of lead on photosynthesis and respiration in detached leaves and mesophyll protoplasts of *Pisum sativum*. *Acta Physiologiae Plantarum.* 20: 313-322.

Parys, E., Wasilewska, W., Siedlecka, M., Zienkiewicz, M., Drożak, A., Romanowska, E. 2014. Metabolic responses to lead of metalicolous and nonmetalicolous populations of *Armeria maritima*. *Arch Environ Contam Toxicol.* 67:565-577.

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

Patra, R., Rautray, AK., Swarup, D. 2011. Oxidative stress in lead and cadmium toxicity and its amelioration. *Vet Med Int.* 457327: 9. doi:10.4061/2011/457327.

Pazoki, A. 2015. Evaluation of Flavonoids and Phenols content of Wheat under different Lead, PGPR and Mycorrhiza levels. *Biological Forum - An International Journal.* 7(1): 309-315.

Peron, J-Y. 2006. Références. Production légumière. 2ème Ed. 613 p.

Pinho, S., Ladeiro, B. 2012. Phytotoxicity by lead as heavy metal focus on oxidative stress. *Journal of Botany.* 145: 596-605. <https://doi.org/10.1155/2012/369572>.

Piotrowska, A., Bajguz, A., Godlewska-Zylkiewicz, B., Czerpak, R., Kaminska, M.2009. Jasmonic acid as modulator of Pb toxicity in aquatic plant *Wolffia arrhiza* (Lemnaceae). *Environ Exp Bot.* 66(3):507-513.

Poskuta, J., Parys, E., Romanowaska, E.1996. Toxicity of lead to photosynthesis, accumulation of chlorophyll, respiration and growth of *Chlorella pyrenoidosa*. Protective role of dark respiration. *Acta Physiologiae Plantarum* 18(2): 165-171.

Poskuta, J., Parys, E., Romanowska, E.1988. The effects of lead on the gaseous exchange and photosynthetic carbon metabolism of pea seedlings. *Acta societatis botanicorum Poloniae* 56: 127-137.

Posmyk, MM., Kontek, R., Janas, KM. 2009. Antioxidant enzymes activity and phenolic compounds content in red cabbage seedlings exposed to copper stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety.* 72 :596-602.

Pourrut, B.2008. Implication du stress oxydatif dans la toxicité du plomb sur une plante modèle, *Vicia faba*. Thèse de doctorat de l'université de Toulouse, 284p.

Pourrut, B., Jean, S., Jérôme, S., Pinelli, E. 2011. Lead-induced DNA damage in *Vicia faba* root cells: Potential involvement of oxidative stress. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 726 (2):123-128.

Pourrut, B., Shahid, M., Dumat, C., Winterton, P., Pinelli, E. 2011. Lead Uptake, Toxicity, and Detoxification in Plants. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology, Springer Verlag*. 213:113-136.

Pourrut, B., Shahid, M., Douay, F., Dumat, C., Pinelli, E. 2013. Molecular Mechanisms Involved in Lead Uptake, Toxicity and Detoxification in Higher Plants. In: Gupta D., Corpas F., Palma J. (eds) *Heavy Metal Stress in Plants*. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-38469-1_7.

Prasad, MNV., De Oliveira Freitas, HM. 2003. Metal hyperaccumulation in plants - Biodiversity prospecting for phytoremediation technology. *Electronic Journal of Biotechnology*. 6: 110-146.

Probst, A., Liu, H., Fanjul, M., Liao, B., Hollande, E. 2009. Response of *Vicia faba* L. to metal toxicity on mine tailing substrate: geochemical and morphological changes in leaf and root. *Environ Exp Bot*. 66:297-308.

Qian, J., Wang, Z., Shan, X., Tu, Q., Wen, B., Chen, B. 1996. Evaluation of plant availability of soil trace metals by chemical fractionation and multiple regression analysis. *Environ. Pollut*. 91:309-315.

Qiao, X., Shi, G., Chen, L., Tian, X., Xu, X. 2013. Lead-induced oxidative damage in sterile seedlings of *Nymphoides peltatum*. *Environ Sci Pollut Res*. 20:5047-5055.

Qufei, L., Fashui, H. 2009. Effects of Pb²⁺ on the Structure and Function of Photosystem II of *Spirodela polyrrhiza*. *Biol Trace Elem Res*. 129(1):251-260.

Qureshi, M., Israr, M., Abdin, MZ., Iqbal, M. 2005. Responses of *Artemisia annua* L. to lead and salt-induced oxidative stress. *Environmental and Experimental Botany*. 53(2): 185-193.

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

Radetski, CM., Ferrari, B., Cotelle, S., Masfaraud, JF., Ferard, JF. 2004. Evaluation of the genotoxic, mutagenic and oxidant stress potentials of municipal solid waste incinerator bottom ash leachates. *Sci. Total Environ*. 333(1-3):209-216.

Ramasamy, RK., Congeevaram, S., Thamaraiselvi, K., 2011. Evaluation of isolated fungal strain from e-waste recycling facility for effective sorption of toxic heavy metal Pb (II) ions and fungal protein molecular characterization-A mycoremediation approach. *Asian J. Exp. Biol. Sci*. 2: 342-347.

Remon, E. 2006. Tolérance et accumulation des métaux lourds par la végétation spontanée des friches métallurgiques : vers de nouvelles méthodes de bio-dépollution. Thèse de doctorat, université JEAN MONNET, p157.

- Rickard, DT., Nriagu, JE.1978.** Aqueous environmental chemistry of lead. In the Biogeochemistry of lead in the environment. Part A. Ecological Cycles. JO. Nriagu Eds. 219-284, Elsevier, North-Holland, New- New-York.
- Rinklebe, J., Shaheen, SM. 2017.** Redox chemistry of nickel in soils and sediments: a review. *Chemosphere*. 179, 265-278.
- Rodriguez, E., Azevedo, R., Moreira, H., Souto, L., Santos, C.2013.** Pb²⁺ exposure induced microsatellite instability in *Pisum sativum* in a locus related with glutamine metabolism. *Plant Physiol Biochem*. 62:19-22.
- Roelfsema, MRG., Hedrich, R.2005.** In the light of stomatal opening: new insights into 'the Watergate'. *New Phytologist*. 167(3): 665-691.
- Romanowska, E., Igamberdiev, AU., Parys, E., Gardeström, P.2002.** Stimulation of respiration by Pb²⁺ in detached leaves and mitochondria of C3 and C4 plants. *Physiol Plant* 116(2):148-154.
- Romanowska, E., Pokorska, B., Siedlecka, M. 2005.** The effects of oligomycin on content of adenylates in mesophyll protoplasts, chloroplasts and mitochondria from Pb²⁺ treated pea and barley leaves. *Acta Physiol Plant*. 27(1):29-36.
- Romanowska, E., Wróblewska, B., Drozak, A., Siedlecka, M.2006.** High light intensity protects photosynthetic apparatus of pea plants against exposure to Pb. *Plant Physiol Biochem* 44(5-6):387-394.
- Romheld, V., Muller, Ch., Marschner, H.1984.** Localization and capacity of proton pumps in roots of intact sunflower plants. *Plant physiology*. 76: 603-606.
- Roselli, W., Keller, C., Boschi, K.2003.** Phytoextraction capacity of trees growind on metal contaminated soil. *Plant and soil*. 256:265-272.
- Rucińska, R., Sobkowiak, R., Gwózdź, EA.2004.** Genotoxicity of Pb in lupin root cells as evaluated by the comet assay. *Cell Mol Biol Lett*. 9(3):519-528.
- Ruley, AT., Sharma, NC., Sahi, SV., Singh, SR., Sajwan, KS.2006.** Effects of lead and chelators on growth, photosynthetic activity and Pb uptake in *Sesbania drummondii* grown in soil. *Environnement Pollution*. 144: 11-18.
- Sabath, E., Robles-Osorio, ML. 2012.** Renal health and the environment: heavy metal nephrotoxicity Medio ambiente y riñón: nefrotoxicidad por metales pesados. *Nefrologia*. 32:279-286.
- Saha, JK. 2013.** Risk assessment of heavy metals in soil of a susceptible agroecological system amended with municipal solid waste compost. *J Indian Soc Soil Sci*. 61:15-22.
- Saha, JK., Rajendiran, S., Coumar, MV., Dotaniya, ML., Kundu, S., Patra, AK. 2017.** Soil pollution an emerging threat to agriculture. Springer
- Sang, N., Li, G.2004.** Genotoxicity of municipal landfill leachate on root tips of *Vicia faba* Mutat. Res.-Genet. Toxicol. Environ. Mutag. 560(2):159-165.

Sanyal, SK., Majumdar, K.2009. Nutrient dynamics in soil. *J Indian Soc Soil Sci.* 57:477-493.

Saradhi, AP., Saradhi, PP. 1991. Proline accumulation under heavy metal stress. *Journal of Plant Physiology.* 138(5): 554-558.

Sarkar, D., Datta, R., Hannigan, R.2011. Concepts and applications in environmental geochemistry. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.

Sarret, G., Vangronsveld, J., Manceau, A., Musso, M., D'Haden, J., Menthonnex, JJ., Hazemann, JL.2001. Accumulation forms of Zn and Pb in *Phaselous vulgaris* in the presence and absence of EDTA. *Environmental Science and Technology.* 35: 2854-2859.

Saxena, A., Saxena, DK., Srivastava, HS.2003. The Influence of Glutathione on Physiological Effects of Lead and its Accumulation in Moss *Sphagnum squarrosum*. *Water, Air, & Soil Pollution.* 143(1): 351-361.

Sayed, SA.1999. Effects of lead and kinetin on the growth, and some physiological components of safflower. *Plant Growth Regulation.* 29(3): 167-174.

Schulz-Zunkel, C., Rinklebe, J., Bork, HR. 2015. Trace element release patterns from three floodplain soils under simulated oxidized-reduced cycles. *Ecol. Eng.* 83:485-495.

Sengar, RS., Gautam, M., Sengar, RS., Sengar, RS., Garg, SK., Sengar, K., Chaudhary, R.2009. Pb stress effects on physiobiochemical activities of higher plants. *Rev Environ Contam Toxicol.* 196:1-21.

Seregin, IV., Ivanov, VB.1998. The transport of cadmium and lead ions through root tissues. *Russian Journal of Plant Physiology.* 45: 899-905.

Seregin, IV., Ivanov, VB. 2001. Physiological aspects of cadmium and lead toxic effects on higher plants. *Russian Journal of Plant Physiology.* 48(4): 523-544.

Seregin, IV., Shpigun, LK., Ivanov, VB. 2004. Distribution and toxic effects of Cadmium and Lead on maize roots. *Russian Journal of Plant Physiology.* 51(4): 525-533.

Shaheen, SM., Rinklebe, J., Frohne, T., White, JR., DeLaune, RD. 2014. Biogeochemical factors governing cobalt, nickel, selenium, and vanadium dynamics in periodically flooded egyptian north Nile delta rice soils. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 78:1065-1078.

Shahid, M. 2010. Induction de la phytotoxicité du Plomb chez *Vicia faba* L. : rôles de l'absorption et de la spéciation. Thèse de doctorat de l'université de Toulouse, p300.

Shahid, M., Pinelli, E., Pourrut, B., Silvestre, J., Dumat, C.2011. Lead-induced genotoxicity to *Vicia faba* L. roots in relation with metal cell uptake and initial speciation. *Ecotoxicology and Environmental Safety.* 74:78-84.

Sharma, P., Dubey, RS.2005. Lead toxicity in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 17(1): 35-52.

- Sharma, P., Jha, AB., Dubey, RS., Pessaraki, M. 2012.** Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *J Bot.* 2012:1-26. <https://doi.org/10.1155/2012/217037>.
- Shields, R., Burnett, W.1960.** Determination of protein bound carbohydrate in serum by a just modified anthrone method. *Anal. Chem.* 32: 885-886.
- Shu, X., Yin, L., Zhang, Q., Wang, W.2012.** Effect of Pb toxicity on leaf growth, antioxidant enzyme activities, and photosynthesis in cuttings and seedlings of *Jatropha curcas* L. *Environ Sci Pollut Res.* 19:893-902.
- Shukla, K., Sharma, S., Sing, N., Sing, V., Tiwari, K., Singh, S. 2011.** Nature and role of root exudates: Efficacy in bioremediation. *Afr J Biotechnol.* 10(98):9717-9724.
- Singh, RP., Tripathi, RD., Sinha, SK., Maheshwari, R., Srivastava, HS.1997.** Response of higher plants to lead contaminated environment. *Chemosphere.* 34(11):2467-2493.
- Singh, R., Tripathi, RD., Dwivedi, S., Kumar, A., Trivedi, PK., Chakrabarty, D.2010.** Pb bioaccumulation potential of an aquatic macrophyte *Najas indica* are related to antioxidant system. *Bioresour Technol.* 101:3025-3032.
- Singh, AK., Bhatt, BP.2012.** Faba bean: unique germplasm explored and identified. *Hort. Flora Res. Spectrum.* 1(3):267-269.
- Singleton, VL., Rossi, JR-JA.1965.** Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic.* 16:144-158.
- Sobrinho, AS., Miranda, MG., Alvarez, C., Quiroz, A. 2010.** Bio-accumulation and toxicity of lead (Pb) in *Lemna gibba* L (duckweed). *Journal of Environmental Science and Health Part A.* 45:107-110. DOI: 10.1080/10934520903389267.
- Sofi, I., Rajneesh, KA., Showkat, AG., Rajendra, S. 2014.** Biochemical Response of *Glycine max* (L.) Merr. To Cobalt and Lead stress. *Journal of Stress Physiology & Biochemistry.* 10(3):259-272.
- Soheir, ES., Khalil, MY., Naguib, NY.2002.** Investigation of the effect of some elements (B, Mo, Co, Pb) on growth, productivity and quality of *Cymbopogon citratus* L. *Ann. Agric. Sci.* 47(3): 911-927.
- Solenkova, NV., Newman, JD., Berger, JS., Thurston, G., Hochman, JS., Lamas, GA.2014.** Metal pollutants and cardiovascular disease: mechanisms and consequences of exposure. *Amer Heart. J.* 168:812-822.
- Stefanov, K., Popova, I., Kamburova, E., Pancheva, T., Kimenov, G., Kuleva, L., Popov, S.1993.** Lipid and sterol changes in *Zea mays* caused by lead ions. *Phytochemistry.* 33(1):47-51.
- Stehouwer, R., Macneal, K.1999.** Lead in residential soils: sources, testing, and reducing exposure. Pennsylvania State University, College of Agricultural Sciences, Cooperative Extension. <https://extension.psu.edu/lead-in-residential-soils-sources-testing-and-reducing-exposure>

Stevenson, AJ. 1982. Humus Chemistry. John Wiley & Son, New York.

Sun, HJ., Rathinasabapathi, B., Wu, B., Luo, J., Pu, LP., Ma, LQ. 2014. Arsenic and selenium toxicity and their interactive effects in humans. *Environ Int.* 69:148-158.

Suzuki, T., Niinae, M., Koga, T., Akita, T., Ohta, M., Choso, T. 2014. EDDS-enhanced electrokinetic remediation of heavy metal-contaminated clay soils under neutral pH conditions. *Colloid. Surf. Physicochem. Eng. Asp.* 440:145-150.

Tanno, K., Willcox, G. 2006. The origins of cultivation of *Cicer arietinum* L. and *Vicia faba* L.: early finds from Tell el-Kerkh, north-west Syria, late 10th millennium B.P. *Veget. Hist. Archaeobot.* 15:197-204.

Tanouayi, G., Gnandi, K., Ahoudi, H., Ouro-Sama, K. 2015. La contamination métallique des eaux de surface et des eaux souterraines de la zone minière d'exploitation des phosphates de Hahotoe-Kpogame (sud-Togo) : cas du cadmium, plomb, cuivre et nickel. *Larhyss Journal, ISSN 1112-3680.* 21:25-40.

Tchounwou, PB., Yedjou, CG., Patlolla, AK., Sutton, DJ. 2012. Heavy Metals Toxicity and the Environment. *Experientia supplementum.* 101:133-164. doi:[10.1007/978-3-7643-8340-4_6](https://doi.org/10.1007/978-3-7643-8340-4_6).

Tellez-Plaza, M., Navas-Acien, A., Menke, A., Crainiceanu, CM., Pastor-Barriuso, R., Guallar, E. 2012. Cadmium exposure and all-cause and cardiovascular mortality in the US general population. *Environ Health Persp.* 120:1017-1022.

Thomas, C., Butler, A., Larson, S., Medina, V., Begonia, M. 2014. Complexation of lead by bermuda grass root exudates in aqueous media. *International Journal of Phytoremediation.* 16:634-640. DOI: 10.1080/15226514.2013.803023.

Thomé, OW. 1885. Flora von Deutschland, Österreich und der Schweiz Gera, Germany. http://www.biolib.de/thome/band3/tafel_132.html

Tipping, E., Fitch, A., Stevenson, FJ. 1995. Proton and copper binding by humic acid: application of a discrete-site/electrostatic ion-binding model. *European Journal of Soil Science* 46: 95-101.

Tomulescu, I., Radoviciu, E., Merca, V., Tuduce, A. 2004. Effect of copper, zinc and lead and their combinations on the germination capacity of two cereals. *Journal of agricultural sciences.* 15:39-42.

Topçu, G., Ay, M., Bilici, A., Sarıkürkcü, C., Öztürk, M., Ulubelen, A. 2007. A new flavone from antioxidant extracts of *Pistacia terebinthus*. *Food Chemistry.* 103:816-822.

Toppi, SDS., Gabbrielli, R. 1999. Response to cadmium in higher plants. *Environmental and Experimental Botany.* 41:105-130.

Tremel-Schaub, A., Feix, I. 2005. Contamination des sols Transferts des sols vers les plantes. EDP Sciences, ADEME Éditions, p 413.

- Troll, W., Lindsley, J.1955.** A photometric method for the determination of proline; *J.Biochem.* 655-660.
- Tung, G., Temple, PJ.1996.** Uptake and localization of lead in corn (*Zea mays* L.) seedlings, a study by histochemical and electron microscopy. *The Science of the Total Environment.* 188:71-85.
- UNEP, 2010.** United Nations Environment Programme. Keys scientific findings for Lead: an excerpt from final review of scientific information on lead, version of December 2010.
- Van Assche, F., Clijsters, H. 1990.** Effects of metals on enzyme activity in plants. *Plant cell and Environment.* 13:195-206.
- Vassil, AD., Kapulnik, Y., Raskin, I., Salt, DE.1998.** The Role of EDTA in Lead Transport and Accumulation by Indian Mustard. *Plant Physiology.* 117(2):447-453.
- Verma, S., Dubey, RS.2001.** Effect of cadmium on soluble sugars and enzymes of their metabolism in rice. *Biol. Planta.* 44:117-123.
- Vogel-Mikus, K., Drobne, D., Regvar, M.2005.** Zn, Cd and Pb accumulation and arbuscular mycorrhizal colonisation of pennycress *Thlaspi praecox* Wulf. (Brassicaceae) from the vicinity of a lead mine and smelter in Slovenia. *Environmental Pollution.* 133:233-242. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2004.06.021>.
- Wang, HQ., Lu, SJ., Li, H., Yao, ZH. 2007.** EDTA-enhanced phytoremediation of lead contaminated soil by *Bidens maximowicziana*. *J. Environ. Sci.* 19:1496-1499.
- Wang, J., Li, W., Zhang, C., Ke, S. 2010.** Physiological responses and detoxification mechanisms to Pb, Zn, Cu and Cd in young seedlings of *Paulownia fortunei*. *Journal of Environmental Sciences.* 22(12):1916-1922.
- Wang, J., Chen, J., Pan, K. 2013.** Effect of exogenous abscisic acid on the level of antioxidants in *Atractylodes macrocephala* Koidz under lead stress. *Environ Sci Pollut Res.* 20:1441-1449.
- Weryszko-Chmielewska, E., Chwil, M., 2005.** Lead-Induced histological and ultrastructural changes in the leaves of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 51:203-212.
- Wierzbicka, M., Obidzinska, J.1998.** The effect of lead on seed imbibition and germination in different plant species. *Plant Science.* 137(2):155-171.
- Wierzbicka, M. 1999a.** Comparison of lead tolerance in *Allium cepa* with other plant species. *Environmental Pollution.* 104(1):41-52.
- Wierzbicka, M.1999b.** The effect of lead on the cell cycle in the root meristem of *Allium cepa* L. *Protoplasma.* 207(3):186-194.

- Wińska-Krysiak, M., Koropacka, K., Gawroński, S. 2015.** Determination of the tolerance of sunflower to lead-induced stress. *J. Elem.* 20(2):491-502. DOI:10.5601/jelem.2014.19.4.721.
- Wiszniewska, A., Muszyńska, E., Hanus-Fajerska, E., Smoleń, S., Dziurka, M., Dziurka, K. 2017.** Organic amendments enhance Pb tolerance and accumulation during micropropagation of *Daphne jasminea*. *Environ Sci Pollut Res.* 24:2421-2432. DOI 10.1007/s11356-016-7977-2.
- Wong, CM., Cheema, AK., Zhang, L., Suzuki, YJ.2008.** Protein carbonylation as a novel mechanism in redox signaling. *Circulation Research.* 102(3):310-318.
- Wood, CM.2012.** An introduction to metals in fish physiology and toxicology: basic principles. In: Wood, C.M., Farrell, A.P., Brauner, C.J. (Eds.), *Fish Physiology. 31A: Homeostasis and Toxicology of Essential Metals*. Academic Press, New York, pp.1-53.
- Wozny, A., Schneider, J., Gwozdz, EA.1995.** The effects of lead and kinetin on greening barley leaves. *Biologia Plantarum.* 37(4):541-552.
- Xin, J., Huang, B., Dai, H., Zhou, W., Yi, Y., Peng, L. 2015.** Roles of rhizosphere and root-derived organic acids in Cd accumulation by two hot pepper cultivars. *Environ Sci Pollut Res.* 22:6254-6261
- Xiong, ZT.1997.** Bioaccumulation and physiological effects of excess lead in a roadside pioneer species *Sonchus oleraceus* L. *Environmental Pollution.* 97(3): 275-279.
- Xiong, Z., Zhao, J., Li, M.2006.** Lead toxicity in *Brassica pekinensis* Rupr.: Effect on nitrate assimilation and growth. *Environmental Toxicology.* 21(2):147-153.
- Yadav, S.2010.** Heavy metals toxicity in plants: An overview on the role of glutathione and phytochelatins in heavy metal stress tolerance of plants. *S Afr J Bot.* 76(2):167-179.
- Yan, ZZ., Ke, L., Tam, NFY.2010.** Pb stress in seedlings of *Avicennia marina*, a common mangrove species in South China, with and without cotyledons. *Aquat Bot.* 92(2):112- 118.
- Yang, Z., Liu, S., Zheng, D., Feng, S. 2006.** Effects of cadmium, zinc, and lead on soil enzyme activities. *J Environ Sci.* 18:1135-1141.
- Yang, Y., Wei, X., Lu, J., You, J., Wang, W., Shi, R.2010.** Lead-induced phytotoxicity mechanism involved in seed germination and seedling growth of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Ecotox Environ Safet.* 73:1982-1987.
- Yang, X., Yang, S., Yang, S., Hu, J., Tan, X., Wang, X. 2011a.** Effect of pH, ionic strength and temperature on sorption of Pb(II) on NKF-6 zeolite studied by batch technique. *Chem. Eng. J.* 168:86-93.
- Yang, Y., Zhang, Y., Wei, X., You, J., Wang, W., Lu, J., Shi, R.2011b.** Comparative antioxidative responses and proline metabolism in two wheat cultivars under short term lead stress. *Ecotoxicol Environ Saf.* 74:733-740.

Zhang, H., Zhang, S., Meng, Q., Zou, J., Jiang, W., Liu, D. 2009. Effects of aluminum on nucleoli in root tip cells, root growth and the antioxidant defense system in *Vicia faba* L. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*. 51(2):99-106.

Zheljaskov, VD., Craker, LE., Xing, B.2006. Effects of Cd, Pb, and Cu on growth and essential oil contents in dill, peppermint, and basil. *Environmental and Experimental Botany* 58(1-3):9-16.

Zheng, N., Wang, Q., Zheng, D.2007. Health risk of Hg, Pb, Cd, Zn and Cu to the inhabitants around Huludao Zinc Plant in China via consumption of vegetables. *The Science of the Total Environment*. 383(1-3):81-89.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2007.05.002>

Zhou, C., Huang, M., Li, Y., Luo, J., Cai, LP.2016. Changes in subcellular distribution and antioxidant compounds involved in Pb accumulation and detoxification in *Neyraudia reynaudiana*. *Environ Sci Pollut Res*. 23:21794-21804.<https://doi.org/10.1007/s11356-016-7362-1>

Zulfiqara, U., Farooqa, M., Hussaina, S., Maqsooda, M., Hussaind, M., Ishfaq, M., Ahmada, M., Anjum, MZ. 2019. Lead toxicity in plants: Impacts and remediation. *Journal of Environmental Management* 250 (2019) 109557.
<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.109557>.

Annexes

Annexe 1 : L'analyse de la variance ANOVA (2 facteurs)

Table Analyzed N Feuilles
 Matching: Both
 Two-way RM ANOVA factors
 Alpha 0.05

Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?
Pb Factor	22.18	0.0559	ns	No
Variete Factor	8.125	0.0860	ns	No
Interaction: Pb Factor x Variete Factor	4.077	0.7406	ns	No
Interaction: Pb Factor x Subjects	25.84			
Interaction: Variete Factor x Subjects	3.833			
Subjects	14.9			

ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Pb Factor	147.5	6	24.58	F (6, 18) = 2.575	P=0.0559
Variete Factor	54.02	1	54.02	F (1, 3) = 6.359	P=0.0860
Interaction: Pb Factor x Variete Factor	27.11	6	4.518	F (6, 18) = 0.5813	P=0.7406
Interaction: Pb Factor x Subjects	171.8	18	9.546		
Interaction: Variete Factor x Subjects	25.48	3	8.494		
Subjects	99.05	3	33.02		
Residual	139.9	18	7.772		

Table Analyzed Haut Tige cm
 Matching: Both factors
 Two-way RM ANOVA
 Alpha 0.05

Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?
Pb Factor	19.68	0.1277	ns	No
Variete Factor	8.06	0.0297	*	Yes
Interaction: Pb Factor x Variete Factor	3.078	0.9384	ns	No
Interaction: Pb Factor x Subjects	30.32			
Interaction: Variete Factor x Subjects	1.582			
Subjects	4.459			

ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Pb Factor	692.2	6	115.4	F (6, 18) = 1.947	P=0.1277
Variete Factor	283.5	1	283.5	F (1, 3) = 15.28	P=0.0297
Interaction: Pb Factor x Variete Factor	108.3	6	18.04	F (6, 18) = 0.2813	P=0.9384
Interaction: Pb Factor x Subjects	1066	18	59.24		
Interaction: Variete Factor x Subjects	55.64	3	18.55		
Subjects	156.9	3	52.29		
Residual	1155	18	64.14		

Table Analyzed Volu Racine ml
 Two-way RM ANOVA Matching: Both factors
 Alpha 0.05

Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?
Pb Factor	81.08	<0.0001	****	Yes
Variete Factor	1.064	0.0782	ns	No
Interaction: Pb Factor x Variete Factor	1.315	0.6696	ns	No
Interaction: Pb Factor x Subjects	9.713			
Interaction: Variete Factor x Subjects	0.4609			
Subjects	0.5508			

ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Pb Factor	4705	6	784.1	F (6, 18) = 25.04	P<0.0001
Variete Factor	61.74	1	61.74	F (1, 3) = 6.925	P=0.0782
Interaction: Pb Factor x Variete Factor	76.28	6	12.71	F (6, 18) = 0.6776	P=0.6696
Interaction: Pb Factor x Subjects	563.6	18	31.31		
Interaction: Variete Factor x Subjects	26.75	3	8.915		
Subjects	31.96	3	10.65		
Residual	337.7	18	18.76		

Table Analyzed Surf Fol cm2
 Two-way RM ANOVA Matching: Both factors
 Alpha 0.05

Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?
Pb Factor	69.61	<0.0001	****	Yes
Variete Factor	1.336	0.1268	ns	No
Interaction: Pb Factor x Variete Factor	5.282	0.3310	ns	No
Interaction: Pb Factor x Subjects	9.671			
Interaction: Variete Factor x Subjects	0.9103			
Subjects	0.4421			

ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Pb Factor	2725	6	454.1	F (6, 18) = 21.6	P<0.0001
Variete Factor	52.29	1	52.29	F (1, 3) = 4.403	P=0.1268
Interaction: Pb Factor x Variete Factor	206.7	6	34.46	F (6, 18) = 1.243	P=0.3310
Interaction: Pb Factor x Subjects	378.5	18	21.03		
Interaction: Variete Factor x Subjects	35.63	3	11.88		
Subjects	17.3	3	5.768		
Residual	498.9	18	27.72		

Table Analyzed PSPR g
 Two-way RM ANOVA Matching Both Factors
 Alpha 0.05

Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?
Pb Factor	68.37	<0.0001	****	Yes
Variete Factor	0.07947	0.7542	ns	No
Interaction: Pb Factor x Variete Factor	10.21	0.0049	**	Yes
Interaction: Pb Factor x Subjects	11.86			
Interaction: Variete Factor x Subjects	2.026			
Subjects	0.9134			

ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Pb Factor	63.8	6	10.63	F (6, 18) = 17.29	P<0.0001
Variete Factor	0.07416	1	0.07416	F (1, 3) = 0.1177	P=0.7542
Interaction: Pb Factor x Variete Factor	9.529	6	1.588	F (6, 18) = 4.691	P=0.0049
Interaction: Pb Factor x Subjects	11.07	18	0.6151		
Interaction: Variete Factor x Subjects	1.891	3	0.6302		
Subjects	0.8523	3	0.2841		
Residual	6.094	18	0.3386		

Table Analyzed PSPA g
 Two-way RM ANOVA Matching: Both factors
 Alpha 0.05

Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?
Pb Factor	63.77	<0.0001	****	Yes
Variete Factor	0.03622	0.8398	ns	No
Interaction: Pb Factor x Variete Factor	3.751	0.5325	ns	No
Interaction: Pb Factor x Subjects	14.48			
Interaction: Variete Factor x Subjects	2.24			
Subjects	2.859			

ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Pb Factor	262.6	6	43.77	F (6, 18) = 13.21	P<0.0001
Variete Factor	0.1492	1	0.1492	F (1, 3) = 0.04851	P=0.8398
Interaction: Pb Factor x Variete Factor	15.45	6	2.575	F (6, 18) = 0.8746	P=0.5325
Interaction: Pb Factor x Subjects	59.63	18	3.313		
Interaction: Variete Factor x Subjects	9.225	3	3.075		
Subjects	11.78	3	3.925		
Residual	52.99	18	2.944		

Table Analyzed RWC %
 Two-way RM ANOVA Matching: Both factors
 Alpha 0.05

Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?
Pb Factor	37.51	0.0173	*	Yes
Variete Factor	0.9074	0.2867	ns	No
Interaction: Pb Factor x Variete Factor	1.311	0.9832	ns	No
Interaction: Pb Factor x Subjects	31.86			
Interaction: Variete Factor x Subjects	1.629			
Subjects	2.81			

ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Pb Factor	1455	6	242.5	F (6, 18) = 3.531	P=0.0173
Variete Factor	35.2	1	35.2	F (1, 3) = 1.671	P=0.2867
Interaction: Pb Factor x Variete Factor	50.86	6	8.477	F (6, 18) = 0.164	P=0.9832
Interaction: Pb Factor x Subjects	1236	18	68.67		
Interaction: Variete Factor x Subjects	63.21	3	21.07		
Subjects	109	3	36.33		
Residual	930.1	18	51.67		

Table Analyzed Cloro A
 Two-way RM ANOVA Matching: Both factors
 Alpha 0.05

Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?
Pb Factor	67.5	<0.0001	****	Yes
Variete Factor	7.165	0.0216	*	Yes
Interaction: Pb Factor x Variete Factor	1.628	0.7743	ns	No
Interaction: Pb Factor x Subjects	10.22			
Interaction: Variete Factor x Subjects	1.106			
Subjects	3.264			

ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Pb Factor	5.276	6	0.8793	F (6, 18) = 19.81	P<0.0001
Variete Factor	0.5601	1	0.5601	F (1, 3) = 19.44	P=0.0216
Interaction: Pb Factor x Variete Factor	0.1273	6	0.02121	F (6, 18) = 0.5355	P=0.7743
Interaction: Pb Factor x Subjects	0.7988	18	0.04438		
Interaction: Variete Factor x Subjects	0.08644	3	0.02881		
Subjects	0.2551	3	0.08504		
Residual	0.7129	18	0.03961		

Table Analyzed Cloro B
 Two-way RM ANOVA Matching: Both factors
 Alpha 0.05

Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?
Pb Factor	79.29	<0.0001	****	Yes
Variete Factor	0.1362	0.6570	ns	No
Interaction: Pb Factor x Variete Factor	4.335	0.0436	*	Yes
Interaction: Pb Factor x Subjects	7.806			
Interaction: Variete Factor x Subjects	1.693			
Subjects	2.039			

ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Pb Factor	2.903	6	0.4839	F (6, 18) = 30.48	P<0.0001
Variete Factor	0.004986	1	0.004986	F (1, 3) = 0.2412	P=0.6570
Interaction: Pb Factor x Variete Factor	0.1587	6	0.02646	F (6, 18) = 2.77	P=0.0436
Interaction: Pb Factor x Subjects	0.2858	18	0.01588		
Interaction: Variete Factor x Subjects	0.06201	3	0.02067		
Subjects	0.07466	3	0.02489		
Residual	0.1719	18	0.009551		

Table Analyzed Caroten
 Two-way RM ANOVA Matching: Both factors
 Alpha 0.05

Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?
Pb Factor	16.41	0.1011	ns	No
Variete Factor	40.9	0.0049	**	Yes
Interaction: Pb Factor x Variete Factor	1.67	0.9072	ns	No
Interaction: Pb Factor x Subjects	23.21			
Interaction: Variete Factor x Subjects	2.177			
Subjects	0.8557			

ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Pb Factor	0.11	6	0.01833	F (6, 18) = 2.122	P=0.1011
Variete Factor	0.2741	1	0.2741	F (1, 3) = 56.35	P=0.0049
Interaction: Pb Factor x Variete Factor	0.01119	6	0.001866	F (6, 18) = 0.3389	P=0.9072
Interaction: Pb Factor x Subjects	0.1555	18	0.00864		
Interaction: Variete Factor x Subjects	0.01459	3	0.004864		
Subjects	0.005735	3	0.001912		
Residual	0.09908	18	0.005504		

Table Analyzed Protéines (mg/g)
 Two-way RM ANOVA Matching: Both factors
 Alpha 0.05

Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?
Pb Factor	95.65	<0.0001	****	Yes
Vartirte Factor	0.02126	0.2470	ns	No
Interaction: Pb Factor x Vartirte Factor	3.927	<0.0001	****	Yes
Interaction: Pb Factor x Subjects	0.2197			
Interaction: Vartirte Factor x Subjects	0.03101			
Subjects	0.009139			

ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Pb Factor	5791	6	965.2	F (6, 18) = 1306	P<0.0001
Vartirte Factor	1.287	1	1.287	F (1, 3) = 2.057	P=0.2470
Interaction: Pb Factor x Vartirte Factor	237.7	6	39.62	F (6, 18) = 85.27	P<0.0001
Interaction: Pb Factor x Subjects	13.3	18	0.7388		
Interaction: Vartirte Factor x Subjects	1.878	3	0.6259		
Subjects	0.5533	3	0.1844		
Residual	8.364	18	0.4647		

Table Analyzed TFC (µg/mg MS)
 Two-way RM ANOVA Matching: Both factors
 Alpha 0.05

Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?
Pb Factor	97.86	<0.0001	****	Yes
Vartirte Factor	0.177	0.0121	*	Yes
Interaction: Pb Factor x Vartirte Factor	0.5084	0.0615	ns	No
Interaction: Pb Factor x Subjects	0.779			
Interaction: Vartirte Factor x Subjects	0.01789			
Subjects	0.04954			

ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Pb Factor	17159	6	2860	F (6, 18) = 376.9	P<0.0001
Vartirte Factor	31.03	1	31.03	F (1, 3) = 29.68	P=0.0121
Interaction: Pb Factor x Vartirte Factor	89.14	6	14.86	F (6, 18) = 2.5	P=0.0615
Interaction: Pb Factor x Subjects	136.6	18	7.588		
Interaction: Vartirte Factor x Subjects	3.137	3	1.046		
Subjects	8.686	3	2.895		
Residual	106.9	18	5.942		

Table Analyzed TPC (µg/mg MS)
 Two-way RM ANOVA Matching: Both factors
 Alpha 0.05

Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?
Pb Factor	95.25	<0.0001	****	Yes
Vartirte Factor	0.8091	0.0811	ns	No
Interaction: Pb Factor x Vartirte Factor	1.066	0.0244	*	Yes
Interaction: Pb Factor x Subjects	1.195			
Interaction: Vartirte Factor x Subjects	0.3619			
Subjects	0.3278			

ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Pb Factor	104343	6	17390	F (6, 18) = 239.1	P<0.0001
Vartirte Factor	886.3	1	886.3	F (1, 3) = 6.708	P=0.0811
Interaction: Pb Factor x Vartirte Factor	1167	6	194.5	F (6, 18) = 3.241	P=0.0244
Interaction: Pb Factor x Subjects	1309	18	72.73		
Interaction: Vartirte Factor x Subjects	396.4	3	132.1		
Subjects	359.1	3	119.7		
Residual	1081	18	60.03		

Table Analyzed POD(DO 450/mg Proteine)
 Two-way RM ANOVA Matching: Both factors
 Alpha 0.05

Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?
Pb Factor	95.94	<0.0001	****	Yes
Vartirte Factor	0.08453	0.0009	***	Yes
Interaction: Pb Factor x Vartirte Factor	2.01	<0.0001	****	Yes
Interaction: Pb Factor x Subjects	1.42			
Interaction: Vartirte Factor x Subjects	0.001378			
Subjects	0.3443			

ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Pb Factor	0.01757	6	0.002929	F (6, 18) = 202.8	P<0.0001
Vartirte Factor	1.548e-005	1	1.548e-005	F (1, 3) = 184.1	P=0.0009
Interaction: Pb Factor x Vartirte Factor	0.0003681	6	6.135e-005	F (6, 18) = 30.55	P<0.0001
Interaction: Pb Factor x Subjects	0.00026	18	1.445e-005		
Interaction: Vartirte Factor x Subjects	2.523e-007	3	8.411e-008		
Subjects	6.306e-005	3	2.102e-005		
Residual	3.615e-005	18	2.008e-006		

Table Analyzed CAT(DO 240/mg
Proteine)
Two-way RM ANOVA Matching: Both factors
Alpha 0.05

Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?
Pb Factor	93.63	<0.0001	****	Yes
Vartirte Factor	0.3937	0.0111	*	Yes
Interaction: Pb Factor x Vartirte Factor	3.824	<0.0001	****	Yes
Interaction: Pb Factor x Subjects	1.057			
Interaction: Vartirte Factor x Subjects	0.03741			
Subjects	0.2808			

ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Pb Factor	0.4412	6	0.07353	F (6, 18) = 265.7	P<0.0001
Vartirte Factor	0.001855	1	0.001855	F (1, 3) = 31.57	P=0.0111
Interaction: Pb Factor x Vartirte Factor	0.01802	6	0.003003	F (6, 18) = 14.78	P<0.0001
Interaction: Pb Factor x Subjects	0.004982	18	0.0002768		
Interaction: Vartirte Factor x Subjects	0.0001763	3	5.876e-005		
Subjects	0.001323	3	0.000441		
Residual	0.003657	18	0.0002032		

Table Analyzed Pb (mg/g)
Two-way RM ANOVA Matching: Both factors
Alpha 0.05

Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?
Pb Factor	99.22	<0.0001	****	Yes
Vartirte Factor	0.08636	0.3140	ns	No
Interaction: Pb Factor x Vartirte Factor	0.2864	0.0175	*	Yes
Interaction: Pb Factor x Subjects	0.1494			
Interaction: Vartirte Factor x Subjects	0.09715			
Subjects	0.02395			

ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Pb Factor	2.224	6	0.3706	F (6, 12) = 1328	P<0.0001
Vartirte Factor	0.001935	1	0.001935	F (1, 2) = 1.778	P=0.3140
Interaction: Pb Factor x Vartirte Factor	0.006417	6	0.00107	F (6, 12) = 4.134	P=0.0175
Interaction: Pb Factor x Subjects	0.003348	12	0.000279		
Interaction: Vartirte Factor x Subjects	0.002177	2	0.001089		
Subjects	0.0005368	2	0.0002684		
Residual	0.003104	12	0.0002587		

Annexe 2 : Comparaison entre les moyennes (test de Dunnett)

Compare row means (main row effect)		Pb Concentration						
Number of families	1							
Number of comparisons per family	6							
Alpha	0.05							
Dunnett's multiple comparisons test	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value			
0 vs. 50	-0.05422	-0.08292 to -0.02551	Yes	***	0.0006			
0 vs. 100	-0.07717	-0.1059 to -0.04846	Yes	****	0.0001			
0 vs. 200	-0.1067	-0.1354 to -0.07796	Yes	****	0.0001			
0 vs. 500	-0.2317	-0.2604 to -0.2029	Yes	****	0.0001			
0 vs. 1000	-0.3565	-0.3852 to -0.3278	Yes	****	0.0001			
0 vs. 2000	-0.7126	-0.7413 to -0.6839	Yes	****	0.0001			
Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff.	SE of diff.	N1	N2	q	DF
0 vs. 50	0	0.05422	-0.05422	0.009643	6	6	5.622	12
0 vs. 100	0	0.07717	-0.07717	0.009643	6	6	8.002	12
0 vs. 200	0	0.1067	-0.1067	0.009643	6	6	11.06	12
0 vs. 500	0	0.2317	-0.2317	0.009643	6	6	24.02	12
0 vs. 1000	0	0.3565	-0.3565	0.009643	6	6	36.97	12
0 vs. 2000	0	0.7126	-0.7126	0.009643	6	6	73.9	12
Compare row means (main row effect)		TFC						
Number of families	1							
Number of comparisons per family	6							
Alpha	0.05							
Dunnett's multiple comparisons test	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value			
0 vs. 50	-0.2614	-4.159 to 3.636	No	ns	0.9997			
0 vs. 100	-1.95	-5.847 to 1.948	No	ns	0.5449			
0 vs. 200	-7.886	-11.78 to -3.988	Yes	***	0.0001			
0 vs. 500	-18.46	-22.36 to -14.56	Yes	****	0.0001			
0 vs. 1000	-27.01	-30.9 to -23.11	Yes	****	0.0001			
0 vs. 2000	-51.42	-55.31 to -47.52	Yes	****	0.0001			
Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff.	SE of diff.	N1	N2	q	DF
0 vs. 50	7.682	7.944	-0.2614	1.377	8	8	0.1898	18
0 vs. 100	7.682	9.632	-1.95	1.377	8	8	1.416	18
0 vs. 200	7.682	15.57	-7.886	1.377	8	8	5.725	18
0 vs. 500	7.682	26.14	-18.46	1.377	8	8	13.4	18
0 vs. 1000	7.682	34.69	-27.01	1.377	8	8	19.61	18
0 vs. 2000	7.682	59.1	-51.42	1.377	8	8	37.33	18

Compare row means (main row effect)

TPC

Number of families 1
 Number of comparisons per family 6
 Alpha 0.05

Dunnett's multiple comparisons test	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value
0 vs. 50	-1.675	-13.74 to 10.39	No	ns	0.9967
0 vs. 100	-8.235	-20.3 to 3.831	No	ns	0.2607
0 vs. 200	-53.6	-65.66 to -41.53	Yes	****	0.0001
0 vs. 500	-77.74	-89.81 to -65.68	Yes	****	0.0001
0 vs. 1000	-93.32	-105.4 to -81.26	Yes	****	0.0001
0 vs. 2000	-111.7	-123.8 to -99.63	Yes	****	0.0001

Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff.	SE of diff.	N1	N2	q	DF
0 vs. 50	35.33	37.01	-1.675	4.264	8	8	0.3928	18
0 vs. 100	35.33	43.57	-8.235	4.264	8	8	1.931	18
0 vs. 200	35.33	88.93	-53.6	4.264	8	8	12.57	18
0 vs. 500	35.33	113.1	-77.74	4.264	8	8	18.23	18
0 vs. 1000	35.33	128.7	-93.32	4.264	8	8	21.89	18
0 vs. 2000	35.33	147	-111.7	4.264	8	8	26.19	18

Compare row means (main row effect)

POD

Number of families 1
 Number of comparisons per family 6
 Alpha 0.05

Dunnett's multiple comparisons test	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value
0 vs. 50	0.0004211	-0.004957 to 0.005799	No	ns	0.9997
0 vs. 100	-0.0005781	-0.005956 to 0.0048	No	ns	0.9996
0 vs. 200	-0.001251	-0.006629 to 0.004127	No	ns	0.9640
0 vs. 500	-0.01952	-0.0249 to -0.01414	Yes	****	0.0001
0 vs. 1000	-0.03285	-0.03823 to -0.02747	Yes	****	0.0001
0 vs. 2000	-0.04664	-0.05202 to -0.04126	Yes	****	0.0001

Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff.	SE of diff.	N1	N2	q	DF
0 vs. 50	0.01608	0.01566	0.0004211	0.0019	8	8	0.2216	18
0 vs. 100	0.01608	0.01666	-0.0005781	0.0019	8	8	0.3042	18
0 vs. 200	0.01608	0.01733	-0.001251	0.0019	8	8	0.6582	18
0 vs. 500	0.01608	0.0356	-0.01952	0.0019	8	8	10.27	18
0 vs. 1000	0.01608	0.04893	-0.03285	0.0019	8	8	17.28	18
0 vs. 2000	0.01608	0.06272	-0.04664	0.0019	8	8	24.54	18

Compare row means (main row effect)

CAT

Number of families 1
 Number of comparisons per family 6
 Alpha 0.05

Dunnett's multiple comparisons test	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value
0 vs. 50	-0.002138	-0.02568 to 0.0214	No	ns	0.9996
0 vs. 100	-0.01299	-0.03653 to 0.01055	No	ns	0.4522
0 vs. 200	-0.01258	-0.03611 to 0.01096	No	ns	0.4829
0 vs. 500	-0.1149	-0.1384 to -0.09136	Yes	****	0.0001
0 vs. 1000	-0.1722	-0.1957 to -0.1486	Yes	****	0.0001
0 vs. 2000	-0.2348	-0.2583 to -0.2112	Yes	****	0.0001

Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff.	SE of diff.	N1	N2	q	DF
0 vs. 50	0.08008	0.08221	-0.002138	0.008318	8	8	0.257	18
0 vs. 100	0.08008	0.09306	-0.01299	0.008318	8	8	1.561	18
0 vs. 200	0.08008	0.09265	-0.01258	0.008318	8	8	1.512	18
0 vs. 500	0.08008	0.195	-0.1149	0.008318	8	8	13.81	18
0 vs. 1000	0.08008	0.2523	-0.1722	0.008318	8	8	20.7	18
0 vs. 2000	0.08008	0.3148	-0.2348	0.008318	8	8	28.22	18

Compare row means (main row effect)

Protéines

Number of families 1
 Number of comparisons per family 6
 Alpha 0.05

Dunnett's multiple comparisons test	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value
0 vs. 50	2.72	1.504 to 3.936	Yes	****	0.0001
0 vs. 100	5.395	4.179 to 6.611	Yes	****	0.0001
0 vs. 200	3.939	2.723 to 5.155	Yes	****	0.0001
0 vs. 500	16.64	15.42 to 17.86	Yes	****	0.0001
0 vs. 1000	22.95	21.74 to 24.17	Yes	****	0.0001
0 vs. 2000	27.71	26.49 to 28.93	Yes	****	0.0001

Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff.	SE of diff.	N1	N2	q	DF
0 vs. 50	41.49	38.77	2.72	0.4298	8	8	6.329	18
0 vs. 100	41.49	36.09	5.395	0.4298	8	8	12.55	18
0 vs. 200	41.49	37.55	3.939	0.4298	8	8	9.165	18
0 vs. 500	41.49	24.85	16.64	0.4298	8	8	38.72	18
0 vs. 1000	41.49	18.54	22.95	0.4298	8	8	53.4	18
0 vs. 2000	41.49	13.78	27.71	0.4298	8	8	64.47	18

Compare row means (main row effect)

Chlorophyll A

Number of families 1
 Number of comparisons per family 6
 Alpha 0.05

Dunnett's multiple comparisons test	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value
0 vs. 50	0.1913	-0.1068 to 0.4893	No	ns	0.3129
0 vs. 100	0.5098	0.2117 to 0.8078	Yes	***	0.0007
0 vs. 200	0.7121	0.414 to 1.01	Yes	****	0.0001
0 vs. 500	0.7244	0.4263 to 1.022	Yes	****	0.0001
0 vs. 1000	0.8164	0.5183 to 1.114	Yes	****	0.0001
0 vs. 2000	0.8649	0.5668 to 1.163	Yes	****	0.0001

Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff.	SE of diff.	N1	N2	q	DF
0 vs. 50	1.196	1.004	0.1913	0.1053	8	8	1.816	18
0 vs. 100	1.196	0.6859	0.5098	0.1053	8	8	4.84	18
0 vs. 200	1.196	0.4836	0.7121	0.1053	8	8	6.76	18
0 vs. 500	1.196	0.4713	0.7244	0.1053	8	8	6.877	18
0 vs. 1000	1.196	0.3793	0.8164	0.1053	8	8	7.751	18
0 vs. 2000	1.196	0.3308	0.8649	0.1053	8	8	8.211	18

Compare row means (main row effect)

Chlorophyll B

Number of families 1
 Number of comparisons per family 6
 Alpha 0.05

Dunnett's multiple comparisons test	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value
0 vs. 50	0.2389	0.06064 to 0.4172	Yes	**	0.0066
0 vs. 100	0.3075	0.1292 to 0.4858	Yes	***	0.0007
0 vs. 200	0.5184	0.3401 to 0.6967	Yes	****	0.0001
0 vs. 500	0.5471	0.3688 to 0.7254	Yes	****	0.0001
0 vs. 1000	0.662	0.4837 to 0.8403	Yes	****	0.0001
0 vs. 2000	0.6581	0.4798 to 0.8364	Yes	****	0.0001

Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff.	SE of diff.	N1	N2	q	DF
0 vs. 50	0.8282	0.5893	0.2389	0.06301	8	8	3.792	18
0 vs. 100	0.8282	0.5207	0.3075	0.06301	8	8	4.881	18
0 vs. 200	0.8282	0.3098	0.5184	0.06301	8	8	8.228	18
0 vs. 500	0.8282	0.2811	0.5471	0.06301	8	8	8.684	18
0 vs. 1000	0.8282	0.1662	0.662	0.06301	8	8	10.51	18
0 vs. 2000	0.8282	0.1701	0.6581	0.06301	8	8	10.45	18

Compare row means (main row effect)

Caroténoïdes

Number of families 1
 Number of comparisons per family 6
 Alpha 0.05

Dunnett's multiple comparisons test	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value
0 vs. 50	0.02509	-0.1064 to 0.1566	No	ns	0.9858
0 vs. 100	0.04196	-0.08956 to 0.1735	No	ns	0.8718
0 vs. 200	0.03954	-0.09197 to 0.1711	No	ns	0.8966
0 vs. 500	0.08184	-0.04967 to 0.2134	No	ns	0.3401
0 vs. 1000	0.09694	-0.03458 to 0.2285	No	ns	0.2016
0 vs. 2000	0.1397	0.008149 to 0.2712	Yes	*	0.0350

Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff.	SE of diff.	N1	N2	q	DF
0 vs. 50	0.5554	0.5304	0.02509	0.04648	8	8	0.5399	18
0 vs. 100	0.5554	0.5135	0.04196	0.04648	8	8	0.9029	18
0 vs. 200	0.5554	0.5159	0.03954	0.04648	8	8	0.8509	18
0 vs. 500	0.5554	0.4736	0.08184	0.04648	8	8	1.761	18
0 vs. 1000	0.5554	0.4585	0.09694	0.04648	8	8	2.086	18
0 vs. 2000	0.5554	0.4158	0.1397	0.04648	8	8	3.005	18

Compare row means (main row effect)

Sucres Solubles

Number of families 1
 Number of comparisons per family 6
 Alpha 0.05

Dunnett's multiple comparisons test	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value
0 vs. 50	-0.06075	-0.2058 to 0.08427	No	ns	0.7003
0 vs. 100	-0.05288	-0.1979 to 0.09214	No	ns	0.7994
0 vs. 200	-0.1031	-0.2481 to 0.04189	No	ns	0.2282
0 vs. 500	-0.1588	-0.3038 to -0.01373	Yes	*	0.0290
0 vs. 1000	-0.3056	-0.4506 to -0.1606	Yes	****	0.0001
0 vs. 2000	-0.3861	-0.5311 to -0.2411	Yes	****	0.0001

Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff.	SE of diff.	N1	N2	q	DF
0 vs. 50	0.084	0.1448	-0.06075	0.05125	8	8	1.185	18
0 vs. 100	0.084	0.1369	-0.05288	0.05125	8	8	1.032	18
0 vs. 200	0.084	0.1871	-0.1031	0.05125	8	8	2.012	18
0 vs. 500	0.084	0.2428	-0.1588	0.05125	8	8	3.098	18
0 vs. 1000	0.084	0.3896	-0.3056	0.05125	8	8	5.964	18
0 vs. 2000	0.084	0.4701	-0.3861	0.05125	8	8	7.535	18

Compare row means (main row effect)

Proline

Number of families 1
 Number of comparisons per family 6
 Alpha 0.05

Dunnett's multiple comparisons test	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value
0 vs. 50	-0.2399	-1.294 to 0.8147	No	ns	0.9675
0 vs. 100	-0.4544	-1.509 to 0.6002	No	ns	0.6775
0 vs. 200	-0.6389	-1.693 to 0.4157	No	ns	0.3645
0 vs. 500	-0.8936	-1.948 to 0.1609	No	ns	0.1154
0 vs. 1000	-2.02	-3.075 to -0.9655	Yes	***	0.0002
0 vs. 2000	-2.825	-3.88 to -1.771	Yes	****	0.0001

Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff.	SE of diff.	N1	N2	q	DF
0 vs. 50	1.149	1.389	-0.2399	0.3727	8	8	0.6437	18
0 vs. 100	1.149	1.603	-0.4544	0.3727	8	8	1.219	18
0 vs. 200	1.149	1.788	-0.6389	0.3727	8	8	1.714	18
0 vs. 500	1.149	2.043	-0.8936	0.3727	8	8	2.398	18
0 vs. 1000	1.149	3.169	-2.02	0.3727	8	8	5.421	18
0 vs. 2000	1.149	3.974	-2.825	0.3727	8	8	7.582	18

Compare row means (main row effect)

RWC

Number of families 1
 Number of comparisons per family 6
 Alpha 0.05

Dunnett's multiple comparisons test	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value
0 vs. 50	8.008	-3.717 to 19.73	No	ns	0.2601
0 vs. 100	9.858	-1.867 to 21.58	No	ns	0.1196
0 vs. 200	13.26	1.537 to 24.99	Yes	*	0.0234
0 vs. 500	14.2	2.473 to 25.92	Yes	*	0.0145
0 vs. 1000	12.09	0.3624 to 23.81	Yes	*	0.0419
0 vs. 2000	16.92	5.2 to 28.65	Yes	**	0.0035

Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff.	SE of diff.	N1	N2	q	DF
0 vs. 50	85.56	77.56	8.008	4.143	8	8	1.933	18
0 vs. 100	85.56	75.71	9.858	4.143	8	8	2.379	18
0 vs. 200	85.56	72.3	13.26	4.143	8	8	3.201	18
0 vs. 500	85.56	71.37	14.2	4.143	8	8	3.427	18
0 vs. 1000	85.56	73.48	12.09	4.143	8	8	2.917	18
0 vs. 2000	85.56	68.64	16.92	4.143	8	8	4.085	18

Compare row means (main row effect)

Poids sec P.Aérienne

Number of families

1

Number of comparisons per family

6

Alpha

0.05

Dunnett's multiple comparisons test	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value
0 vs. 50	3.634	1.058 to 6.209	Yes	**	0.0043
0 vs. 100	4.353	1.778 to 6.928	Yes	***	0.0008
0 vs. 200	4.776	2.2 to 7.351	Yes	***	0.0003
0 vs. 500	5.19	2.615 to 7.765	Yes	***	0.0001
0 vs. 1000	5.906	3.331 to 8.481	Yes	****	0.0001
0 vs. 2000	7.546	4.971 to 10.12	Yes	****	0.0001

Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff.	SE of diff.	N1	N2	q	DF
0 vs. 50	11.3	7.664	3.634	0.91	8	8	3.993	18
0 vs. 100	11.3	6.945	4.353	0.91	8	8	4.783	18
0 vs. 200	11.3	6.522	4.776	0.91	8	8	5.248	18
0 vs. 500	11.3	6.107	5.19	0.91	8	8	5.703	18
0 vs. 1000	11.3	5.392	5.906	0.91	8	8	6.49	18
0 vs. 2000	11.3	3.752	7.546	0.91	8	8	8.292	18

Compare row means (main row effect)

Poids sec P.Racinaire

Number of families

1

Number of comparisons per family

6

Alpha

0.05

Dunnett's multiple comparisons test	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value
0 vs. 50	0.7195	-0.3901 to 1.829	No	ns	0.3038
0 vs. 100	1.041	-0.06857 to 2.151	No	ns	0.0707
0 vs. 200	1.497	0.3872 to 2.607	Yes	**	0.0063
0 vs. 500	2.446	1.336 to 3.556	Yes	****	0.0001
0 vs. 1000	2.681	1.571 to 3.79	Yes	****	0.0001
0 vs. 2000	3.166	2.056 to 4.275	Yes	****	0.0001

Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff.	SE of diff.	N1	N2	q	DF
0 vs. 50	4.126	3.406	0.7195	0.3921	8	8	1.835	18
0 vs. 100	4.126	3.085	1.041	0.3921	8	8	2.655	18
0 vs. 200	4.126	2.629	1.497	0.3921	8	8	3.817	18
0 vs. 500	4.126	1.68	2.446	0.3921	8	8	6.238	18
0 vs. 1000	4.126	1.445	2.681	0.3921	8	8	6.836	18
0 vs. 2000	4.126	0.9603	3.166	0.3921	8	8	8.073	18

Compare row means (main row effect)

Nombre de Feuilles

Number of families 1
 Number of comparisons per family 6
 Alpha 0.05

Dunnett's multiple comparisons test	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value
0 vs. 50	2.5	-1.872 to 6.872	No	ns	0.4182
0 vs. 100	2.875	-1.497 to 7.247	No	ns	0.2915
0 vs. 200	3.25	-1.122 to 7.622	No	ns	0.1955
0 vs. 500	4	-0.3715 to 8.372	No	ns	0.0803
0 vs. 1000	3.875	-0.4965 to 8.247	No	ns	0.0938
0 vs. 2000	5.75	1.378 to 10.12	Yes	**	0.0077

Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff.	SE of diff.	N1	N2	q	DF
0 vs. 50	17.38	14.88	2.5	1.545	8	8	1.618	18
0 vs. 100	17.38	14.5	2.875	1.545	8	8	1.861	18
0 vs. 200	17.38	14.13	3.25	1.545	8	8	2.104	18
0 vs. 500	17.38	13.38	4	1.545	8	8	2.589	18
0 vs. 1000	17.38	13.5	3.875	1.545	8	8	2.508	18
0 vs. 2000	17.38	11.63	5.75	1.545	8	8	3.722	18

Compare row means (main row effect)

Haut de Tige

Number of families 1
 Number of comparisons per family 6
 Alpha 0.05

Dunnett's multiple comparisons test	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value
0 vs. 50	2.875	-8.016 to 13.77	No	ns	0.9381
0 vs. 100	6	-4.891 to 16.89	No	ns	0.4536
0 vs. 200	5.5	-5.391 to 16.39	No	ns	0.5361
0 vs. 500	7.25	-3.641 to 18.14	No	ns	0.2813
0 vs. 1000	9.375	-1.516 to 20.27	No	ns	0.1075
0 vs. 2000	11.25	0.3594 to 22.14	Yes	*	0.0414

Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff.	SE of diff.	N1	N2	q	DF
0 vs. 50	53.25	50.38	2.875	3.849	8	8	0.747	18
0 vs. 100	53.25	47.25	6	3.849	8	8	1.559	18
0 vs. 200	53.25	47.75	5.5	3.849	8	8	1.429	18
0 vs. 500	53.25	46	7.25	3.849	8	8	1.884	18
0 vs. 1000	53.25	43.88	9.375	3.849	8	8	2.436	18
0 vs. 2000	53.25	42	11.25	3.849	8	8	2.923	18

Compare row means (main row effect)

Vol Racines

Number of families 1
 Number of comparisons per family 6
 Alpha 0.05

Dunnett's multiple comparisons test	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value
0 vs. 50	11.19	3.27 to 19.1	Yes	**	0.0042
0 vs. 100	11.56	3.645 to 19.48	Yes	**	0.0032
0 vs. 200	18.65	10.73 to 26.57	Yes	****	0.0001
0 vs. 500	23.43	15.51 to 31.34	Yes	****	0.0001
0 vs. 1000	24.94	17.02 to 32.85	Yes	****	0.0001
0 vs. 2000	28.35	20.43 to 36.27	Yes	****	0.0001

Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff.	SE of diff.	N1	N2	q	DF
0 vs. 50	35.16	23.98	11.19	2.798	8	8	3.999	18
0 vs. 100	35.16	23.6	11.56	2.798	8	8	4.133	18
0 vs. 200	35.16	16.51	18.65	2.798	8	8	6.666	18
0 vs. 500	35.16	11.74	23.43	2.798	8	8	8.373	18
0 vs. 1000	35.16	10.23	24.94	2.798	8	8	8.913	18
0 vs. 2000	35.16	6.813	28.35	2.798	8	8	10.13	18

Number of comparisons per family 6 Surf. Foliaire
 Alpha 0.05

Dunnett's multiple comparisons test	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value
0 vs. 50	3.52	-2.968 to 10.01	No	ns	0.4683
0 vs. 100	8.473	1.985 to 14.96	Yes	**	0.0082
0 vs. 200	11.39	4.901 to 17.88	Yes	***	0.0005
0 vs. 500	15.27	8.782 to 21.76	Yes	****	0.0001
0 vs. 1000	16.01	9.517 to 22.49	Yes	****	0.0001
0 vs. 2000	21.67	15.18 to 28.16	Yes	****	0.0001

Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff.	SE of diff.	N1	N2	q	DF
0 vs. 50	48.94	45.42	3.52	2.293	8	8	1.535	18
0 vs. 100	48.94	40.47	8.473	2.293	8	8	3.695	18
0 vs. 200	48.94	37.55	11.39	2.293	8	8	4.967	18
0 vs. 500	48.94	33.67	15.27	2.293	8	8	6.66	18
0 vs. 1000	48.94	32.94	16.01	2.293	8	8	6.98	18
0 vs. 2000	48.94	27.27	21.67	2.293	8	8	9.452	18

Annexe 03 : Régression linéaire

Best-fit values ± SE	POD	CAT	TPC	TFC	Protéines
Slope	2.5667e-005 ± 2.0504e-006	0.00015149 ± 8.7427e-006	0.053753 ± 0.0058244	0.024634 ± 0.00093796	-0.013875 ± 0.0010844
Y-intercept	0.015169 ± 0.0017845	0.081323 ± 0.0076091	51.256 ± 5.0692	8.6711 ± 0.81635	37.63 ± 0.94382
X-intercept	-590.98	-536.81	-953.54	-352	2712
1/slope	38960	6601	18.603	40.595	-72.071
95% Confidence Intervals					
Slope	2.1453e-005 to 2.9882e-005	0.00013352 to 0.00016946	0.041781 to 0.065726	0.022706 to 0.026562	-0.016104 to -0.011646
Y-intercept	0.011501 to 0.018837	0.065682 to 0.096963	40.836 to 61.676	6.9931 to 10.349	35.69 to 39.57
X-intercept	-845.49 to -399.7	-705.93 to -398.72	-1416.6 to -647.44	-446.16 to -268.96	2396.2 to 3142.3
Goodness of Fit					
R square	0.8577	0.92031	0.76613	0.96367	0.86295
Sy.x	0.0073184	0.031205	20.789	3.3479	3.8706
Is slope significantly non-zero?					
F	156.71	300.25	85.175	689.74	163.71
DFn, DFd	1, 26	1, 26	1, 26	1, 26	1, 26
P value	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
Deviation from zero?	Significant	Significant	Significant	Significant	Significant
Equation	Y = 2.5667e-005*X + 0.015169	Y = 0.00015149*X + 0.081323	Y = 0.053753*X + 51.256	Y = 0.024634*X + 8.6711	Y = -0.013875*X + 37.63
Data					
Number of X values	28	28	28	28	28
Maximum number of Y replicates	1	1	1	1	1
Total number of values	28	28	28	28	28
Number of missing values	0	0	0	0	0

Best-fit values ± SE	Ca Racines	K Racines	Ca tige	K Tige	Ca Feuilles
Slope	-0.019146 ± 0.0023688	-0.004733 ± 0.0011433	-0.010699 ± 0.0017354	-0.0060808 ± 0.0015522	0.013724 ± 0.0014419
Y-intercept	91.052 ± 2.0616	22.77 ± 0.9951	51.027 ± 1.5104	25.862 ± 1.351	75.063 ± 1.2549
X-intercept	4755.7	4810.9	4769.5	4253	-5469.6
1/slope	-52.23	-211.28	-93.47	-164.45	72.867
95% Confidence Intervals					
Slope	-0.024015 to -0.014277	-0.0070832 to -0.0023829	-0.014266 to -0.0071315	-0.0092714 to -0.0028902	0.01076 to 0.016687
Y-intercept	86.814 to 95.289	20.725 to 24.816	47.922 to 54.132	23.085 to 28.639	72.483 to 77.642
X-intercept	3889.3 to 6203.6	3370.8 to 9039.7	3696.6 to 6898	2946.7 to 8373.1	-7135.8 to -4392.3
Goodness of Fit					
R square	0.71532	0.39727	0.5938	0.37117	0.777
Sy.x	8.4548	4.0809	6.1941	5.5403	5.1464
Is slope significantly non-zero?					
F	65.33	17.137	38.007	15.347	90.593
DFn, DFd	1, 26	1, 26	1, 26	1, 26	1, 26
P value	<0.0001	0.0003	<0.0001	0.0006	<0.0001
Deviation from zero?	Significant	Significant	Significant	Significant	Significant
Equation	Y = -0.019146*X + 91.052	Y = -0.004733*X + 22.77	Y = -0.010699*X + 51.027	Y = -0.0060808*X + 25.862	Y = 0.013724*X + 75.063
Data					
Number of X values	28	28	28	28	28
Maximum number of Y replicates	1	1	1	1	1
Total number of values	28	28	28	28	28
Number of missing values	0	0	0	0	0

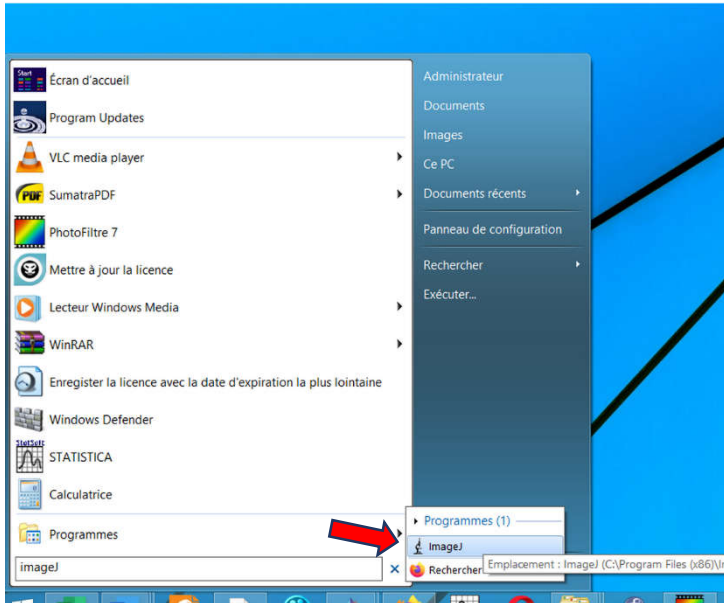
Best-fit values ± SE	K Feuilles	Pb Concentration	Chlorophylle A	Chlorophylle B	Caroténoïdes
Slope	0.0042904 ± 0.00078599	0.00032233 ± 5.3929e-006	-0.00033077 ± 9.0147e-005	-0.00027798 ± 6.0398e-005	-4.9882e-005 ± 1.1367e-005
Y-intercept	39.062 ± 0.68408	0.036146 ± 0.0046937	0.73157 ± 0.078459	0.5711 ± 0.052567	0.45279 ± 0.0098929
X-intercept	-9104.4	-112.14	2211.7	2054.5	9077.2
1/slope	233.08	3102.4	-3023.3	-3597.3	-20047
95% Confidence Intervals					
Slope	0.0026748 to 0.005906	0.00031125 to 0.00033342	-0.00051607 to -0.00014547	-0.00040213 to -0.00015383	-7.3247e-005 to -2.6518e-005
Y-intercept	37.656 to 40.468	0.026498 to 0.045794	0.57029 to 0.89284	0.46305 to 0.67916	0.43246 to 0.47313
X-intercept	-14945 to -6454.5	-145.46 to -80.389	1540.4 to 4403.1	1525 to 3333.6	6344.7 to 16603
Goodness of Fit					
R square	0.53402	0.99277	0.34116	0.44896	0.42553
Sy.x	2.8054	0.019249	0.32176	0.21558	0.040571
Is slope significantly non-zero?					
F	29.797	3572.4	13.463	21.183	19.259
DFn, DFd	1, 26	1, 26	1, 26	1, 26	1, 26
P value	<0.0001	<0.0001	0.0011	<0.0001	0.0002
Deviation from zero?	Significant	Significant	Significant	Significant	Significant
Equation	Y = 0.0042904*X + 39.062	Y = 0.00032233*X + 0.036146	Y = -0.00033077*X + 0.73157	Y = -0.00027798*X + 0.5711	Y = -4.9882e-005*X + 0.45279
Data					
Number of X values	28	28	28	28	28
Maximum number of Y replicates	1	1	1	1	1
Total number of values	28	28	28	28	28
Number of missing values	0	0	0	0	0

Best-fit values ± SE	Sucres Solubles	Proline	RWC	Poids SPA	Poids SPR
Slope	0.00011024 ± 2.0713e-005	0.0013026 ± 0.00016691	-0.0047963 ± 0.0024476	-0.002208 ± 0.00066777	-0.0011553 ± 0.00026526
Y-intercept	0.18794 ± 0.018027	1.4164 ± 0.14527	78.374 ± 2.1302	7.9755 ± 0.58119	3.1476 ± 0.23086
X-intercept	-1704.8	-1087.4	16340	3612.1	2724.4
1/slope	9070.8	767.7	-208.49	-452.9	-865.55
95% Confidence Intervals					
Slope	6.7668e-005 to 0.00015282	0.0009595 to 0.0016457	-0.0098273 to 0.00023472	-0.0035806 to -0.00083539	-0.0017006 to -0.0006101
Y-intercept	0.15088 to 0.22499	1.1178 to 1.715	73.995 to 82.752	6.7808 to 9.1701	2.673 to 3.6221
X-intercept	-3161.7 to -1038.3	-1708.1 to -710.78	8241.5 to +infinity	2392.4 to 8689.2	1978.7 to 4716.1
Goodness of Fit					
R square	0.52144	0.70082	0.12869	0.29603	0.42185
Sy.x	0.07393	0.59576	8.7361	2.3835	0.94678
Is slope significantly non-zero?					
F	28.329	60.903	3.8401	10.933	18.971
DFn, DFd	1, 26	1, 26	1, 26	1, 26	1, 26
P value	<0.0001	<0.0001	0.0608	0.0028	0.0002
Deviation from zero?	Significant	Significant	Not Significant	Significant	Significant
Equation	Y = 0.00011024*X + 0.18794	Y = 0.0013026*X + 1.4164	Y = -0.0047963*X + 78.374	Y = -0.002208*X + 7.9755	Y = -0.0011553*X + 3.1476
Data					
Number of X values	28	28	28	28	28
Maximum number of Y replicates	1	1	1	1	1
Total number of values	28	28	28	28	28
Number of missing values	0	0	0	0	0

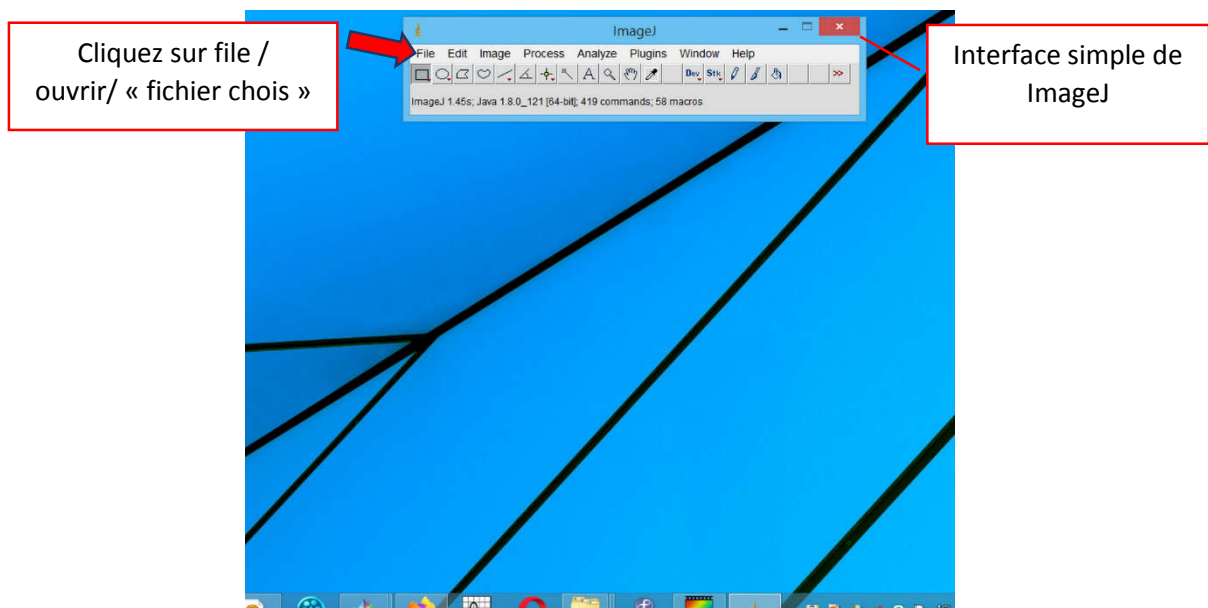
Best-fit values ± SE	Nombre de Foliolles	Hauteur Tige	Volume Racinaire	Surface Foliaire
Slope	-0.0015385 ± 0.00083067	-0.0055495 ± 0.0021156	-0.010852 ± 0.0021344	-0.0065708 ± 0.0018741
Y-intercept	14.06 ± 0.72297	48.016 ± 1.8413	23.208 ± 1.8576	42.62 ± 1.6311
X-intercept	9139.3	8652.5	2138.5	6486.3
1/slope	-650	-180.2	-92.145	-152.19
95% Confidence Intervals				
Slope	-0.0032459 to 0.00016901	-0.0098982 to -0.0012007	-0.01524 to -0.0064652	-0.010423 to -0.0027185
Y-intercept	12.574 to 15.547	44.232 to 51.801	19.39 to 27.027	39.267 to 45.973
X-intercept	4591.6 to +infinity	5070.7 to 38021	1625.3 to 3272.4	4269.9 to 14921
Goodness of Fit				
R square	0.11655	0.20926	0.49858	0.32102
Sy.x	2.9649	7.5514	7.6183	6.6892
Is slope significantly non-zero?				
F	3.4302	6.8804	25.853	12.293
DFn, DFd	1, 26	1, 26	1, 26	1, 26
P value	0.0754	0.0144	<0.0001	0.0017
Deviation from zero?	Not Significant	Significant	Significant	Significant
Equation	Y = -0.0015385*X + 14.06	Y = -0.0055495*X + 48.016	Y = -0.010852*X + 23.208	Y = -0.0065708*X + 42.62
Data				
Number of X values	28	28	28	28
Maximum number of Y replicates	1	1	1	1
Total number of values	28	28	28	28
Number of missing values	0	0	0	0

Annexe 4 : Utilisation le logiciel « ImageJ » pour la détermination de la surface foliaire

1. Après l'installation du logiciel, ouvrez ImageJ¹ par l'intermédiaire du lancement rapide ou par une double cliques sur l'icône ImageJ.



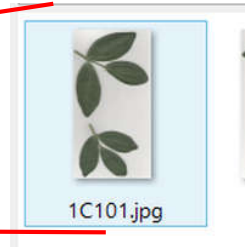
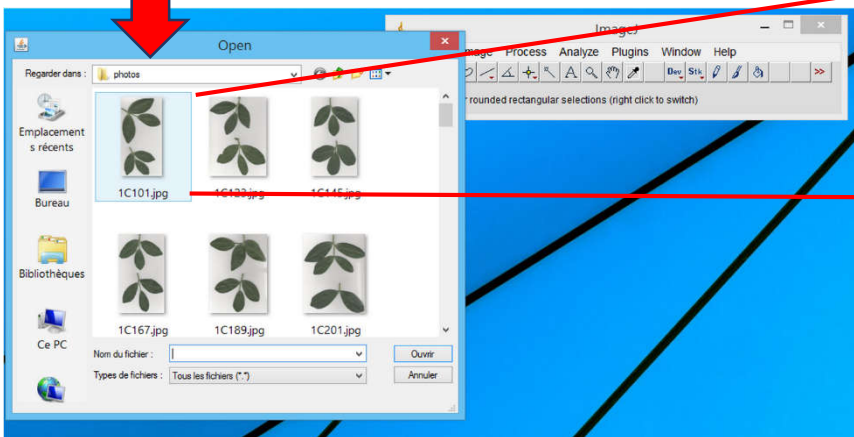
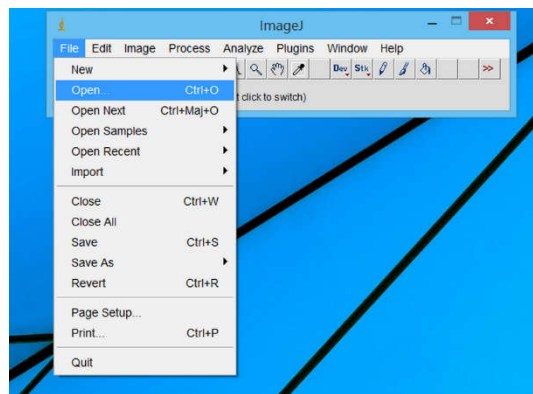
2. Ouvrir l'image qu'on veut utiliser.



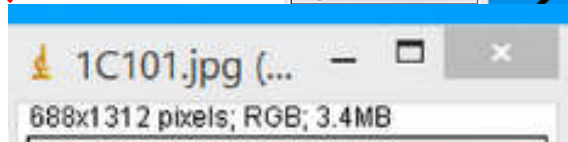
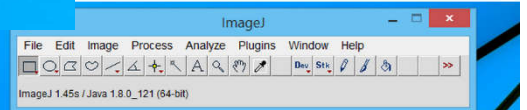
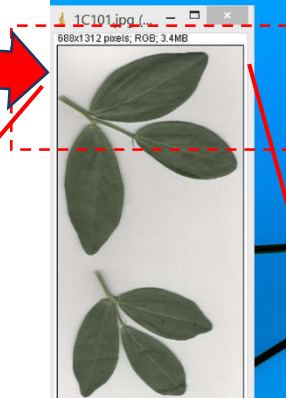
¹ ImageJ est un logiciel open source que vous pouvez le télécharger sur le lien suivant ; <https://downloads.digitaltrends.com/imagej/windows>

3. Ouvrir le fichier

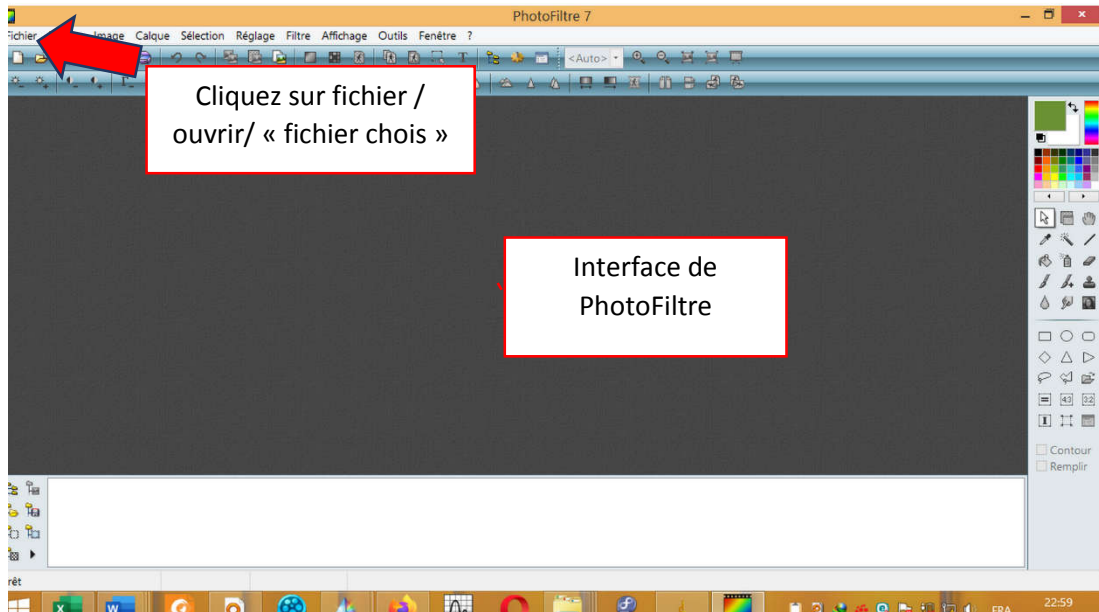
Se rappeler du nom de fichier (exe : 1C101.jpg)



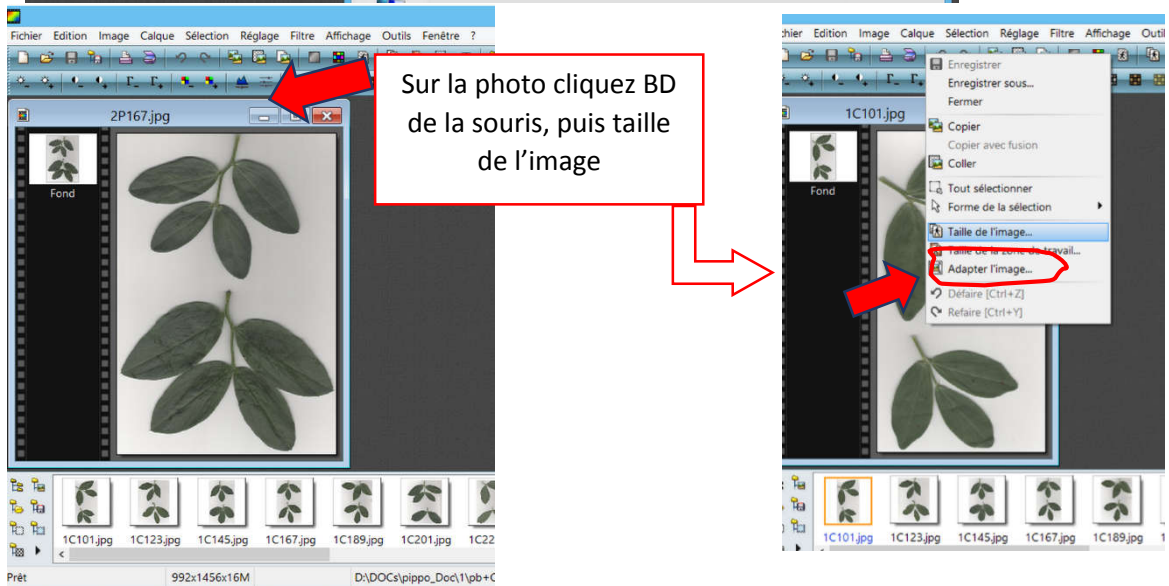
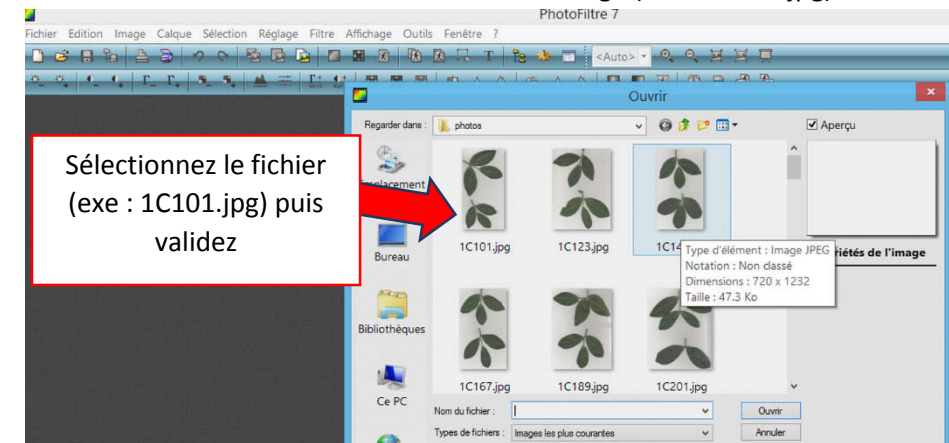
Observer bien le nom du fichier (1C101.jpg) et sa taille ainsi que ses dimensions en pixels (688x1312)



4. Il faut convertir ces dimensions en cm ; pour cela il faut passer par le logiciel PhotoFiltre² (après installation du logiciel, ouvrez le).



5. Ouvrez PhotoFiltre et ouvrir la même image (exe : 1C101.jpg).



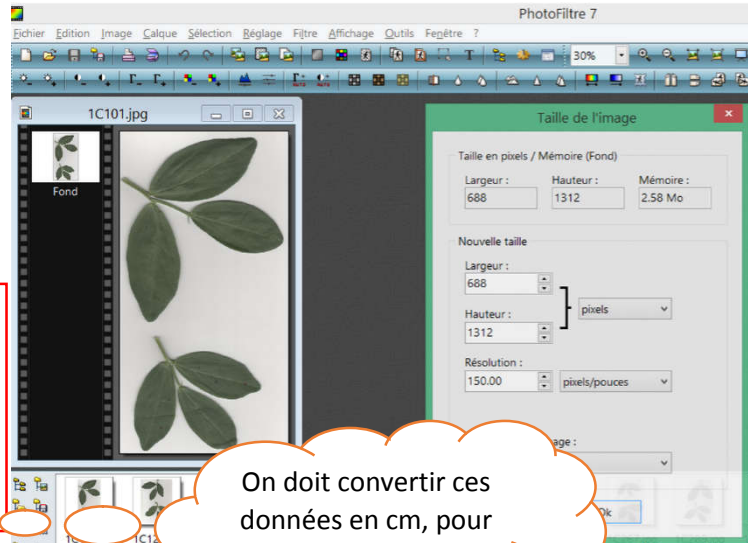
² PhotoFiltre est un logiciel open source que vous pouvez le télécharger sur le lien suivant ; <http://www.photofiltre-studio.com/pf7.htm>

6. Une fois affichée (la taille de l'image) vous pouvez remarquer les points suivants :

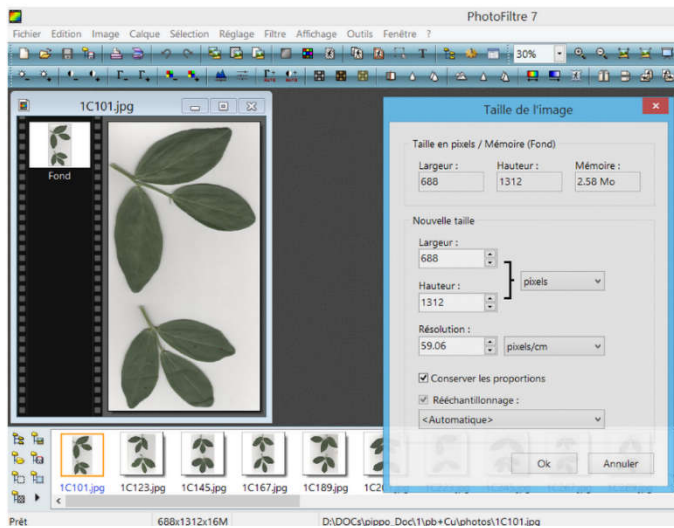
- Largeur : 688
- Hauteur : 1312
- Mémoire : 2.58 Mo
- Résolution : 150.00 pixels/pouces



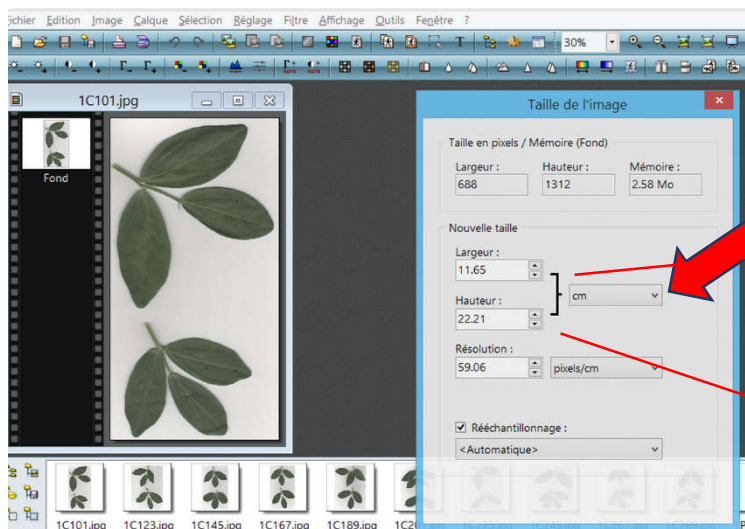
- Cela veut dire que notre image 1C101.jpg a :
- une largeur de 688 pixels
 - une hauteur de 1312 pixels
 - une mémoire sur le disque de 2.58 Mo
 - avec une résolution de 150.00 pixels/pouces



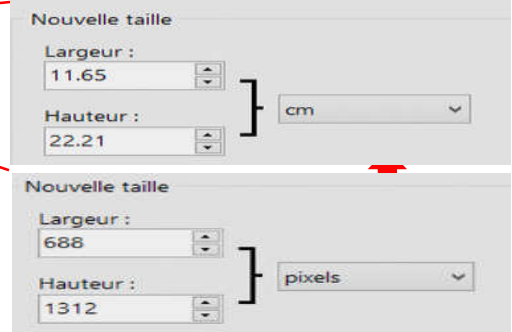
Remarquez bien la résolution 59.06 (pixels/cm)
C'est-à-dire qu'il y a **59.06** pixels dans un cm (la valeur qu'on va utiliser pour convertir nos données de pixels en cm pour le logiciel ImageJ).



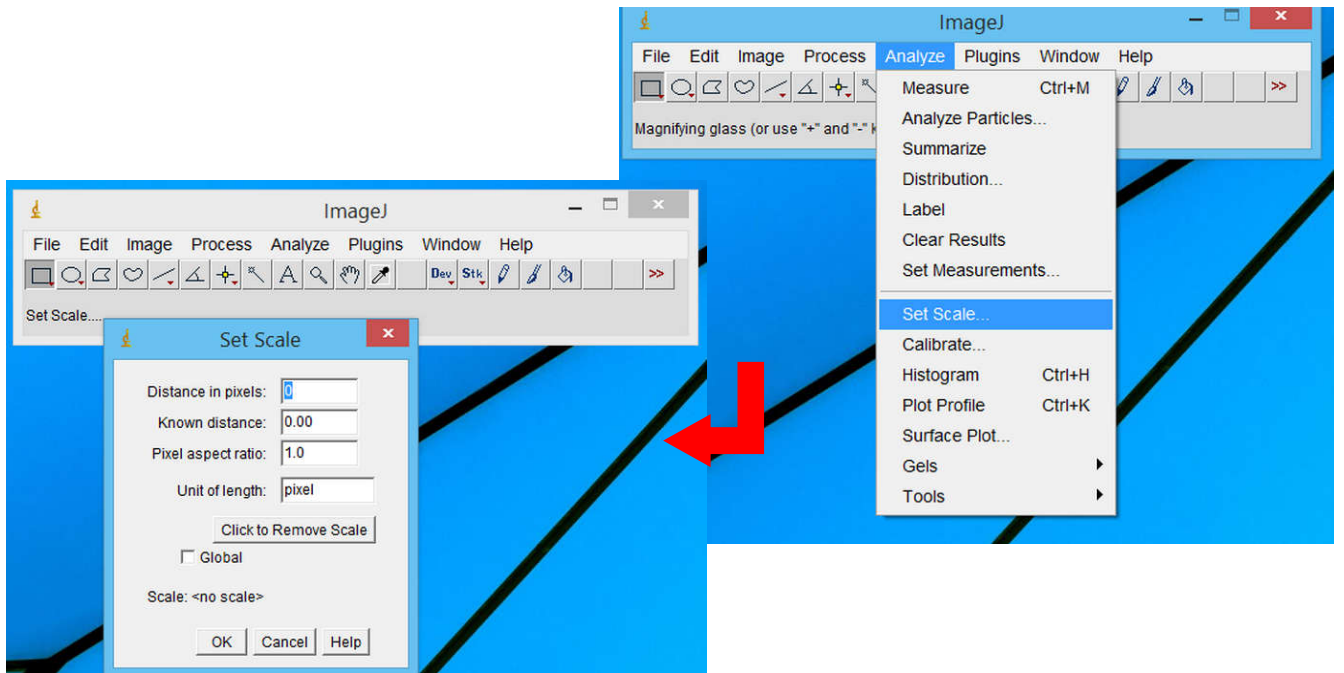
7. On clique sur « résolution » et on le met sur pixels/cm



Si on choisit de changer l'unité en (cm) la taille de l'image change ;



8. On retourne sur ImageJ (on peut fermer PhotoFiltre), sur l'interface ImageJ on clique sur le menu « Analyze » puis on clique « Set Scale... »

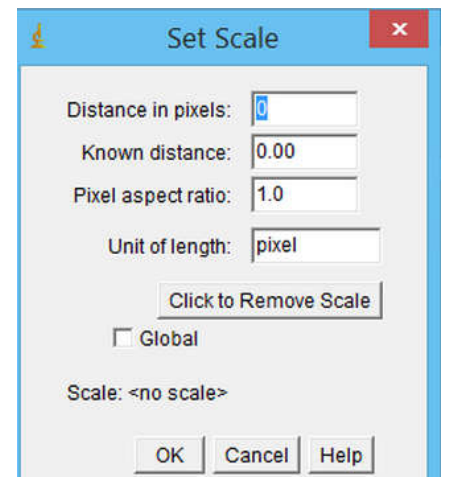


9. Sur la nouvelle fenêtre on procède comme suit ;

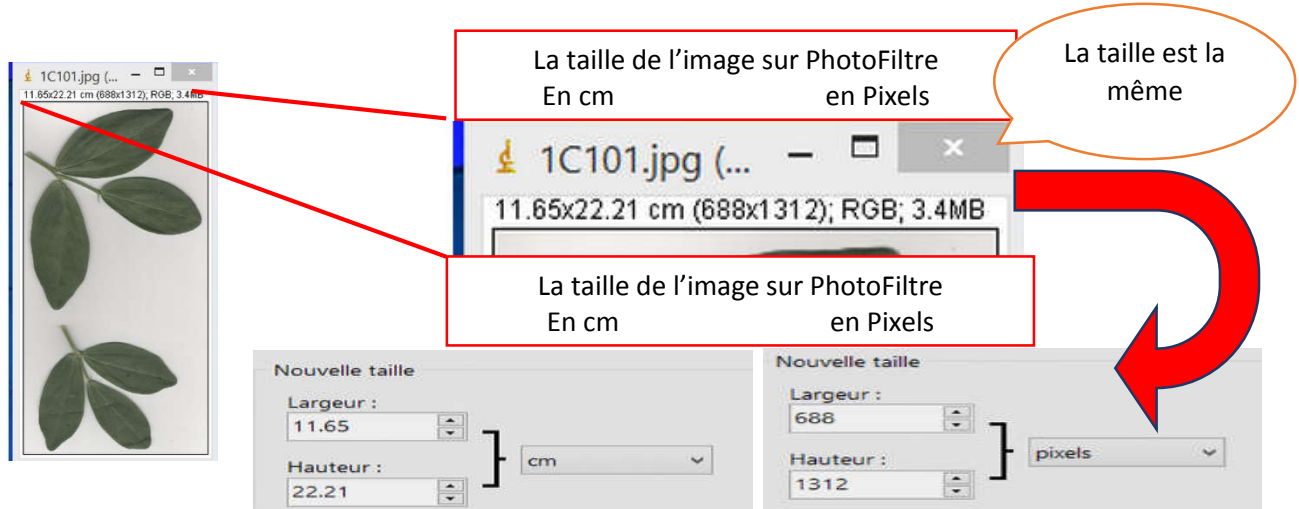
Dans la case :

- Distance in pixels = **59.06**
- Known distance = **1.00**
- Pixel aspect ratio = 1.0
- Unit of length = **cm**

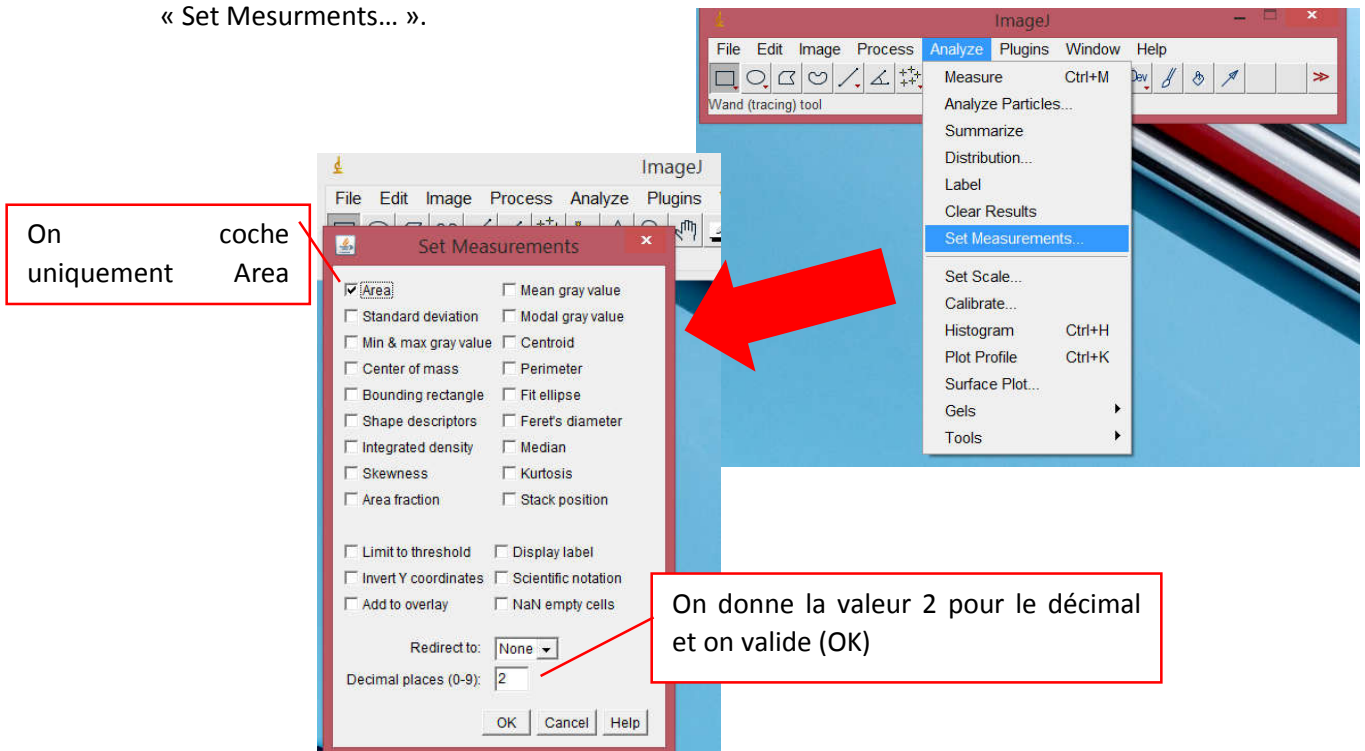
Puis on valide « OK »



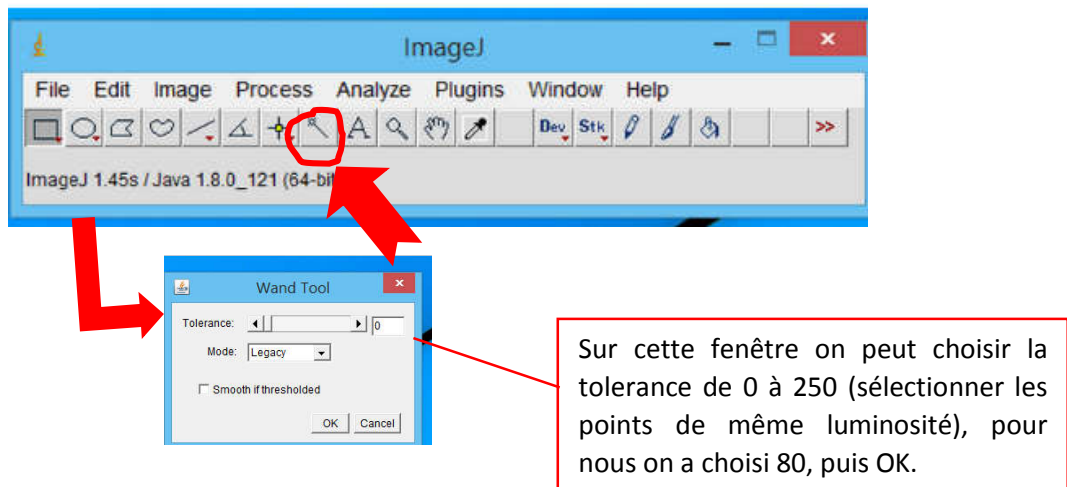
10. Une fois l'échelle changée, les données de notre image (ex ; 1C101.jpg) changent;



11. Maintenant en doit ajuster l'outil de mesure, pour cela un ouvre le menu « Analyze » puis « Set Mesurments... ».



12. Sur l'interface de ImageJ on choisit **bagatte de tracege** (wand tracing tool), double-clique



13. Une ligne jaune se trace sur le bord de la feuille, maintenant on clique « Analyze » puis « mesure » ... pour afficher la surface de la feuille sélectionnée.

