



Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de  
**Magister en biologie**

**Option**  
**«Sciences du Sol et Environnement»**

Présenté par :

**M<sup>r</sup>. BENOUIS Slimane**

**Thème**

**Contribution à l'étude de l'effet des métaux lourds (Cuivre) sur les caractéristiques biométriques et chimiques de la fève (*Vicia faba* L.)**

Laboratoire de la Biodiversité et Conservation des Eaux et des sols, université de Mostaganem.  
Laboratoire d'Agro-biotechnologie et de Nutrition en Zones Semi-Arides, université Ibn Khaldoun de Tiaret

**Devant le jury :**

Nom et prénom	Grade	Qualité	Appartenance administrative
Mekhaldi Abdelkader	MC <sub>A</sub>	Président	Université de Mostaganem
Adda Ahmed	MC <sub>A</sub>	Encadreur	Université de Tiaret
REGUIEG YSSAAD Houcine.A.	MC <sub>A</sub>	Co-encadreur	Université de Mostaganem
Chibani Abdelwahab	MC <sub>A</sub>	Examineur	Université de Mostaganem
Djibaoui Rachid	MC <sub>A</sub>	Examineur	Université de Mostaganem

## *Remerciements*

---

*Avant d'exposer ce modeste travail, il m'est agréable de remercier vivement tous ceux qui ont permis la réalisation de ce travail grâce à leur aide précieuse. Je dois remercier particulièrement:*

*Mr. ADDA AHMED, Maître de conférences à l'Université d'Ibn Khaldoun. Tiaret, pour avoir accepté de diriger cette étude, pour sa patience, sa confiance, ses conseils et ses orientations tout au long de ce travail.*

*Mr. REGUIEG YSSAAD HOUCINE ABDELHAKIM, Maître de conférences à l'Université de Mostaganem pour son encadrement scientifique, sa participation active dans mon travail ainsi pour la confiance qu'il m'a accordée durant cette période de préparation.*

*MR. MEKHALDI ABDELKADER, , Maître de conférences à l'Université de Mostaganem, pour l'honneur qu'il me fait en assurant la présidence du jury.*

*MR. CHIBANI ABDELWAHAB, Maître de conférences à l'université de Mostaganem, pour l'honneur qu'il me fait de juger mon travail.*

*MR. DJIBAOUI RACHID, Maître de conférences à l'université de Mostaganem, pour l'honneur qu'il me fait en faisant part de mon jury.*

*Je dois également exprimer ma gratitude aux personnels techniques du laboratoire de la physiologie végétale de l'université de Tiaret m'avoir aidé si généreusement lors de la réalisation de mon travail.*

*L'occasion m'est offerte de témoigner chaleureusement, ma vive gratitude à tous les membres de ma famille, en particulier mon père et ma mère, pour leurs appuis et leurs encouragements.*

*Je tiens à remercier tous les étudiants de Magister 2011-2012 sans oublier tous les étudiants de laboratoire de la biodiversité et la conservation des eaux et des sols pour leurs aides. Surtout BOUZIANI EL -HADJ...*

## Dédicaces

*Je dédie ce modeste travail :*

*À mes très chers parents qui ont largement contribué à mon éducation et mon enseignement.*

*Mes frères : Miloud, Habib, Ismaïl et Mohamed.*

*Mes sœurs : Khaoula, Amina-nana-, Hayouta, et Fatima.*

*À mes amis (es) : Bouziani El-hadj, Nouri Tayeb, Ouâini Abderrahmen, Djoudi Hako et Ouanoki Mokhtar.*

*À mes enseignants de l'université Abdelhamid ibn badis-MOSTA.*

*Enfin à tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin.*

*« Slimane »*

---

---

-∞\* TABLE DES MATIERES \*∞-

Liste des abréviations et des symboles

Liste des figures

Liste des tableaux

<b>CHAPITRE I : REVUES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>6</b>
<b>1. GENERALITE SUR LES METAUX LOURDS .....</b>	<b>7</b>
1.1 DEFINITION DES METAUX LOURDS.....	7
1.2 HISTORIQUE .....	7
1.3 ORIGINE DES METAUX LOURDS .....	8
<b>2. LE CUIVRE COMME POLLUANT ENVIRONNEMENTAL .....</b>	<b>8</b>
2.1 GENERALITES.....	8
2.2. DISTRIBUTION NATURELLE DU CUIVRE.....	9
2.2.1. <i>Distribution géologique du cuivre</i> .....	9
2.2.2. <i>Distribution géographique du cuivre</i> .....	9
2.3. LE CUIVRE DANS LE SOL .....	10
2.3.4. SOURCES ET NIVEAU DE CONTAMINATION EN CUIVRE DES SOLS .....	11
2.3.4.1. <i>Niveau de contamination en cuivre des sols</i> .....	11
2.3.4.2. <i>Sources de contamination en cuivre des sols</i> .....	11
2.4. <i>Biodisponibilité du cuivre</i> .....	12
2.5. LE CUIVRE DANS LA PLANTE .....	14
2.5.1. <i>Le cuivre, oligo-élément</i> .....	14
2.5.2. <i>Rôle physiologique du Cuivre</i> .....	14
2.5.3. <i>Absorption du cuivre</i> .....	15
2.5.3.1. <i>Adsorption du cuivre dans l'apoplasme racinaire</i> .....	15
2.5.4. <i>Translocation du cuivre</i> .....	17
2.5.5. <i>Distribution du cuivre dans la plante</i> .....	17
2.6. CARENCE ET PHYTOTOXICITE DU CUIVRE.....	18
2.6.1. <i>Carence en cuivre</i> .....	18
2.6.2. <i>Phytotoxicité du cuivre</i> .....	18
2.6.3. <i>Impacts de la contamination en Cu</i> .....	19
2.6.3.1. <i>Fonctionnement de l'écosystème</i> .....	19
2.6.3.2. <i>Communautés végétales</i> .....	20
2.6.3.4. <i>Effet du cuivre sur la plante</i> .....	20
a - <i>La germination</i> .....	20
b - <i>La partie aérienne</i> .....	21
c - <i>la partie racinaire</i> .....	21
d - <i>Physiologie et biologie cellulaire</i> .....	22
d-1 <i>La photosynthèse et autres fonctions végétales</i> .....	22
e - <i>Production d'espèces réactives dérivées de l'oxygène (ERO)</i> .....	23

<i>f- Altérations de la structure des protéines</i> .....	23
2.7. <i>Les mécanismes de tolérance chez les végétaux</i> .....	24
2.7.1. <i>La chélation de Cuivre</i> .....	24
2.7.2. <i>La séquestration de cuivre</i> .....	24
<b>3. LE MODELE BIOLOGIQUE <i>VICIA FABAL</i></b> .....	<b>25</b>
3.1. LA PLANTE.....	25
3.1.1. <i>Classification</i> .....	25
3.1.2. <i>Aspect et particularités</i> .....	25
3.1.3. <i>Culture</i> .....	26
3.1.4. <i>Cariotype et cycle cellulaire</i> .....	27
3.2. INTERET EN ECOTOXICOLOGIE .....	27
<b>CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES</b> .....	<b>28</b>
1. INTRODUCTION .....	29
2. MATERIELS VEGETAL UTILISE .....	29
3. ESSAI 1 : EFFET DU CUIVRE SUR LE PROCESSUS DE LA GERMINATION DES GRAINES .....	29
3.1. <i>Conduite de l'essai</i> .....	29
4. ESSAI 2 : EFFET DE CUIVRE SUR LES PARAMETRES MORPHOLOGIQUES, PHYSIOLOGIQUES ET ANATOMIQUES .....	31
4.1. <i>Conduite de l'essai</i> .....	31
4.1.1. <i>Application du stress métallique</i> .....	32
4.2. LES PARAMETRES MESURES .....	33
4.2.1. <i>La teneur relative en eau</i> .....	33
4.2.2. <i>Dosage des pigments chlorophylliens</i> .....	33
4.2.3. <i>Dosage du proline</i> .....	33
4.2.4. <i>Dosage des sucres solubles</i> .....	34
4.2.5. <i>Taux de protéines totales des graines</i> .....	34
4.2.6. <i>Le potentiel osmotique</i> .....	35
4.3. <i>Paramètres morphologiques</i> .....	36
4.3.1. <i>Paramètres morphologiques aériens</i> .....	36
4.3.2. <i>Paramètres morphologiques sous terrain</i> .....	36
4.4. <i>Les paramètres anatomiques</i> .....	36
5. ANALYSE STATISTIQUE .....	37
<b>CHAPITRE III : RESULTATS ET INTERPRETATIONS</b> .....	<b>39</b>
<b>1. EFFET DU CUIVRE SUR LE PROCESSUS DE LA GERMINATION DES GRAINES</b> .....	<b>40</b>
1.1. TEST D'IMBIBITION .....	40
1.2. L'ACTIVITE DES A-AMYLASES.....	41
1.3. LA LONGUEUR DE LA RADICULE.....	42

---

## **2. DEUXIEME ESSAI : EFFET DU CUIVRE SUR LES PARAMETRES MORPHOLOGIQUES, PHYSIOLOGIQUES ET ANATOMIQUES DE LA FEVE..... 45**

2.1. EFFET DU CUIVRE SUR LES PARAMETRES PHYSIOLOGIQUES.....	45
2.1.1. Teneur en eau relative (RWC) .....	45
2.1.2. Potentiel osmotiques (P.O) .....	48
2.1.3. Teneur en proline.....	51
2.1.4. Teneur en sucres solubles .....	55
2.1.5. Taux des pigments photosynthétiques .....	58
2.1.5.1. Chlorophylle a .....	58
2.1.5.2. Chlorophylle b .....	60
2.1.5.3. Chlorophylle a+b.....	63
2.1.5.4. Caroténoïdes .....	66
2.1.6. Taux des protéines totales.....	69
2.1.7. Poids sec de la partie racinaire .....	73
2.1.8. Poids sec de la partie aérienne .....	75
2.2. EFFET DU CUIVRE SUR LES PARAMETRES MORPHOLOGIQUES.....	79
2.2.1 Effet du cuivre sur la partie aérienne de la fève.....	79
2.2.1.1 La surface foliaire.....	79
2.2.1.2. Nombre de feuilles .....	81
2.2.1.3. Nombre de gousses .....	84
2.2.1.4. Hauteur de la tige .....	87
2.2.2. Effet du cuivre sur la partie sous terrain de la fève.....	90
2.2.2.1. Volume racinaire.....	90
2.2.2.2. Longueur racinaire .....	92
2.3. EFFET DU CUIVRE SUR L'ANATOMIE DE LA TIGE .....	96
2.3.1. Le nombre des faisceaux cribro-vasculaires. ....	96
2.3.2. Distance entre les faisceaux cribro-vasculaires .....	98
2.3.3. Diamètre du métaxylème.....	101
2.3.4. Epaisseur de la paroi externe des cellules épidermiques .....	104
<b>CONCLUSION GENERALE .....</b>	<b>109</b>

### **Références bibliographiques**

### **Annexes**

---

-❧\* LISTE DES ABREVIATIONS ET DES SYMBOLES \*❧-

∅ : diamètre.

A470 : absorbance à 470 nm.

A645 : absorbance à 645 nm.

A663 : absorbance à 663 nm.

CEC : capacité d'échange cationique.

CECR : capacité d'échange cationique racinaire

Chl a : Chlorophylle a

Chl a+b : Chlorophylle a+b

Chl b : Chlorophylle b

COPT1 : Copper Transporter 1

CTR : Copper Transporter

CuFeS<sub>2</sub>: chalcopyrite

Cu<sub>5</sub>FeS<sub>4</sub> : bornite

EDTA : Acide Ethylène DiaminoTétraacétique.

ETM : éléments traces métalliques

FRO 2: Ferric Reductase Oxidase

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> = Peroxyde d'hydrogène

I.T.G.C : Institut technique des grandes cultures.

LH : hauteur de la tige

LR : longueur racinaire.

Meq: milliéquivalent.

mg/g MF: milligramme par gramme de matière fraîche.

mg/kg ps : milligramme par kilogramme de poids sec.

M<sup>n+</sup> : la forme libre d'un métal M

MOD : matières organiques dissoutes

MT = Metallothionéines

*p* : probabilité.

P.O : potentiel osmotique.

PC = Phytochélatines

pKa : constante d'acidité

ppm : partie par million.

PS PA : poids sec de la partie aérienne.

---

PS PR : poids sec de la partie racinaire.

PVC : polyvinyle chloryde.

ERO : espèces réactives dérivées de l'oxygène

RUBISCO : ribulose 1,5 bisphosphate carboxylase/oxygénase.

RWC : relative water content, contenu relatif en eau.

-SH = groupement thiol (ou sulfhydrile)

U.S.D.A: United States Department of Agriculture.

V1 : génotype Sidi Aïch.

V2 : génotype Super Aguadulce.

VR : volume racinaire.

-☪\* LISTE DES TABLEAUX \*☪-

**Tableau n°1** : Propriétés du substrat

**Tableau n°02** : L'activité des  $\alpha$ -amylases au niveau des graines des deux génotypes de *Vicia faba* exposés au cuivre.

**Tableau n°03** : probabilité «  $p$  » de l'analyse de la variance de paramètres de la longueur de la racine des deux génotypes étudiés.

**Tableau n°04** : La longueur de la racine en cm des deux génotypes de la fève exposés au cuivre.

**Tableau n°05**: probabilité «  $p$  » de l'analyse de la variance des paramètres physiologiques des deux génotypes étudiés.

**Tableau n°06** : Teneur en eau relative (RWC) dans les feuilles des deux génotypes de la fève exposés au cuivre (Application 1).

**Tableau n°07** : Teneur en eau relative (RWC) dans les feuilles des deux génotypes de la fève exposés au cuivre (Application 2).

**Tableau n°08** : Potentiel osmotiques (K<sub>pas</sub>) des feuilles des deux génotypes de la fève exposés au cuivre (Application 1).

**Tableau n°09** : Potentiel osmotiques en K<sub>pas</sub> des feuilles des deux génotypes de la fève exposés au cuivre (Application 2).

**Tableau n°10** : Teneur en proline en  $\mu\text{g/g}$  dans les feuilles des deux génotypes de la fève exposés au cuivre (Application 1).

**Tableau n°11** : Teneur en proline en  $\mu\text{g/g}$  dans les feuilles des deux génotypes de la fève exposés au cuivre (Application 2).

**Tableau n°12** : Teneur en sucres solubles en  $\mu\text{g/g}$  dans les feuilles des deux génotypes de la fève exposés au cuivre (Application 1).

**Tableau n°13**: Teneur en sucres solubles en  $\mu\text{g/g}$  dans les feuilles des deux génotypes de la fève exposés au cuivre (Application 2).

**Tableau n°14** : Les teneurs en Chlorophylle a en  $\text{mg/g}$  des feuilles des deux génotypes de la fève exposés au cuivre (Application 1).

**Tableau n°15** : Les teneurs en Chlorophylle a en  $\text{mg/g}$  des feuilles des deux génotypes de la fève exposés au cuivre (Application 2).

**Tableau n°16:** Les teneurs en Chlorophylle b en mg/g des feuilles des deux géotypes de la fève exposés au cuivre (Application 1)

**Tableau n°17 :** Les teneurs en chlorophylle b en mg/g des feuilles des deux géotypes de la fève exposés au cuivre (Application 2).

**Tableau n°18:** Taux des Chlorophylles a+b en mg/g des feuilles des deux géotypes de la fève exposés au cuivre (Application 1).

**Tableau n°19:** Taux des Chlorophylles a+ b en mg/g des feuilles des deux géotypes de la fève exposés au cuivre (Application 2).

**Tableau n°20:** Taux des caroténoïdes en mg/g des feuilles des deux géotypes de la fève exposés au cuivre (Application 1).

**Tableau n°21:** Taux des caroténoïdes en mg/g des feuilles des deux géotypes de la fève exposés au de cuivre (Application 2).

**Tableau n°22 :** Taux des protéines totales (%) au niveau des graines des deux géotypes de la fève exposés au cuivre (Application 1).

**Tableau n°23 :** Taux des protéines totales (%) au niveau des graines des deux géotypes de la fève exposés au cuivre (Application 2).

**Tableau n°24 :** Poids sec de la partie racinaire en (g) des deux géotypes de la fève exposés au cuivre (Application 1).

**Tableau n°25 :** Poids sec de la partie racinaire en (g) des deux géotypes de la fève exposés au cuivre (Application 2)

**Tableau n°26 :** Poids sec de la partie aérienne en (g) des deux géotypes de la fève exposés au cuivre (Application 1).

**Tableau n°27 :** Poids sec de la partie aérienne en (g) des deux géotypes de la fève exposés au cuivre (Application 2).

**Tableau n°29:** La surface foliaire en Cm<sup>2</sup> des feuilles des deux géotypes de la fève exposés au cuivre.

**Tableau n°30 :** Nombre de feuilles des deux géotypes de la fève exposés au cuivre (Application 1).

**Tableau n°31:** Nombre des feuilles des deux géotypes de la fève exposés au cuivre (Application 2).

**Tableau n°32:** Nombre de gousses des deux géotypes de la fève exposés au cuivre (Application 1)

**Tableau n°33** : Nombre de gousses des deux géotypes de la fève exposés au cuivre (Application 2).

**Tableau n°34** : Hauteur de la tige en Cm des deux géotypes de la fève exposés au cuivre (Application 1)

**Tableau n°35** : Hauteur de la tige en Cm des deux Géotypes de la fève exposés au cuivre (Application 2).

**Tableau n°36** : Volume racinaire en ml des deux géotypes de la fève exposés au cuivre (Application 1).

**Tableau n°37** : Volume racinaire en ml des deux géotypes de la fève exposés au cuivre (Application 2).

**Tableau n°38** : Longueur racinaire en Cm des deux géotypes de la fève exposés au cuivre (Application 1).

**Tableau n°39** : Longueur racinaire en Cm des deux Géotypes de la fève exposés au cuivre (Application 2).

**Tableau n°40** : probabilité «  $p$  » de l'analyse de la variance des paramètres anatomiques des deux géotypes étudiés.

**Tableau n°41** : Nombre des faisceaux cribro-vasculaires des deux géotypes de la fève exposés au cuivre (Application 1).

**Tableau n°42** : Nombre des faisceaux cribro-vasculaires des deux géotypes de la fève exposés au cuivre (Application 2).

**Tableau n°43** : Distance entre les faisceaux cribro-vasculaires ( $\mu\text{m}$ ) des deux géotypes de la fève exposés au cuivre (Application 1).

**Tableau n°44** : Distance entre les faisceaux cribro-vasculaires ( $\mu\text{m}$ ) des deux géotypes de la fève exposés au cuivre (Application 2).

**Tableau n°45** : Diamètre du méta-xylème ( $\mu\text{m}$ ) des deux géotypes de la fève exposés au cuivre (Application 1).

**Tableau n°46** : Diamètre du méta-xylème ( $\mu\text{m}$ ) des deux géotypes de la fève exposés au cuivre (Application 2).

**Tableau n°47** : L'épaisseur de la paroi externe des cellules épidermique ( $\mu\text{m}$ ) des deux géotypes de la fève exposés au cuivre (Application 1).

**Tableau n°48** : L'épaisseur de la paroi externe des cellules épidermique ( $\mu\text{m}$ ) des deux géotypes de la fève exposés au cuivre (Application 2).

## -❧\* LISTE DES FIGURES \*❧-

**Fig. 01 :** Processus biologiques et chimiques induits par les activités racinaires et leur implication sur la dynamique des métaux (M) à l'interface sol-solution-racine (Hinsinger 2001 ; Hinsinger et *al.*, 2005).

**Fig. 02 :** Mécanismes impliqués dans l'absorption du cuivre (Cu) au niveau de la membrane plasmique de la cellule racinaire.

**Fig. n°03 :** Possibles interactions métalliques lors du développement des plantes (Prasad, 1999).

**Fig. 04:** Les différentes parties de la fève *Vicia faba* L. (Thomé, 1885).

**Fig. 05:** Dispositif expérimental

**Fig. 06 :** micro-osmomètre (VAPRO)

**Fig. 07:** Coupe anatomique sur la tige de la fève avec les paramètres anatomiques étudiés. (A : distance entre les faisceaux cribro-vasculaires, B : diamètre du méta-xylème, C : épaisseur de la paroi externe des cellules épidermiques), en haut une coupe réalisée avec le grossissement Gx4, en bas une coupe réalisée avec grossissement Gx10.

**Fig. 08 :** Conduite de l'expérimentation et application du stress métallique

**Fig. 09 :** l'évolution de l'imbibition des graines de la fève (*Vicia faba*) en (g) d'eau en fonction du temps (h) pour les trois traitements (0, 100 et 200 ppm de Cu). A : génotype sidi Aïch, B : génotype Super Aguadulce.

**Fig. 10 :** l'évolution des moyennes de l'activité des  $\alpha$ -amylases pour V1 (sidi Aïch) et V2 (Super Aguadulce) en fonction de la dose du cuivre.

**Fig. 11 :** l'évolution des moyennes de la longueur des racicules en cm pour V1 (sidi Aïch) et V2 (Super Aguadulce) en fonction de la dose du cuivre.

**Fig. 12:** l'évolution des moyennes de la teneur relative en eau (%) pour V1 (sidi Aïch) et V2 (Super Aguadulce) en fonction de la dose du cuivre (0, 100, 200 ppm).

**Fig. 13:** l'évolution des moyennes de la teneur relative en eau (%) pour V1 (sidi Aïch) et V2 (Super Aguadulce) en fonction de la dose du cuivre (0, 200, 400 ppm).

**Fig. 14:** l'évolution des moyennes du potentiel osmotique (Kp) pour V1 (sidi Aïch) et V2 (Super Aguadulce) en fonction de la dose du cuivre (0, 100, 200 ppm).

**Fig. 15:** l'évolution des moyennes du potentiel osmotique (Kp) pour V1 (sidi Aïch) et V2 (Super Aguadulce) en fonction de la dose du cuivre (0, 200, 400 ppm).

**Fig. 16 :** l'évolution de la teneur en proline ( $\mu\text{g/g}$ ) des deux génotypes expérimentés en fonction de la dose du cuivre (0, 100, 200 ppm).

**Fig. 17 :** l'évolution de la teneur en proline ( $\mu\text{g/g}$ ) des deux génotypes expérimentés en fonction de la dose du cuivre (0, 200, 400 ppm).

**Fig. 18 :** l'évolution des moyennes des sucres solubles ( $\mu\text{g/g}$ ) pour V1 (sidi Aïch) et V2 (Super Aguadulce) en fonction de la dose du cuivre (0, 100, 200 ppm).

**Fig. 19 :** l'évolution des moyennes des sucres solubles ( $\mu\text{g/g}$ ) pour V1 (sidi Aïch) et V2 (Super Aguadulce) en fonction de la dose du cuivre (0, 200, 400 ppm).

**Fig. 20 :** l'évolution des moyennes des teneurs en Chlorophylle a ( $\text{mg/g}$ ) pour le génotype Sidi Aïch (V1) et Super Aguadulce (V2) en fonction de la dose du cuivre (0, 100, 200 ppm).

**Fig. 21 :** l'évolution des moyennes des teneurs en Chlorophylle a ( $\text{mg/g}$ ) pour le génotype Sidi Aïch (V1) et Super Aguadulce (V2) en fonction de la dose du cuivre (0, 200, 400 ppm).

**Fig. 22 :** l'évolution des moyennes des teneurs en chlorophylle b ( $\text{mg/g}$ ) pour le génotype Sidi Aïch (V1) et Super Aguadulce (V2) en fonction de la dose du cuivre (0, 100, 200 ppm) .

**Fig. 23 :** l'évolution des moyennes des teneurs en chlorophylle b ( $\text{mg/g}$ ) pour le génotype Sidi Aïch (V1) et Super Aguadulce (V2) en fonction de la dose du cuivre (0, 200, 400 ppm).

**Fig. 24 :** l'évolution des moyennes des teneurs en Chlorophylle a+b ( $\text{mg/g}$ ) pour le génotype Sidi Aïch (V1) et Super Aguadulce (V2) en fonction de la dose du cuivre (0, 100, 200 ppm).

**Fig. 25 :** l'évolution des moyennes des teneurs en Chlorophylle a+b ( $\text{mg/g}$ ) pour le génotype Sidi Aïch (V1) et Super Aguadulce (V2) en fonction de la dose du cuivre (0, 200, 400 ppm).

**Fig. 26 :** l'évolution des moyennes des teneurs en caroténoïde ( $\text{mg/g}$ ) pour le génotype Sidi Aïch (V1) et Super Aguadulce (V2) en fonction de la dose du cuivre (0, 100, 200 ppm).

**Fig. 27 :** l'évolution des moyennes des teneurs des caroténoïdes ( $\text{mg/g}$ ) pour le génotype Sidi Aïch (V1) et Super Aguadulce (V2) en fonction de la dose du cuivre (0, 200, 400 ppm).

**Fig. 28 :** l'évolution des moyennes des taux des protéines totales (%) pour V1 (sidi Aïch) et V2 (Super Aguadulce) en fonction de la dose du cuivre (0, 100, 200 ppm)

**Fig. 29:** l'évolution des moyennes des taux des protéines (%) pour V1 (sidi Aïch) et V2 (Super Aguadulce) en fonction de la dose du cuivre (0, 200, 400 ppm).

**Fig. 30:** l'évolution des moyennes du Poids sec de la partie racinaire en (g) pour V1 (sidi Aïch) et V2 (Super Aguadulce) en fonction de la dose du cuivre (0, 100, 200 ppm)

**Fig. 31 :** l'évolution des moyennes du Poids sec de la partie racinaire en (g) pour V1 (sidi Aïch) et V2 (Super Aguadulce) en fonction de la dose du cuivre (0, 200, 400 ppm).

**Fig. 32 :** l'évolution des moyennes du Poids sec de la partie aérienne en (g) pour V1 (sidi Aïch) et V2 (Super Aguadulce) en fonction de la dose du cuivre (0, 100, 200 ppm).

**Fig. 33 :** l'évolution des moyennes du Poids sec de la partie aérienne en (g) pour V1 (sidi Aïch) et V2 (Super Aguadulce) en fonction de la dose du cuivre (0, 200, 400 ppm).

**Fig. 34:** l'évolution des moyennes de la surface foliaire en Cm<sup>2</sup> des feuilles pour V1 (sidi Aïch) et V2 (Super Aguadulce) en fonction de la dose du cuivre (0, 100, 200 ppm)

**Fig. 35:** l'évolution des moyennes de Nombre de feuilles pour V1 (sidi Aïch) et V2 (Super Aguadulce) en fonction de la dose du cuivre (0, 100, 200 ppm).

**Fig. 36 :** l'évolution des moyennes de Nombre de feuilles des feuilles pour V1 (sidi Aïch) et V2 (Super Aguadulce) en fonction de la dose du cuivre (0, 200, 400 ppm).

**Fig. 37 :** l'évolution des moyennes de Nombre de gousses pour V1 (sidi Aïch) et V2 (Super Aguadulce) en fonction de la dose du cuivre (0, 100, 200 ppm).

**Fig. 38:** l'évolution des moyennes (moyennes  $\pm$  écart-type) de Nombre de gousses pour V1 (sidi Aïch) et V2 (Super Aguadulce) en fonction de la dose du cuivre (0, 200, 400 ppm).

**Fig. 39:** l'évolution des moyennes de la hauteur de tige (cm) pour V1 (sidi Aïch) et V2 (Super Aguadulce) en fonction de la dose du cuivre (0, 100, 200 ppm).

**Fig. 40 :** l'évolution des moyennes de la hauteur de tige (cm) pour V1 (sidi Aïch) et V2 (Super Aguadulce) en fonction de la dose du cuivre (0, 200, 400 ppm).

**Fig. 41:** l'évolution des moyennes de volume racinaire (ml) pour V1 (sidi Aïch) et V2 (Super Aguadulce) en fonction de la dose du cuivre (0, 100, 200 ppm).

**Fig. 42:** l'évolution des moyennes (moyennes  $\pm$  écart-type) de volume racinaire (ml) pour V1 (sidi Aïch) et V2 (Super Aguadulce) en fonction de la dose du cuivre (0, 200, 400 ppm).

**Fig. 43 :** l'évolution des moyennes (moyennes  $\pm$  écart-type) Longueur racinaire (Cm) pour V1 (sidi Aïch) et V2 (Super Aguadulce) en fonction de la dose du cuivre (0, 100, 200 ppm).

**Fig. 44 :** l'évolution des moyennes (moyennes  $\pm$  écart-type) Longueur racinaire (Cm) pour V1 (sidi Aïch) et V2 (Super Aguadulce) en fonction de la dose du cuivre (0, 200, 400 ppm).

**Fig. 45:** l'évolution des moyennes du nombre des faisceaux cribro-vasculaire pour V1 (sidi Aïch) et V2 (Super Aguadulce) en fonction de la dose du cuivre (0, 100, 200 ppm).

**Fig. 46 :** l'évolution des moyennes du nombre des faisceaux cribro-vasculaire pour V1 (sidi Aïch) et V2 (Super Aguadulce) en fonction de la dose du cuivre (0, 200, 400 ppm).

**Fig. 47:** l'évolution des moyennes de la distance entre les faisceaux cribro-vasculaire ( $\mu\text{m}$ ) pour V1 (sidi Aïch) et V2 (Super Aguadulce) en fonction de la dose du cuivre (0, 100, 200 ppm)

**Fig. 48 :** l'évolution des moyennes de la distance entre les faisceaux cribro-vasculaire ( $\mu\text{m}$ ) pour V1 (sidi Aïch) et V2 (Super Aguadulce) en fonction de la dose du cuivre (0, 200, 400 ppm).

**Fig. 49 :** l'évolution des moyennes du diamètre du méta-xylème ( $\mu\text{m}$ ) pour V1 (sidi Aïch) et V2 (Super Aguadulce) en fonction de la dose du cuivre (0, 100, 200 ppm).

**Fig. 50 :** l'évolution des moyennes du diamètre du méta-xylème ( $\mu\text{m}$ ) pour V1 (sidi Aïch) et V2 (Super Aguadulce) en fonction de la dose du cuivre (0, 200, 400 ppm).

**Fig. 51 :** l'évolution des moyennes de l'épaisseur de la paroi externe des cellules épidermiques ( $\mu\text{m}$ ) pour V1 (sidi Aïch) et V2 (Super Aguadulce) en fonction de la dose du cuivre (0, 100, 200 ppm).

**Fig. 52 :** l'évolution des moyennes de l'épaisseur de la paroi externe des cellules épidermiques ( $\mu\text{m}$ ) pour V1 (sidi Aïch) et V2 (Super Aguadulce) en fonction de la dose du cuivre (0, 200, 400 ppm).

# Introduction

Les activités humaines ont considérablement accru la libération de diverses molécules dans l'environnement dont certaines se révèlent toxiques pour tous les organismes vivants. Parmi les molécules introduites, les métaux lourds occupent une place non négligeable. Ces derniers sont définis par certains auteurs comme des éléments métalliques ayant une masse volumique minimale de 4000 à 5000 kg / m<sup>3</sup> (Thornton, 1999 ; Sanita di Toppi et Gabbrielli, 1999). D'autres définissent comme métaux lourds, les éléments métalliques compris entre le cuivre et le plomb dans le tableau périodique des éléments, en excluant donc le fer et le chrome. Le terme d'éléments traces métalliques (ETM) est donc préférable pour englober l'ensemble de ces molécules (Burnol *et al.*, 2006).

L'apport des métaux au sol se fait généralement soit par retombées atmosphériques, soit par l'application directe au sol ou indirecte via la végétation, de matériaux concentrés en métaux tels les fertilisants, les produits phytosanitaires, les amendements organiques et notamment les boues de station d'épuration (Alloway, 1995 ; Adriano, 2001).

La contamination des sols par les métaux peut avoir deux conséquences majeures. D'une part, elle peut favoriser la dispersion des métaux dans l'environnement vers les eaux de surface par érosion, vers les eaux souterraines et les nappes par lixiviation-lessivage et, enfin, par transferts dans la chaîne alimentaire par l'intermédiaire des animaux et plus encore des végétaux (Adriano, 2001). D'autre part, la contamination des sols par les métaux peut affecter les différentes fonctions du sol, celles contribuant aux services écosystémiques, et en particulier sa fonction de production en zones agricoles. En fait, les activités humaines génèrent de nombreux déchets riches en éléments métalliques. L'accumulation de ces métaux dans la biosphère perturbe le développement, des végétaux, de la microflore et de la microfaune du sol. L'aération du sol s'en trouve réduite et ceci freine alors très nettement la dégradation de l'humus par les microorganismes. Il en découle une diminution des formes azotées minérales c'est-à-dire une baisse de la fertilité du sol, préjudiciable au bon développement des végétaux. En effet, l'appauvrissement du sol en éléments nutritifs ajouté à une absorption excessive des métaux peut conduire à la disparition de certaines espèces non tolérantes, pouvant à terme produire une perte de la biodiversité.

Dans le domaine agricole, la plupart des ETM accumulés dans le sol sont absorbés par les plantes cultivées. Les végétaux ont besoin pour leur croissance et leur développement de certains ions métalliques comme par exemple le cuivre, le zinc, le manganèse, le fer ou le cobalt qui entrent dans la composition de certaines enzymes ou leur servir de co-facteurs (Yang *et al.*, 2005). Ces éléments, nécessaires en faible quantité, s'avèrent cependant toxiques

voire métaux lorsqu'ils sont présents en forte concentration (Hänsch et Mendel, 2009). De plus, tous les ions métalliques ne sont pas indispensables aux plantes. En effet, des métaux comme le cadmium, le nickel, le plomb ou le mercure ne jouent aucun rôle dans la croissance et le développement des plantes. Ils sont dits non essentiels et sont toxiques à l'état de traces (Mendoza-Cózatl *et al.*, 2005). Tous les ETM sont cependant toxiques à forte concentration pour la plupart des plantes (McIntyre, 2003 ; Gardea - Torresdey *et al.*, 2005). L'accumulation des ETM dans les sols génère donc des pertes de rendement conséquentes soit parce que les plantes cultivées se développent moins bien, soit parce que les sols restent inoccupés car impropres à la culture.

Pour des plantes poussant sur des sols contenant une concentration en Cu total naturellement faible, ou en présence de Cu peu mobile, comme les sols calcaires et les sols riches en matière organique dans lesquels le Cu est fortement complexé aux substances organiques, la fourniture de Cu peut être insuffisante (Marschner, 1995). La croissance de la plante est alors sévèrement réduite et des symptômes de déficience peuvent se manifester. Dans ce cas, les concentrations en Cu dans la plante sont inférieures à un seuil de 2-5 mg kg<sup>-1</sup> MS, suivant les espèces végétales et l'état de développement de la plante (Marschner, 1995). Lorsque la teneur en Cu augmente dans le sol, la teneur en Cu observée dans la plante peut atteindre une concentration critique, variable selon l'espèce végétale, à partir de laquelle apparaissent des symptômes de phytotoxicité (Marschner 1995). Reuter et Robinson (1997) indique que le seuil de toxicité en Cu est atteint à partir d'une concentration en Cu de 15 à 30 mg kg<sup>-1</sup> MS dans les feuilles de plantes cultivées.

Chez la plante, la phytotoxicité peut s'exprimer au niveau racinaire (rhizotoxicité) et/ou au niveau des parties aériennes (ISO, 1993 ; 1995) et se caractérise par des réponses moléculaire, métabolique et/ou à différents niveaux d'organisation de la plante entière (ISO, 2006).

La phytotoxicité de Cu se manifeste immédiatement par une croissance réduite des racines, qui sont épaissies, moins ramifiées, avec des radicules de couleur anormalement foncée (Marschner, 1995; Lexmond et van der Vorm, 1981). Au niveau des parties aériennes des plantes elle provoque une diminution globale de la biomasse. La phytotoxicité de Cu semble également se traduire par l'apparition de déficiences en cas d'exposition à des niveaux très élevés de Cu<sup>2+</sup> libre.

C'est dans ce contexte que se situe le présent travail dont l'objectif majeur est d'analyser le comportement de la fève (*Vicia faba* L) face au stress métallique, induit par le

## Introduction

---

cuivre et d'estimer le remodelage comportemental de la plante inscrit dans le processus de son adaptation à l'égard de ce stress. Les plantes sont cultivées dans un substrat remanié et contaminé artificiellement par différentes doses de cuivre. Ces contaminations sont provoquées à différents stades de développement de la plante, considérés comme critiques dans le processus morphogénétique et d'élaboration de la productivité de l'espèce. L'aspect de la qualité des graines est également concerné. Les caractéristiques retenues, reflétant les effets de cette contamination, s'avèrent d'ordre, morphologique, physiologique, biochimique et structural. Les deux parties de la plante, caulinaires et radicales sont concernées par l'évaluation de ces réactions. Au stade germination des graines, considéré comme l'une des phases sensibles à toute contrainte environnementale, les effets de cette contamination sur le déroulement physiologique du processus, sont étudiés.

---

# Chapitre I :

# Revue Bibliographique

## 1. Généralité sur les métaux lourds

Actuellement, dans l'environnement une importante gamme de contaminants existe, tels que les métaux lourds, les substances combustibles, les déchets dangereux, les explosifs et les produits pétroliers. Ils se divisent en deux catégories : les composés organiques et inorganiques. Les contaminants inorganiques majeurs sont les métaux lourds. Ils représentent un problème différent des contaminants organiques : contrairement à ces derniers, ils ne peuvent pas être dégradés par les microorganismes, ils doivent être « immobilisés » ou extraits.

Certains métaux ne sont pas nécessaires à la vie, mais ils perturbent souvent le cours normal des processus métaboliques, même à l'état de traces à l'exception de faibles doses tolérables (Claus et *al.*, 2004). D'autres éléments métalliques ou oligo-éléments (Fe, Mn, Zn, Cu, Mo, Ni), présents à l'état de traces, sont essentiels pour l'organisme, l'accroissement de leur concentration peut représenter un danger pour les organismes vivants. (Marschner, 1995).

### 1.1 Définition des métaux lourds

Le terme de métaux lourds est arbitraire et imprécis. Il est utilisé pour des raisons de simplicité et il recouvre des éléments ayant des propriétés métalliques (ductilité, conductivité, densité, stabilité des cations, spécificité de ligand) et un numéro atomique  $> 20$  (Raskin et *al.*, 1997). Ce terme de métaux lourds désigne selon Elmsley (2001) des éléments chimiques toxiques dont la densité excède  $5\text{g/cm}^3$ . Sous cette appellation figurent des éléments qui, pour certains, sont effectivement des métaux tels que Ni, Cu, Zn, Pb, Hg, Al mais aussi des métalloïdes tels que As et Se. C'est pourquoi, une classification plus complexe, basée sur les propriétés de formation de ligands a été proposée par Nieboer et Richardson (1980), avec la dénomination d'Eléments-Traces Métalliques, préférée par certains chercheurs. Aucune définition satisfaisante n'a en définitive émergée (Mallick et Rai, 2002).

### 1.2 Historique

L'histoire des métaux lourds n'a pas été écrite. Et pourtant, ils paraissent étroitement liés à la civilisation. L'or, l'argent, le cuivre ont permis de fabriquer les premières pièces de monnaie. Sans métaux lourds, il n'y aurait pas eu de distribution d'eau potable à Rome par les canalisations en plomb, ni peintures, car les peintures anciennes ont résisté au temps grâce aux métaux incorporés aux pigments («jaune de Naples», à base de plomb, «vermillon de

mercure)), ni vitraux dans les cathédrales, ni miroirs, étamés d'un amalgame d'étain et de mercure. L'homme a utilisé les métaux lourds et continue à les utiliser, parfois avec excès et souvent avec inconscience. Ou pire, en toute conscience. Si les métaux lourds ont fait la civilisation, ils peuvent aussi la défaire. Car les métaux lourds sont aussi des toxiques puissants (Miquel, 2001)

### 1.3 Origine des métaux lourds

Les métaux lourds sont des constituants naturels de tous les écosystèmes et on les trouve dans l'atmosphère, l'hydrosphère, la lithosphère et la biosphère. Leur distribution dans l'environnement procède de deux origines :

- l'une, naturelle est le résultat de processus géogéniques comme l'érosion, les précipitations géochimiques de roches et de l'eau de source, l'activité volcanique et bactérienne (Sanita di Toppi et Gabrielli, 1999 ; Baize et Sterckeman, 2001)
- l'autre, relève des activités anthropogéniques. En effet, ces dernières années, le développement des activités industrielles a provoqué un accroissement considérable de la teneur en métaux lourds dans l'environnement où ils peuvent parvenir de différentes manières. Sous forme gazeuse, dissoute ou de particules liées, les polluants peuvent pénétrer dans le sol par voie aérienne (déposition sèche), en utilisant l'eau comme vecteur de transport (précipitation, eau de surface, déposition humide) ou encore via des solides organiques tels les boues d'assainissement, le compost, les fertilisants et les pesticides (Sanita di Toppi et Gabrielli, 1999 ; Baize et Sterckeman, 2001)

## 2. Le cuivre comme polluant environnemental

### 2.1 Généralités

Du latin « aes cyprium », « coprium », « cuprium »: « bronze chypre ». C'est un métal probablement connu depuis l'âge de la pierre. Le cuivre est un élément chimique de symbole de Cu et de numéro atomique 29, il appartient au groupe 11 et de période 4. Sa masse atomique est de 63,546g/mole, il est présenté sur notre planète par deux isotopes stables :  $^{63}\text{Cu}$  (69,17%) et  $^{65}\text{Cu}$  (30,83%). Le cuivre est principalement utilisé:

➤ pour fabriquer des câbles, des fils et des appareillages électriques, car il possède la meilleure conductivité électrique de tous les métaux industriels;

➤ on l'utilise également pour les toitures, les canalisations d'eau et de gaz en raison de

sa résistance à la corrosion;

➤ par ailleurs, comme c'est un excellent conducteur de chaleur, le cuivre sert à fabriquer des ustensiles de cuisine, des chaudières et des échangeurs de chaleur;

➤ le cuivre entre aussi dans la composition d'engrais et de certains pesticides, sous la forme de sulfate de cuivre;

➤ de nombreux alliages à base de cuivre (principalement le bronze) sont utilisés pour la fabrication de pièces de monnaie, de médailles, de statues et de cloches, en raison de leur dureté et de leur résistance à la corrosion.

Le cuivre a également des propriétés bactéricides reconnues: il détruit les microorganismes et les bactéries (Adriano, 2001)

## **2.2. Distribution naturelle du cuivre**

### **2.2.1. Distribution géologique du cuivre**

Le cuivre est largement distribué géographiquement et géologiquement sur la planète. Cet élément chimique occupe toutefois une mince fraction dans la formation du matériel parental du sol. On retrouve en moyenne 70 ppm de cuivre dans la croûte terrestre (Parker, 1981). Cet élément se trouve en plus grande concentration dans les roches basaltiques que dans les granits et a tendance à être absent dans les roches carbonatées (McBride, 1981). Dans les minéraux primaires. Le cuivre se présente plus fréquemment sous forme de sulfide (ex.: bornite:  $Cu_5FeS_4$ ) ou de chalcopyrite (ex.:  $CuFeS_2$ ) (McBride, 1981 ; Parker, 1981). Le cuivre des minéraux secondaires se retrouve sous forme d'oxydes, de carbonates, de silicates, de sulfates et de chlorures (McBride, 1981).

### **2.2.2. Distribution géographique du cuivre**

Le cuivre est assez irrégulièrement réparti à la surface du globe, on trouve les grands gisements au sud du bouclier canadien dans le Michigan et Montana, ainsi que dans le Sud-Ouest des Etats-Unis, au nord du Mexique, au Pérou et Chili, sur la plate forme africaine (Zaïre et Zambie), en Afrique du sud (Transvaal), en Australie et aussi en Asie .Il existe de nombreuses autres mines un peu partout dans le monde (McBride, 1981).

### 2.3. Le cuivre dans le sol

Le stock d'éléments traces métalliques (ETM) actuellement présent dans les sols représente la résultante de l'héritage du fond géochimique (Robert et Juste, 1999), des apports naturels et anthropiques et des sorties de ce système vers d'autres composantes de l'environnement. Les apports en Cu dans la biosphère se font principalement par voies naturelles (activité volcanique, feux de forêts, décomposition de la végétation et érosion éolienne) et par voies anthropiques (activités minières, industrielles et agricoles, la production d'énergie et le transport) (Kabata-Pendias et Pendias, 1992; Dameron et Howe, 1998; Anonyme, 2004).

#### 2.3.1. Les formes chimiques du cuivre

Le Cu dans les sols est principalement adsorbé par les matières organiques, les minéraux argileux, les oxydes, hydroxydes et oxyhydroxydes, les carbonates, phosphates et sulfures (Kabata-Pendias et Pendias, 1992). Seulement une faible portion est sous forme d'ion libre hydraté ou échangeable (Anonyme, 2004). La majeure partie du Cu se présente dans les sols sous la forme résiduelle ou complexée à la matière organique (MO) (MacLaren et Crawford, 1973 a et b; Ramos et *al.*, 1994; Ma et Rao, 1997; Yu et *al.*, 2004). MacLaren et Crawford (1973 a et b) ont fractionné le Cu sur 24 types de sols anglais et ont montré que plus de 50 % du Cu était retenu dans le réseau des minéraux altérables, 30 % était lié à la MO et 15 % était adsorbé par les hydroxydes de Fe et de Mn. Le « pool » disponible ne représentait que 1 à 2 % du total.

#### 2.3.2. Distribution du cuivre dans le profil de sol

Des recherches antérieures sur le mouvement des métaux dans le sol ont montré que la plupart des métaux apportés aux sols calcaires ont tendance à rester à la surface (Mc Laren et Crawford, 1973; Kuo et *al.*, 1983; Miller et *al.*, 1983; Planquart et *al.*, 1999).

Ce faible déplacement des éléments est attribué au pH des sols, ainsi qu'à l'adsorption des éléments métalliques sur les différents constituants des sols, en particulier la matière organique dans le cas du cuivre. Mullin et *al.* (1982) ont montré que la mobilité de Cu et de Zn après applications sous forme de sulfates pendant quinze ans, est négligeable pour des sols à pH 6-7, ayant des teneurs faibles en matière organique. Brun (1998) rapporte aussi que le Cu apporté par les traitements phytosanitaires se retrouve essentiellement dans l'horizon supérieur (0-20 cm) des sols viticoles calcaires.

Les argiles sont également des phases fixatrices de métaux (Besnard *et al.*, 2001), mais elles peuvent ainsi permettre leur dissémination de par leur petite taille qui leur permet d'être aisément transportées par le vent. Ceci est particulièrement vrai dans le cas du cuivre (Madrid *et al.*, 2008).

### **2.3.3. La mobilité du cuivre dans les sols**

La migration du Cu est très faible, quel que soit le type de sol (Delas, 1963). Dès qu'il est en contact avec le sol, à la suite d'un dépôt atmosphérique ou d'un épandage à des fins agricoles, le Cu sera fortement adsorbé dans les premiers centimètres du sol (Brun *et al.*, 1998; Dameron et Howe, 1998; Juste et Mench, 1992; Schramel *et al.*, 2000; Zinati *et al.*, 2001). Néanmoins, la mobilité du Cu, aussi minime soit-elle, peut se produire, soit sous forme d'un entraînement vertical ou d'un déplacement latéral, soit par absorption et exportation par les végétaux. Il est important d'en faire mention, car ces différents types de migration pourront être observés dans un parc à résidus miniers.

### **2.3.4. Sources et niveau de contamination en cuivre des sols**

#### **2.3.4.1. Niveau de contamination en cuivre des sols**

Bien que la fraction disponible des métaux soit généralement très inférieure à la concentration totale dans le sol, cette dernière reste le premier indicateur de la contamination des sols par les métaux. Le cuivre est un élément ubiquiste sur terre, présent dans le fond pédo-géochimique à des concentrations généralement comprises entre 15 et 30 mg Cu kg<sup>-1</sup> sol (Baker et Senft, 1995 ; Kabata-Pendias et Pendias, 1992 ; Adriano, 2001). En France, les travaux de Baize (1997), ont montré sur 557 sols français choisis en évitant les sols viticoles que 90% des teneurs en Cu étaient comprises entre 5 et 28 mg Cu kg<sup>-1</sup> sol, avec une valeur médiane de 14 mg Cu kg<sup>-1</sup> sol.

#### **2.3.4.2. Sources de contamination en cuivre des sols**

Les activités anthropiques peuvent entraîner ponctuellement un enrichissement des sols en Cu jusqu'à des concentrations près de 150 fois supérieures au fond pédo-géochimique (Vulkan *et al.*, 2000). Les activités industrielles sont généralement à l'origine des niveaux de contamination les plus élevés mais qui restent en principe localisée, dans des situations de pollution « concentrée ». Des concentrations de 1000 à 8700 mg Cu kg<sup>-1</sup> ont été couramment rapportées dans des sols situés à proximité de sites d'exploitation minière et d'industries

métallurgiques (Kabata-Pendias et Pendias, 1992 ; Vulkan et *al.*, 2000). Des niveaux de contamination plus faibles mais s'étendant sur plusieurs dizaines de kilomètres, dans des situations de pollution « diffuse », ont également été répertoriés en périphérie des sites de fonderies (Adriano, 2001 ; Legrand et *al.*, 2005). Les activités agricoles sont également à l'origine de la contamination en Cu des sols, principalement de façon diffuse. L'apport d'amendements organiques (boues de station d'épuration, fumiers et lisiers de porc en particulier) peuvent engendrer un accroissement des concentrations en Cu dans les sols jusqu'à des valeurs de l'ordre de 600 mg kg<sup>-1</sup> (Baker et Senft, 1995 ; Adriano, 2001). Cependant, la source de contamination diffuse des sols agricoles la plus répandue est liée à l'application de fongicides à base de Cu sur les cultures, principalement en viticulture et en arboriculture (Loué, 1993).

## 2.4. Biodisponibilité du cuivre

### - Définition

La biodisponibilité de Cu dans les sols est simplement définie comme la potentialité de Cu à être absorbé par une plante (Singh et Rakipov, 1988). Pour un système sol - plante, la biodisponibilité de Cu est l'aptitude de Cu à être transféré d'un compartiment du sol vers le système racinaire de la plante, lieu de son prélèvement (Juste et *al.*, 1995). Ce transfert s'effectue essentiellement par l'intermédiaire de l'absorption de Cu contenu dans la solution du sol par les racines (Loué, 1993; Marschner, 1995). La biodisponibilité de Cu dépend donc de la spéciation, de toutes les propriétés physico-chimiques qui gouvernent la spéciation, et par conséquent la mobilité de Cu dans le sol, mais aussi de l'espèce végétale considérée (Mitchell et *al.*, 1978; Lexmond, 1980; Sanders et *al.*, 1986b; Sims, 1986; Ebbs et *al.*, 1997).

### 2.4.1. Facteurs de contrôle de la biodisponibilité du cuivre pour les plantes

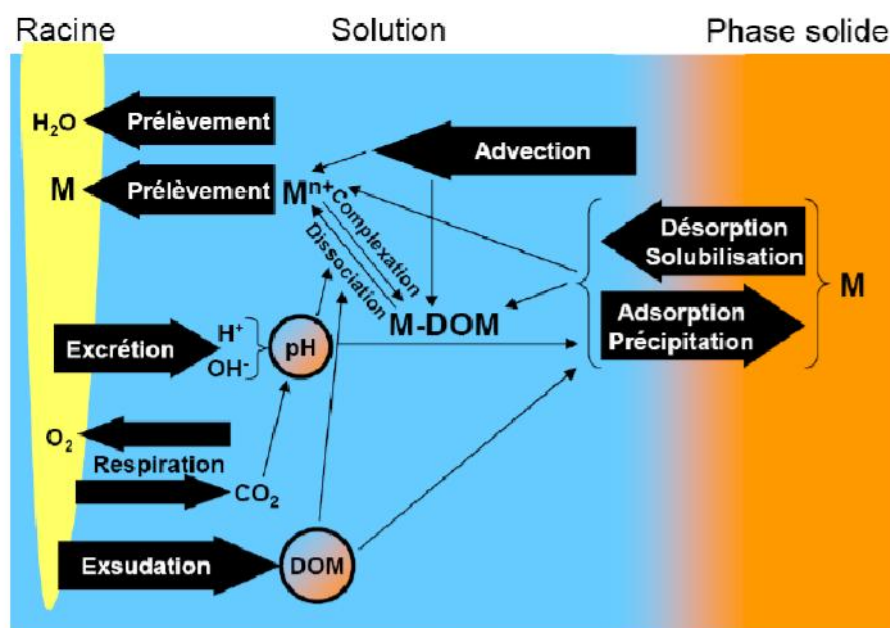
L'interface sol-racine est le siège d'intenses des processus physiques, chimiques et biologiques qui participent au contrôle du prélèvement des métaux par les plantes (Fig.01) (Hinsinger, 2001 ; Hinsinger et *al.*, 2005). Dans cette partie, nous nous focaliserons principalement sur les processus biologiques et chimiques intégrant l'ensemble des fonctions rhizosphériques induites par l'activité racinaire. (Gregory et Hinsinger, 1999 ; Hinsinger et *al.*, 2005 ; Gregory, 2006).

Une des principales fonctions de la racine concerne le prélèvement de l'eau et des éléments minéraux (dont les oligo-éléments comme Cu). Cette fonction induit un flux d'eau

(convection) et de métal vers la racine par le jeu de processus d'advection (mass-flow) et de diffusion.

La respiration des racines et des microorganismes présents dans la rhizosphère est également responsable d'un influx d' $O_2$  et d'un efflux de  $CO_2$  qui peuvent modifier les équilibres chimiques, notamment par l'intermédiaire du pH, mais aussi de la pression d'oxygène ( $pO_2$ ) et de la concentration en ion bicarbonate ( $HCO_3^-$ ).

En lien avec l'absorption des éléments minéraux majeurs et son statut nutritionnel, la racine excrète des protons ( $H^+$ ) et des ions hydroxyl ( $OH^-$ ) ou bicarbonate qui peuvent engendrer des modifications importantes de pH dans la rhizosphère. Enfin, la racine exsude une grande diversité de composés organiques qui enrichissent les MOD dans la rhizosphère. L'ensemble de ces flux participent au contrôle de la disponibilité des métaux dans la rhizosphère et donc à leur biodisponibilité environnementale pour les plantes (Fig.01).



**Fig. 01** : Processus biologiques et chimiques induits par les activités racinaires et leur implication sur la dynamique des métaux (M) à l'interface sol-solution-racine (Hinsinger 2001 ; Hinsinger et *al.*, 2005).

## 2.5. Le cuivre dans la plante

### 2.5.1. Le cuivre, oligo-élément

Les oligo-éléments comme Cu, sont des éléments indispensables à la vie mais qui se trouvent présents en proportion très faibles dans les tissus biologiques (Loué, 1993). Certains éléments traces cationiques plurivalentes comme Cu peuvent se présenter sous différents états d'oxydation ( $\text{Cu}^{2+} + e^- \leftrightarrow \text{Cu}^+$ ) et jouent ainsi un rôle d'accepteur ou de donneur d'électrons, très important dans les multiples systèmes enzymatiques mettant en jeu des réactions d'oxydoréduction. Ils sont en outre nécessaires aux enzymes, soit comme activateurs soit comme constituants spécifiques de systèmes enzymatiques (Loué, 1993; Clemens, 2001). Les flux d'absorption de Cu sont parmi les plus bas de ceux de tous les éléments traces et Cu est ainsi absorbé par la plante en très petite quantité. Dans le cas d'une croissance optimale, en fonction des espèces et des cultivars, les concentrations en Cu dans les plantes atteignent des valeurs comprises entre 5 et 15 voire 20  $\text{mg kg}^{-1}$  de matières sèches (MS) dans les parties aériennes (Reuter et Robinson, 1997).

### 2.5.2. Rôle physiologique du Cuivre

Le Cu est un nutriment essentiel pour les plantes (Marschner, 1995; Larcher, 2003). Il joue un rôle important dans la photosynthèse (Coïc et Coppenet, 1989; Loué, 1993). En effet, environ 70 % du Cu d'un végétal se retrouve dans la chlorophylle (Katyal et Randhawa, 1986). Il a une fonction capitale dans l'assimilation (Katyal et Randhawa, 1986) et la respiration (Coïc et Coppenet, 1989), mais aussi dans le métabolisme protéique, la lignification et la production d'ADN et d'ARN (Kabata-Pendias et Pendias, 1992; Marschner, 1995). En outre, il est nécessaire aux enzymes, car en changeant de valence il assure l'oxydation ou la réduction dans le cycle catalytique (Loué, 1993). Il joue un rôle important dans divers processus métaboliques, en participant à la constitution de différentes protéines (Marschner, 1995) :

- La plastocyanine pour la photosynthèse;
- Les superoxydes dismutases pour la lutte contre le stress oxydant;
- Les peroxydases pour la lignification;
- Les oxydases pour l'oxydation de composés tels que les ascorbates, les diamines, les phénols ;
- Les cytochromes oxydases pour la respiration cellulaire.

### 2.5.3. Absorption du cuivre

Bien que Cu soit majoritairement présent sous forme complexée par des exsudats racinaires ou des ligands organiques du sol dans l'environnement racinaire (Graham, 1981), la forme libre semble être la seule absorbée par les racines conformément à la théorie de l'ion libre (Graham, 1981 ; Kabata-Pendias et Pendias, 1992 ; Adriano, 2001). Cependant, des travaux suggèrent que Cu complexé par des ligands organiques (anions organiques, phytosidérophores) pourrait être prélevé directement sans dissociation préalable du complexe formé avec ces ligands (Puig *et al.*, 2007).

#### 2.5.3.1. Adsorption du cuivre dans l'apoplasme racinaire

L'apoplasme racinaire présente la particularité d'être chargé négativement, ce qui est principalement dû à la prédominance des fonctions carboxyliques dans la lamelle moyenne et le premier manteau cellulaire (Marschner, 1995). Le compartiment apoplasmique présente une constante d'acidité (pKa) de 3-3,6 et, en conséquence, plus de 80 % des groupements fonctionnels sont dissociés pour des pH supérieurs à 4-4,5 (Allan et Jarrell, 1989). Cette propriété confère à l'apoplasme racinaire la capacité d'adsorber les cations métalliques, soit sous forme d'interactions électrostatiques (Dufey *et al.*, 2001), soit sous forme d'adsorption spécifique comme cela peut être le cas pour Cu (Allan et Jarrell, 1989 ; Sattelmacher, 2001).

##### 2.5.3.1.1. Capacité d'échange cationique racinaire

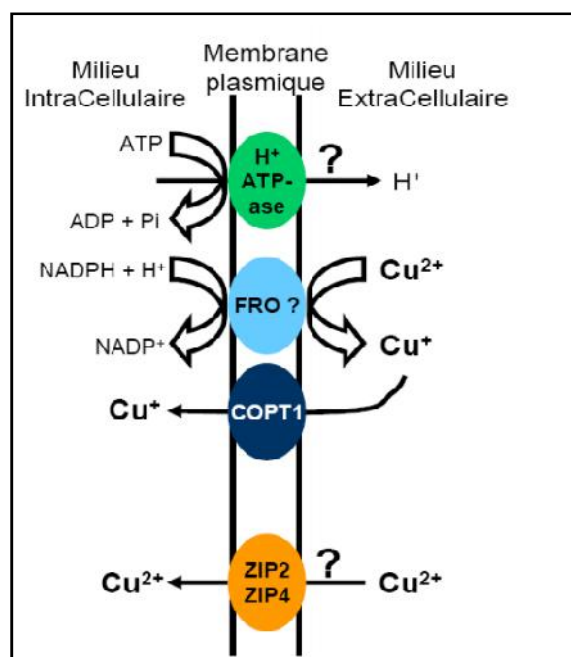
Indépendamment de la forme d'adsorption, la capacité de rétention des métaux par l'apoplasme racinaire est caractérisée par le paramètre de « capacité d'échange cationique racinaire » (CECR). La composition de l'apoplasme et donc la CECR varient suivant l'espèce, la variété et l'âge du végétal (Marschner, 1995 ; Dufey *et al.*, 2001). Les sites réactifs de l'apoplasme racinaire présentent une capacité d'adsorption croissante quand le pH du milieu augmente et/ou lorsque la force ionique diminue, du fait d'une diminution de l'effet d'écran dû aux cations majeurs en solution (Bravin, 2008). A l'échelle du système racinaire, Bravin (2008), a estimé qu'environ 60 % de Cu contenu dans les racines étaient localisés dans l'apoplasme.

#### 2.5.3.2. Mécanismes d'absorption du cuivre

L'absorption proprement dite des métaux correspond à leur transport au travers de la membrane plasmique des cellules du cortex racinaire. Il est couramment admis que seule la

forme libre ( $M^{n+}$ ) d'un métal M est transportée ainsi. Le cuivre est un oligo-élément, essentiel à la plante, qui peut devenir phytotoxique en cas de trop forte accumulation dans les tissus (Marschner, 1995 ; Mengel et Kirkby, 2001). La plante doit donc réguler finement l'absorption de Cu au niveau racinaire pour maintenir son homéostasie (Sancenón et al., 2004)

Pour autant, les mécanismes d'absorption de Cu restent à l'heure actuelle encore mal identifiés et ont été essentiellement caractérisés chez *Arabidopsis thaliana* L. (Sancenón et al., 2004 ; Puig et al., 2007). L'absorption racinaire de Cu semble principalement dépendre de transporteurs à haute affinité spécifique de  $Cu^+$  appartenant à la famille CTR (Copper TRansporter) et en particulier COPT1 (Puig et al., 2007). Il semble essentiellement localisé au niveau des apex des racines primaires et secondaires, bien que certaines expérimentations le localisent en quantité équivalente au niveau de la zone d'élongation et des poils racinaires. Le cuivre libre étant majoritairement présent sous forme  $Cu^{2+}$  dans la solution du sol en conditions oxydantes (Lindsay, 1979), Cu doit être réduit sous forme de  $Cu^+$  avant son absorption par COPT1. Cette étape de réduction pourrait être assurée par l'intermédiaire de protéines réductases insérées dans la membrane plasmique, FRO 2 et/ou 3 (Ferric Reductase Oxidase) (Fig.02), également impliquées dans la réduction de  $Fe^{3+}$  chez les plantes. (Cohen et al., 1997 ; Puig et al., 2007).



**Fig. 02** : Mécanismes impliqués dans l'absorption du cuivre (Cu) au niveau de la membrane plasmique de la cellule racinaire. (Zheng et al., 2005 ; Puig et al., 2007).

Le rôle des réductases de type FRO reste malgré tout à vérifier *in vivo* dans le cas de Cu. Zheng et *al.* (2005) ont observé que l'augmentation de l'activité réductase induite par une déficience en Cu était perceptible au niveau de l'ensemble du système racinaire du trèfle violet (*Trifolium pratense* L.), contrairement à l'augmentation induite par une déficience en Fe qui était uniquement localisée au niveau des apex racinaires. Ces résultats ont suggéré que les réductases induites sous déficience en Cu seraient différentes de celles induites sous déficience en Fe. Cohen et *al.*, (1997) ont observé qu'une déficience en Cu induisait également un efflux de protons chez le pois (*Pisum sativum* L.), comme cela est couramment observé lors d'une déficience en Fe. Zheng et *al.*, (2005) n'ont en revanche pas observé d'acidification du milieu extracellulaire sous déficience en Cu chez le trèfle violet. D'autre part, Cu pourrait également être absorbé par les racines sous forme  $\text{Cu}^{2+}$  par l'intermédiaire de protéines de transport de la famille ZIP (ZRT, IRT-like Proteins), ZIP 2 et 4 bien que les données de la littérature soient assez contradictoires sur ce point (Puig et *al.*, 2007).

#### 2.5.4. Translocation du cuivre

Le cuivre est peu mobile au sein de la plante, ses déplacements dépendant étroitement de l'état nutritionnel général, et en particulier du métabolisme de l'azote (Loué, 1993), le cuivre est relativement immobile pour les plantes souffrant de carence, tandis que sa mobilité est maximale dans le cas d'une consommation de luxe (Kabata-Pendias et Pendias, 1992). Les racines ont en effet une forte capacité à immobiliser le cuivre, au niveau des parois cellulaires, et les mécanismes de translocation sont encore mal connus. Dans les feuilles, le cuivre semble principalement lié aux plastocyanines, tandis que dans le xylème et le phloème, où les concentrations sont de l'ordre de traces, les concentrations sont liées à celles d'acides aminés. Sur une culture de maïs, Jarausch Wehrheim et *al.*, (1996) ont montré que le cuivre était dans un premier temps accumulé au niveau des racines, puis, après 14 semaines de culture, l'élément était mobilisé vers les parties aériennes.

#### 2.5.5. Distribution du cuivre dans la plante

Une fois prélevés, les métaux se redistribuent dans la plante par l'intermédiaire de transporteurs plus ou moins spécifiques, de manière à maintenir l'homéostasie et un fonctionnement physiologique adéquat de la plante (Puig et *al.*, 2007). Dans le cas de Cu, son affinité importante pour l'apoplasme racinaire se traduit par une accumulation de Cu préférentielle dans les racines (Marschner, 1995). Le rapport des concentrations totales de Cu

entre les racines et les parties aériennes peut considérablement varier et être compris entre 2,5 et 166 en fonction du niveau d'exposition des plantes (Brun et *al.*, 2001). Lorsque seule la fraction symplasmique de Cu racinaire est considérée, le rapport entre Cu dans les racines et Cu dans les parties aériennes diminue, bien que le pool racinaire reste 2 à 20 fois supérieures (Michaud et *al.*, 2008). Cette localisation préférentielle de Cu dans les racines rend le pool racinaire beaucoup plus sensible que les parties aériennes aux variations de la disponibilité de Cu dans le sol.

## **2.6. Carence et phytotoxicité du cuivre**

### **2.6.1. Carence en cuivre**

Selon Larcher (2003), la concentration moyenne en Cu dans les plantes est de 4 à 20 mg/kg de matière sèche, mais seulement 5 à 10 mg/kg de matière sèche sont requis pour une croissance normale. Une carence en Cu aura un effet négatif sur le métabolisme carbohydrate (inhibition de la photosynthèse, de la respiration et de la distribution des carbohydrates), le métabolisme de l'azote (fixation de l'azote, dégradation et synthèse de protéines), l'édification de la paroi cellulaire (lignification), les transferts intercellulaires de l'eau, la production de graine (viabilité des pollens) et sur la résistance aux maladies (Bussler, 1981; Schulte et Kelling, 1999). Selon Katyal et Randhawa (1986), le seuil de carence pour une plante se situerait aux alentours de 4 mg /kg de matière sèche. De plus, des sols minéraux et organiques contenant respectivement 6 mg et 30 mg /kg de sol sont considérés comme déficitaires en Cu (Katyal et Randhawa, 1986). Les carences se traduisent par des nécroses du méristème apical, une distorsion et une chlorose des jeunes feuilles (Marschner, 1995).

### **2.6.2. Phytotoxicité du cuivre**

Le cuivre, comme les autres éléments essentiels B, Mn, Mo et Zn, est un oligoélément potentiellement phytotoxique en trop forte concentration. La phytotoxicité de Cu se manifeste principalement au travers de la rhizotoxicité et parfois de la mise en place d'une déficience induite en Fe. (Kabata-Pendias et Pendias, 1992 ; Marschner, 1995). Les principaux symptômes observés chez les plantes suite à une exposition métallique sont une inhibition de la croissance, une chlorose foliaire, des lésions nécrotiques conduisant à un jaunissement progressif puis à un repliement ou un dessèchement du feuillage (Toppi et Gabbrielli, 1999).

Les mécanismes moléculaires liés à ces symptômes sont encore mal connus mais il semble que deux voies puissent être distinguées :

1. Une toxicité liée aux ions métalliques capables d'interagir directement avec divers processus physiologiques
2. Une toxicité liée à la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) pouvant elles-mêmes causer des dommages cellulaires, en particulier au niveau des lipides membranaires via le processus de lipoperoxydation et par altération du matériel génétique (Toppi et Gabrielli, 1999).

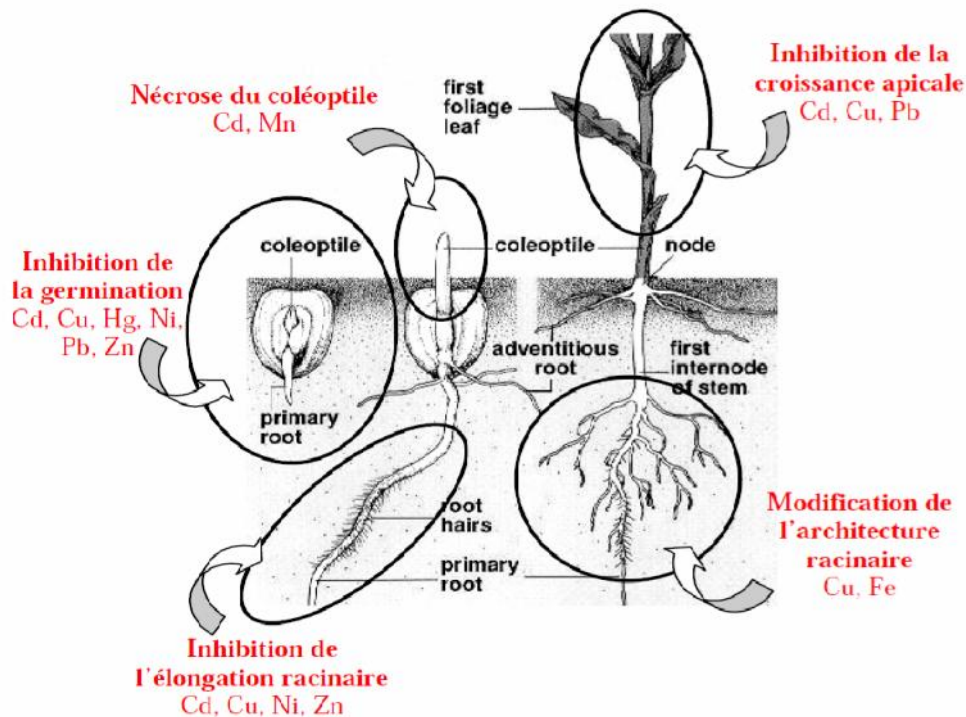


Fig. 03 : Possibles interactions métalliques lors du développement des plantes (Prasad, 1999).

### 2.6.3. Impacts de la contamination en Cu

#### 2.6.3.1. Fonctionnement de l'écosystème

Lorsque le sol est contaminé en Cu, il y a une diminution et un ralentissement des processus de nitrification (Sauvé et *al.*, 1997) et de minéralisation (Dumestre et *al.*, 1999), qui se traduit par une moindre décomposition de la litière (Hutchinson et Symington, 1997). Il peut donc y avoir une couche de litière plus importante mais l'inverse est aussi rapporté car la production de litière par les plantes est aussi plus faible (Boon et *al.*, 1998). Dans les sols contaminés, la contamination s'accompagne souvent d'une mauvaise structure physique du sol (compaction, tassement), d'une faible rétention de l'eau, d'une pauvreté en nutriments (Whiteley et Williams, 1993), d'une acidité du sol (Simmons et *al.*, 2008), d'une sécheresse et

d'une forte érosion (Wong 2003). En sol contaminé en Cu les déshydrogénases et les catalases qui sont impliquées dans la respiration du sol sont inhibées (Ratnikov *et al.*, 2005). La faune du sol est affectée par la contamination du sol car de nombreux individus comme les lombrics ingèrent des particules du sol ou sont en contact dermal avec lui. Ils accumulent du Cu et ensuite sont consommés par des prédateurs qui vont accumuler du Cu à leur tour contaminant la chaîne alimentaire (Maenpaa *et al.*, 2002).

#### **2.6.3.2. Communautés végétales**

La contamination du sol en Cu entraîne des diminutions de la richesse spécifique, du couvert végétal (Hutchinson et Symington, 1997) et de la diversité (Poschenrieder *et al.*, 2001). La végétation se présente sous forme de patches et le couvert végétal peut représenter moins de 3% de la surface du sol (Shu *et al.*, 2005). La structure des communautés est modifiée. Les premières plantes à coloniser le sol contaminé vont être les mousses et les herbacées, en particulier les Poacées, car elles sont tolérantes à des conditions environnementales contraignantes (Hutchinson et Symington, 1997). La proportion d'herbacées augmente tandis que celle des plantes ligneuses diminue (Banasova *et al.*, 2006). Les familles dominantes sont souvent les Poacées, les Brassicacées et les Fabacées avec une forte capacité d'adaptation pour les Poacées et les Brassicacées et la fixation de l'azote pour les légumineuses (Wang *et al.*, 2004).

#### **2.6.3.4. Effet du cuivre sur la plante**

##### **a - La germination**

Dans des sols contaminés en Cu, la germination est plus lente (Kumpiene *et al.* 2006). Le Cu agit sur 2 stades, la germination des graines et l'installation des plantules (Cox et Hutchinson, 1980).

Le développement initial des semis serait plus faible pour une zone contaminée, cependant il n'y aurait pas d'effet du Cu sur le nombre de graines germées (Salemaa et Uotila, 2001) car lors de la germination les graines utilisent leurs propres réserves plutôt que celles du sol (Mahmood *et al.*, 2005). Par contre, chez des espèces sensibles comme le riz, le pourcentage de germination est affecté négativement et il n'y a plus que 20% de germination pour une contamination de 2 mM Cu (Ashan *et al.*, 2007).

Lors d'une exposition des graines au Cu, des diminutions du contenu en huile, de la concentration en protéines, en méthionine, en carbohydrates, en lipides et une augmentation des phénols se produisent (Malan et Farrant 1998, Khurana *et al.*, 2006).

Le Cu inhibe le transport des nutriments à partir des cotylédons. Il y a moins d'acides aminés dans les cotylédons à cause d'une inhibition de la protéolyse, réduction du transport des sucres et des carbohydrates vers les cellules en croissance, et inhibition des amylases et phosphatases (Mihoub *et al.*, 2005). La reproduction des plantes adultes est modifiée, le nombre et le poids des graines produites sont plus faibles (Brun *et al.*, 2003) et la reproduction végétative est favorisée (Vidic *et al.*, 2006).

### **b - La partie aérienne**

Une contamination en Cu du sol entraîne une exposition des racines via la solution du sol et l'imprégnation en Cu du végétal induit une diminution de la biomasse aérienne des plantes d'autant plus importante que la contamination est élevée (Cook *et al.*, 1997 ; Vinit-Dunand *et al.*, 2002). Ces diminutions seraient dues à des faibles niveaux de Ca dans les feuilles car le Ca affecte la division et l'élongation cellulaire (Cook *et al.*, 1997). Il y a apparition de symptômes tels que les chloroses, les nécroses sur limbe supérieur des feuilles et l'épinastie (Cuypers 2000 ; Demirevska-Kepova *et al.*, 2004). Les chloroses seraient dues à des modifications de l'homéostasie d'éléments essentiels comme le Fe (Chatterjee *et al.*, 2000 ; Michaud *et al.*, 2007).

Les feuilles jaunissent et des spots marron apparaissent sur le limbe, c'est une réponse « dose – dépendante » (Franchin *et al.*, 2007). Des symptômes similaires sont retrouvés chez l'orge (Guo *et al.*, 2007). En stress, la transpiration de la plante augmente et le contenu en eau est plus faible (Demirevska-Kepova *et al.*, 2004, Ashan *et al.*, 2007). Les feuilles sont petites, crispées et ont une teinte vert foncé, c'est le « bronzing » (Bessoule et Mench, 2002) et elles ferment leurs stomates pour limiter les pertes en eau et les chloroplastes sont altérés ou dégradés (Chatterjee *et al.*, 2000).

### **c - la partie racinaire**

En excès de cuivre, la longueur des racines diminue ; il y a apparition de nécroses (Inaba et Takenaka, 2005), de malformations (Cook *et al.*, 1997), modification du sens de croissance des racines qui poussent pour s'éloigner de la contamination (Archambault et Winterhalder, 1995) et modification de l'architecture du système racinaire (Fuentes *et al.*,

2007) Les racines sont rabougries, épaisses et deviennent marrons pour une concentration supérieure à  $1\mu\text{M}$  dans la solution nutritive (Michaud *et al.*, 2008). La cuticule des racines est plus épaisse, plus cassante et marron, en particulier au niveau des méristèmes, il y a moins de poils absorbants et le système racinaire est déformé (Sheldon et Menzies, 2005).

La diminution de la croissance des racines a pour conséquence celle de la surface de prélèvement de la plante et donc une diminution du prélèvement en eau et nutriments (Brun *et al.*, 2003). L'inhibition de la croissance racinaire peut s'expliquer par les processus de lignification. Quand le Cu est en excès dans les cellules des racines la concentration en  $\text{H}_2\text{O}_2$  et les quantités de peroxydases impliquées dans la synthèse de la lignine augmentent (Lin *et al.*, 2005). L'augmentation de la lignine peut engendrer une diminution de l'accessibilité du Cu aux cellules (Cuypers, 2000). La lignine peut aussi se lier avec les polysaccharides des parois cellulaires, ce qui va les rigidifier et gêner la croissance des cellules (Dos Santos *et al.* 2004).

#### **d - Physiologie et biologie cellulaire**

##### **d-1 La photosynthèse et autres fonctions végétales**

Le Cu serait responsable d'une inhibition de la photosynthèse par la peroxydation des lipides des membranes des thylakoïdes, le blocage de l'activité de la ribulose, 1-5, biphosphate carboxylase-oxygénase (Cook *et al.*, 1997 ; Vinit-Dunand *et al.*, 2002), de la synthèse de la chlorophylle (Chl), et en interférant au niveau des photosystèmes (Cuypers, 2000). Ceci résulte en une plus forte sensibilité à la photoinhibition (Patsikka *et al.* 2002). Il y a diminution des contenus en Chl totale, a et b (Chatterjee et Chatterjee, 2000 ; Demirevska- Kepova *et al.*, 2004). La diminution des contenus en Chl dans les feuilles se traduit par l'apparition de taches brunes (Shainberg *et al.*, 2001) et elle peut s'accompagner d'une diminution des contenus en caroténoïdes (Lou *et al.*, 2004). Cependant des augmentations de Chl dans les feuilles sont aussi observées (Cook *et al.*, 1997) et seraient dues à une concentration des métabolites cellulaires suite à l'inhibition de l'expansion cellulaire par le Cu, c'est l'effet « bronzing » (Bessoule et Mench 2002).

Le Cu libre en excès dans la cellule peut inactiver les enzymes en se liant avec leurs groupements sulfhydriles -SH (Uribe et Starck, 1982). Le Cu inhibe d'autres mécanismes comme la respiration cellulaire et la chaîne de transport des électrons, le cycle de Calvin, et

l'assimilation azotée par diminution de l'activité du glutamate et du glutamate synthase impliquée dans l'assimilation de  $\text{NH}_4^+$  (Demirevska-Kepova *et al.*, 2004).

#### **e - Production d'espèces réactives dérivées de l'oxygène (ERO)**

L'exposition à certaines pollutions environnementales provoque chez les organismes photosynthétiques une surproduction d'espèces réactives dérivées de l'oxygène (ERO), à l'origine d'un stress oxydatif pouvant entraîner leur mort. Bien que certains métaux lourds soient essentiels au développement des plantes (cuivre, nickel, zinc), leur présence peut devenir toxique lorsqu'ils atteignent des concentrations trop importantes. Or, de nombreux travaux de recherche ont révélé une production élevée d'ERO chez les plantes exposées aux métaux lourds, tels que le zinc et le cadmium (Chao *et al.*, 2008), le fer (Caro and Puntarulo, 1996), l'uranium (Vanhoudt *et al.*, 2008)

Lorsque la quantité d'ERO générée dépasse les capacités antioxydantes de l'organisme, la toxicité des ERO s'exprime par de nombreux aspects, et en particulier par la perturbation de nombreux processus physiologiques comme la photosynthèse (Sies, 1997; Smirnoff, 1998; Dat *et al.*, 2000; Inze and Montagu, 2001; Arora *et al.*, 2002; Langebartels *et al.*, 2002). Cette toxicité s'explique par la réactivité des ERO, en particulier celle de l'.OH, envers les macromolécules biologiques.

#### **f - Altérations de la structure des protéines**

Les protéines sont particulièrement sensibles à l'action des ERO. Plusieurs mécanismes directs ou indirects de modifications sont connus (Stadtman et Levine, 2000; Favier, 2003). Les protéines les plus touchées sont celles comportant un groupement sulphhydryle (-SH), comme c'est le cas pour de nombreuses enzymes et protéines de transport (Stadtman et Levine, 2000). Le peroxyde d'hydrogène, mais surtout le radical hydroxyle sont capables d'oxyder ces groupements, conduisant à l'inactivation de certaines enzymes. En particulier, la présence de radicaux hydroxyles est à l'origine de dégradations irréversibles des protéines, par la formation de groupements carbonyles sur la chaîne latérale de certains acides aminés. Ainsi, l'histidine, l'arginine, la lysine ou encore la proline sont des cibles privilégiées de ce processus d'altération oxydative (Stadtman et Levine, 2000; Wong *et al.*, 2008). De nombreux autres acides aminés sont également susceptibles d'être oxydés par les ERO.

## 2.7. Les mécanismes de tolérance chez les végétaux

Les plantes disposent de nombreux mécanismes connus et possibles de tolérance aux métaux, cependant les mécanismes impliqués en fonction du métal sont différents. Dans le cas du Cu les mécanismes sont variables d'une espèce à l'autre et le rôle des phytochélatines (PC), les métallothionéines (MT) dans la tolérance est encore mal défini.

Plusieurs stratégies sont possibles :

- une diminution du prélèvement des contaminants ou de l'entrée dans les cellules,
- une accumulation dans les racines, ce sont les « exclues », ou dans les parties aériennes, ce sont les accumulatrices (Baker *et al.*, 2000, Lou *et al.*, 2004).

### 2.7.1. La chélation de Cuivre

Parmi les processus de tolérance envers Cu, la chélation de Cu dans le milieu externe via l'exsudation racinaire de ligands organiques susceptibles de complexer les ions  $\text{Cu}^{2+}$  permet de diminuer sa biodisponibilité, sous réserve que les complexes formés ne puissent être réabsorbés par la racine. D'ailleurs, la sécrétion des ligands organiques a été observée en réponse à de fortes teneurs externes en Cu et Al chez diverses espèces, dont le blé, ce qui diminuerait leur biodisponibilité (Rengel, 1996 ; Murphy *et al.*, 1999 ; Ma *et al.*, 2001 ; Nian *et al.*, 2002 ; Qin *et al.*, 2007). Pour limiter les entrées dans la cellule, les plantes peuvent fixer le Cu au niveau de la paroi cellulaire, comme par exemple dans les racines d'*Elsholtzia haichowensis* où le Cu est lié aux pectines et glycoprotéines de la paroi (Qian *et al.*, 2005).

### 2.7.2. La séquestration de cuivre

Par ailleurs, la séquestration de Cu dans les vacuoles et/ou sa chélation avec des ligands dans le cytoplasme (métallothionéines, phytochélatines, acides organiques et aminés) sont d'autres mécanismes de tolérance qui détoxifient en tamponnant les concentrations de Cu cytosoliques (Marschner, 1995; Clemens, 2001; Yruela, 2005), par exemple chez *Datura stramonium* (Boojar & Goodarzi 2007), chez *Elsholtzia splendens* (Ni *et al.*, 2005) ou chez *Armeria maritima* (Neumann *et al.*, 1995).

L'exclusion de Cu des parties aériennes par accumulation dans les racines, principalement par adsorption sur les parois cellulaires, est également un autre mécanisme de tolérance à la toxicité de Cu. Néanmoins, une telle accumulation racinaire de Cu, via l'immobilisation dans l'apoplasme, peut entraîner une rhizotoxicité. (Marschner, 1995)

### 3. Le modèle biologique *Vicia faba* L.

#### 3.1. La plante

##### 3.1.1. 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. Sa culture est très ancienne et pratiquée dans le monde entier.

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 qui nous intéresse, 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 fève dans certaines régions. Comme son nom l'indique elle est également destinée à l'alimentation du bétail.

##### 3.1.2. Aspect et particularités

La Fig. 04 représente l'aspect des feuilles, fleurs et fruits de *Vicia faba* L. Il s'agit d'une plante robuste, grimpante, qui peut atteindre plus d'un mètre. Ses feuilles, composées de 2 à 7 folioles, sont alternes sur la tige de section carrée. Ses fleurs, disposées en racème (grappe), sont blanches 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, caractéristiques de la famille des Fabacées.

Comme chez tous les représentants de cette famille, connus sous le nom de légumineuses, les racines de la plante possèdent des nodules à l'intérieur desquelles des cellules géantes servent d'abri à une bactérie symbiotique, appartenant à l'espèce *Rhizobium leguminosarum*. Cette bactérie est capable de capter le diazote atmosphérique et de le fixer dans le sol sous forme d'ions utilisables par les plantes (Foltete, 2010).



**Fig. 04:** Les différentes parties de la fève *Vicia faba* L. (Thomé, 1885).

### 3.1.3. 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 et 7,5, 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).

Il s'agit d'une plante annuelle. Elle peut se semer sous des climats très cléments à l'entrée de l'hiver, en octobre ou novembre pour donner des fruits dès la mi-avril, dès février dans le sud de la France, mais sous des climats moins favorables il faudra attendre le mois de mars pour les semis et le mois de juin pour la récolte (Foltete, 2010).

### 3.1.4. Cariotype et cycle cellulaire

Le caryotype de *Vicia faba* L. est très simple. Toutes 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), ce qui est très élevé par rapport à beaucoup d'autres plantes. En comparaison, le pois *Pisum sativum* n'en possède que 9,8 pg (Grant et Owens, 2001). Le cycle cellulaire normal de la plante. Il dure environ 19,3h au total (Evans et Scott, 1963).

### 3.2. Intérêt en écotoxicologie

Robuste, facile à se procurer et à faire germer, la fève 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. De plus, cette plante, utilisée aussi en agriculture, peut pousser sur des sols de différentes natures, d'où son intérêt dans les expériences de terrain (Foltete, 2010).

La fève est très sensible à la pollution du sol, ce qui en fait un modèle végétal très utilisé en écotoxicologie dans un grand nombre d'études. La simplicité de son caryotype l'a faite élire pour un grand nombre d'études de mutagenèse 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 :

# Matériels et méthodes

## 1. Introduction

Les différents essais menés pour la réalisation du travail présenté consistent en l'estimation des effets procurés par le cuivre sur le comportement de la fève, à différents stades de développement. Pour une meilleure valorisation de ces effets, l'introduction d'une variabilité génotypique s'impose, en effet deux génotypes d'origine et de comportement controversés sont conduits.

L'étude comporte deux principaux essais, un premier essai mené au laboratoire a permis d'estimer l'effet du cuivre sur le processus de germination, essentiellement sa procédure biochimique. L'évaluation de l'activité des  $\alpha$ -amylases impliqués dans la remobilisation des réserves glucidiques, sous le stress a été étudiée.

Un second essai mené en conditions contrôlées sous serre, englobe l'évaluation des différentes réactions de la variabilité testée à l'égard de la contamination par le cuivre. Ces réactions s'identifient par des modifications comportementales dans l'élaboration des différents caractères, morphologiques, physiologiques et anatomiques extériorisés le long de cycle de développement de la plante.

## 2. Matériels végétal utilisé

Le matériel végétal utilisé se compose de deux génotypes de la fève (*Vicia faba* L) d'origine et de comportement, différents. Une variété locale, sidi Aïch, fournie par l'ITGC de Sidi Bel Abbès, et un autre génotype d'origine Espagnole, super Aguadulce.

## 3. Essai 1 : Effet du cuivre sur le processus de la germination des graines

Au cours de cet essai, les effets du stress avec le cuivre sur l'activité des  $\alpha$ -amylases impliquées dans la dégradation de l'amidon, la faculté germinative ainsi que le taux de croissance de la radicule sont estimés.

### 3.1. Conduite de l'essai

#### a-Taux d'imbibition

Cet essai est basé sur l'évolution de la teneur d'imbibition des graines mises en germination en fonction des différents milieux.

Les graines sont désinfectées à l'eau javellisée (4%) pendant 5 min, puis rincées abondamment à l'eau distillée. Les graines sont disposées dans des boîtes de pétri de 9cm de

diamètre, contenant deux couches de papier filtre et réparties selon trois traitements, différents par la composition du milieu de germination. Dans un premier traitement, le milieu est constitué d'eau distillée. Pour les deux autres, ce milieu est substitué par une solution de cuivre ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) à deux concentrations, 100 et 200 ppm. La température de germination est fixée à 25°C.

Afin de suivre l'imbibition, les graines issus des différents traitements sont essuyées délicatement et pesées chaque 6 heures et ce le long des 48 heures de mise en germination.

### **b- extraction et dosage des activités des $\alpha$ -amylases**

Au cours de la germination de la graine, l'activité des amylases est indispensable pour la remobilisation des ressources glucidiques, mises en réserve sous forme d'amidon. Les amylases catalysent l'hydrolyse de l'amidon suivant une activité progressive et libèrent des molécules de courtes chaînes osidiques pour aboutir au maltose et peu de glucose.

#### **b-1 Extraction du complexe enzymatique**

L'extraction du complexe enzymatique est produite après 48 heures de mise en germination des graines.

Le substrat de l'extraction est constitué de 0,5 g de graines issus des différents milieux de germination. L'ensemble est broyé dans 10 ml de solution tampon acétate à pH 4.8 et filtré. Le filtrat est recueilli dans un tube d'Eppendorf de 1.5 ml, puis centrifugé pendant 10mn à une vitesse de 8000 tours/mn à une température de 15°C.

#### **b-2 Dosage de l'activité des alphas amylases**

Dans chaque tube de l'extrait enzymatique (1ml), on ajoute 0.25ml de solution d'amidon à 1% (dilution dans la solution tampon acétate pH 4.8), passer au vortex et laisser incuber au bain-marie à 30°C pendant 25mn. Ajouter 0.5ml du réactif contenant 14 ml de NaOH (2N), 0,2g d'acide dinitrosalicylique (DNS) + 6g de tartrate (K/Na), 20ml d'eau distillée, l'acide dinitrosalicylique permettant l'arrêt de l'hydrolyse et le dosage simultané du maltose formé. Mettre l'ensemble dans un bain-marie bouillant pendant 10mn, refroidir et doser au spectrophotomètre à  $\lambda=530\text{nm}$ .

### **c- La longueur de la radicule**

Au bout des 96 heures de mise en germination des grains, et à l'apparition de la radicule, une cinétique de sa croissance est établie. Ainsi la longueur de la radicule est mesurée chaque 24 heures et se pendant 05 jour.

## **4. Essai 2 : Effet de cuivre sur les paramètres morphologiques, physiologiques et anatomiques**

### **4.1. Conduite de l'essai**

L'expérimentation est conduite dans une serre semi-automatique au niveau de la faculté des Sciences de la nature et de la vie de l'université IBN KHALDOUN de Tiaret, les températures, nocturne et diurne sont maintenues respectivement aux alentours de 12 et 25°C et l'humidité relative à 70%.

Les graines de *Vicia faba*, des deux génotypes sont stérilisées dans une solution d'hypochlorite de sodium à 4%, rincées à l'eau distillée et mises en germination. Après germination, les graines sont repiquées dans des cylindres en PVC (90cm de longueur, 11cm de diamètre) et remplis d'un substrat reconstitué de sable, sol et terreau à des proportions 8 : 1 : 3 d'une faible capacité de rétention, 24,54%.

Le sable est tamisé puis lavé à l'eau de robinet ensuite séché à l'air libre. Le sol a été prélevé à une profondeur de 30cm afin d'éviter toute contamination possible en cuivre d'origine atmosphérique, séché à l'air libre, tamisé (pour éliminé la fraction supérieure à 2 mm) et homogénéisé. Un échantillon est analysé pour déterminer les propriétés du sol (Tab.01). Les cylindres sont répartis selon trois lots. Un premier lot sert de témoin (D0) et deux autres subissent un stress métallique, à deux intensités, 100ppm (D1) et 200ppm (D2). Chaque traitement se compose de 20 cylindres, représentant dix répétitions pour chacun des deux génotypes (Fig.08). L'ensemble des cylindres sont maintenus à capacité au champ par apport quotidien d'une quantité d'eau estimée par pesée des cylindres, afin de les ramener à la capacité de rétention maximale. L'eau d'irrigation est substitué chaque trois jours par une solution nutritive commerciale de type ACTIVEG.

**Tableau n°1** : Propriétés du substrat

<b>Granulométrie (Pipette De Robinson)</b>	
- $\varnothing < 2\mu\text{m}$	5.26
- $2\mu\text{m} < \varnothing < 20\mu\text{m}$	7.89
- $20\mu\text{m} < \varnothing < 50\mu\text{m}$	44.18
- $50\mu\text{m} < \varnothing < 200\mu\text{m}$	17.52
- $200\mu\text{m} < \varnothing < 2\text{mm}$	25.15
<b>pH (AFNOR X31-103 Sol/Eau : 2/5)</b>	7.67
<b>Conductivité Electrique (Ms/Cm) (Iso : 11265 Sol/Eau : 1/10)</b>	0.416
<b>Matière Organique (%) (Méthode De Walkley)</b>	0.13
<b>Azote Total (%) (Kjeldahl Iso : 11261)</b>	0.18
<b>Phosphore Assimilable (ppm) Joret Hébert AFNOR : X31-161</b>	N.D
<b>Calcaire Total (%) Calcimètre De Bernard Iso : 10693</b>	4.41
<b>Calcaire Actif (%)</b>	0.75
<b>Cec En Meq/100g De Sol</b>	10
<b>U.S.D.A Texture :</b>	Silt Loam (limon silteux)

#### 4.1.1. Application du stress métallique

Les solutions du sulfate de cuivre  $\text{Cu SO}_4, 5\text{H}_2\text{O}$  sont préparées et appliquées en deux périodes durant l'expérimentation, 25 et 80 jours après le semis. Pendant chaque application deux doses du  $\text{Cu SO}_4, 5\text{H}_2\text{O}$  sont retenus, 100 et 200 mg/kg du sol. Ces doses équivalent respectivement à 500 mg et 1g de  $\text{Cu SO}_4, 5\text{H}_2\text{O}$ , appliquées dans chaque cylindre suivant le traitement concerné. L'ensemble des mesures sont effectuées durant ces deux périodes, équivalentes à 80 et 90 jours après le semis.

**Fig. 05:** Dispositif expérimental

## 4.2. Les paramètres mesurés

### 4.2.1. La teneur relative en eau

La teneur relative en eau a été estimée 30 jours après l'application du premier stress et 10 jours après l'application du deuxième stress. Le limbe des feuilles est excisé à sa base et immédiatement pesé (Pi). La partie sectionnée est trempée dans l'eau distillée et placée à l'obscurité, à une température de 4°C pendant 12 heures. Les feuilles sont à nouveau repesées ce qui donne le poids en pleine turgescence (Ppt), enfin la matière sèche est obtenue après l'étuvage à 70°C pendant 48 heures. La teneur relative en eau est déterminée par la relation suivante :

$$RWC = \frac{Pi - Ps}{Ppt - Ps} \times 100$$

### 4.2.2. Dosage des pigments chlorophylliens

Les pigments sont extraits des feuilles après incubation dans l'acétone 80% durant 24H à 4°C dans une chambre noire afin d'éviter l'excitation des chlorophylles. Les concentrations des chlorophylles et les caroténoïdes sont déterminées par spectrométrie selon la procédure citée par Lichtenthaler (1987).

Les équations suivantes sont utilisées pour calculer les concentrations des chlorophylles et les caroténoïdes dans les feuilles (en mg/g) (Wang et al., 2010):

- Chlr.a =  $12,25 \times A663 - 2,79 \times A645$
- Chlr.b =  $21,50 \times A645 - 5,10 \times A663$
- Chlr.a+b =  $7,50 \times A663 + 18,71 \times A645$
- CRTN =  $(1000 \times A470 - 1,82 \times \text{Chlr.A} - 85,02 \times \text{Chlr.B})/198$ .

### 4.2.3. Dosage du proline

La méthode suivie est celle de Troll et Lindsley (1955), simplifiée et mise au point par Dreier et Goring (1974). Elle consiste à prendre 100 mg de matériel végétal (1/3 médian du limbe) puis ajouter 2ml de méthanol à 95 % le tout est chauffé à 95°C dans un bain marie pendant 10 mn. Après refroidissement on prélève 1 ml d'extrait auquel il faut ajouter :

1 ml d'eau distillée et 1 ml de mélange contenant (40 ml d'eau distillée, 60 ml d'acide acétique  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , 500 mg de ninhydrine  $\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_4$ )

Le mélange est chauffé à 95 °C dans un bain marie durant 25 à 30 mn, la solution vire au rouge, après refroidissement pendant 5 mn, 3 ml de toluène sont rajoutés à la solution qui est agitée par le vortex, puis laisser le tout à l'obscurité pendant 30 mn

Deux phases se séparent (une phase supérieure, et une phase inférieure). Après avoir éliminé la phase inférieure, on détermine la densité optique à (528 nm). Les valeurs obtenues sont converties en teneur de proline (mg/g MF) à partir de courbe d'étalonnage.

#### 4.2.4. Dosage des sucres solubles

Les sucres simples (glucose, fructose, et saccharose) sont extraits par un solvant capable de les solubiliser et de bloquer les activités enzymatiques susceptibles de les dégrader. Ils sont dosés par la méthode de Shields et Burnett (1960).

Le principe de la réaction est basé sur la condensation des produits de dégradation des oses neutres par l'acide sulfurique, ce dernier, très concentré transforme à chaud les oses en dérivés du furfural qui donnent une coloration bleu vert avec l'anthrone, dosé par colorimétrie à 585 nm.

Le matériel végétal prélevé, 100 mg, sur le tiers médian de la feuille est laissé 24 h dans 5,25 ml d'éthanol à 80%. Un volume de 2 ml est prélevé de cet extrait préalablement dilué 10 fois avec de l'éthanol 80% et additionné de 4 ml de réactif composé de 2 g d'anthrone pur additionné à 1 litre d'acide sulfurique pur sont ajoutés ; le réactif est préparé 4 heures à l'avance. Les tubes sont maintenus dans la glace fondante. Après agitation les tubes sont placés dans un bain - marie à 92°C pendant 8 mn, ensuite le tout est refroidi pendant 30 mn à l'obscurité. L'absorbance est lue au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 585 nm et la concentration est exprimée en  $\text{mg.g}^{-1}$  de MF.

#### 4.2.5. Taux de protéines totales des graines

La détermination de protéines brutes est réalisée après détermination de l'azote total par la méthode Kjeldhal (1883) selon la formule suivante :

Protéines brutes (%) = N % x 6,25.

Dans le procédé Kjeldhal la matière organique de l'échantillon est minéralisée (attaquée) par l'acide sulfurique concentré, à chaud (oxydation de  $H_2SO_4$ ). Le carbone et l'hydrogène se dégagent à l'état de vapeur ( $CO_2$  et  $H_2O$ ). L'azote transformé en ammoniac est fixé par l'acide sulfurique à l'état de sulfate d'ammonium (phase de digestion). L'ion  $NH_4^+$  est ensuite déplacé par l'hydroxyde de sodium (NaOH) et entraîné à la vapeur d'eau puis fixé par l'acide borique à l'état de borate, lui-même dosé par  $H_2SO_4$  (Mathieu et *al.*, 2003).

Cette méthode comporte les étapes suivantes :

- Minéralisation.
- Distillation.
- Filtration.

#### 4.2.6. Le potentiel osmotique

Ce paramètre est mesuré grâce à un micro-osmomètre (VAPRO) (Fig.6) dont le principe est la détermination du point d'évaporation des solutions aqueuses. Un volume de  $10\mu l$  de jus extrait des feuilles a servi à ces mesures.



**Fig. 6 :** micro-osmomètre (VAPRO)

### **4.3. Paramètres morphologiques**

L'ensemble des paramètres morphologiques sont estimés durant les deux périodes de l'application du stress, 80 et 90 jours après la mise en culture.

#### **4.3.1. Paramètres morphologiques aériens**

Les mesures ont porté sur le nombre d'étages foliaires et la longueur de la tige, élaborés avant et après l'application des deux intensités du stress. La surface foliaire déterminée sur leur scan et traitement par image J est évaluée après 80 jours de l'application de stress, en fin le nombre de gousses par plante issues des différents traitements est déterminé.

#### **4.3.2. Paramètres morphologiques sous terrain**

Les cylindres sont vidés de leur contenu, le système racinaire est récupéré et soigneusement lavé. La longueur (cm) de l'axe racinaire, le volume racinaire (cm<sup>3</sup>) obtenus par immersion dans une éprouvette gradué, ainsi que la matière sèche (80°C, 48 heures), sont déterminés.

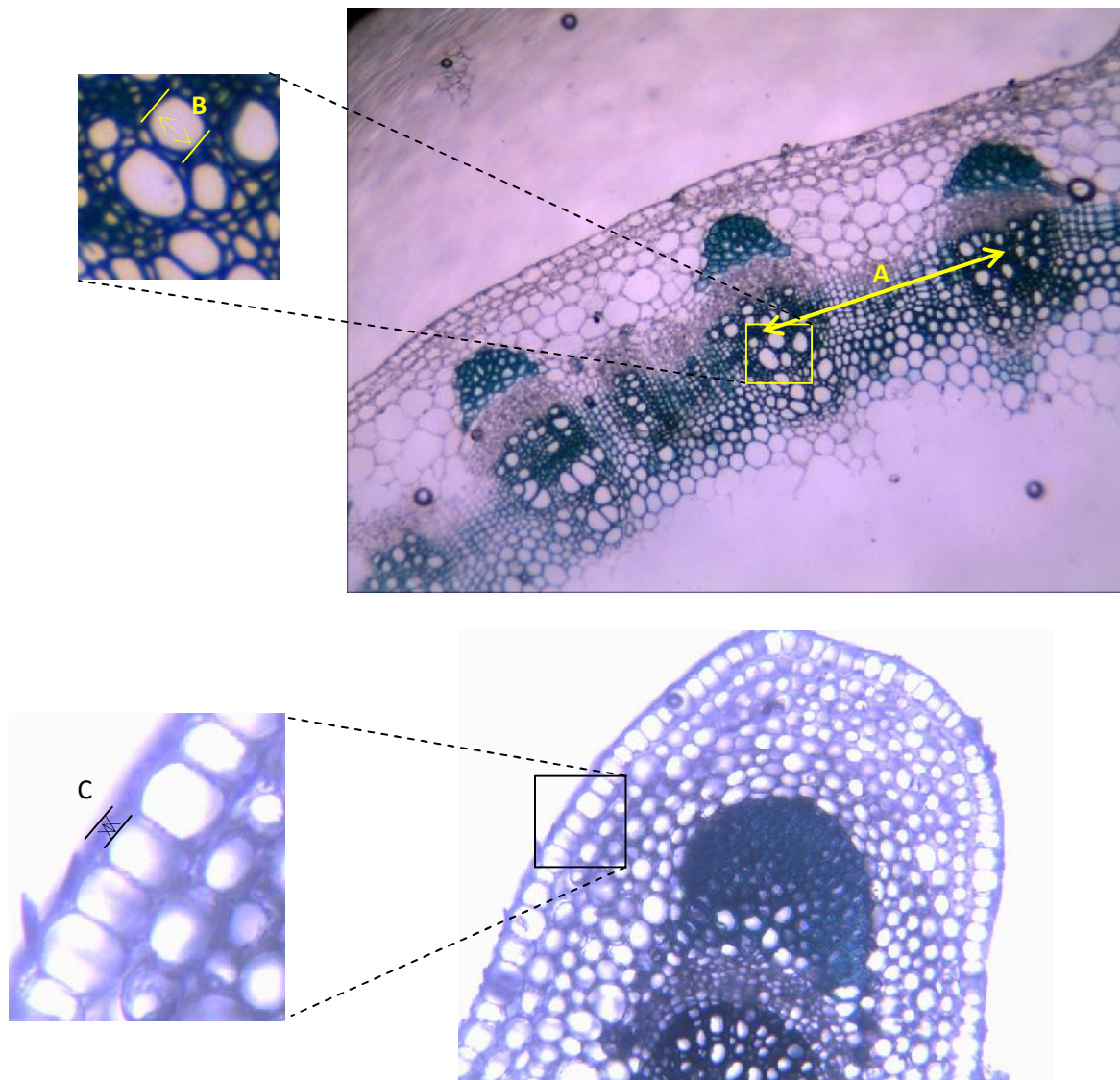
La biomasse sèche des parties aériennes et racinaires est déterminée après le passage à l'étuve pendant 48 heures à 80°C à la fin de l'expérimentation.

### **4.4. Les paramètres anatomiques**

L'étude anatomique est réalisée sur les échantillons de la tige. Une partie des entrenœuds (1cm) est prélevée et fixée dans un fixateur composé d'éthanol et d'acide acétique à des proportions respectivement 17:3, durant 24 heures. Les échantillons sont ensuite lavés avec de l'eau pendant un temps égal à la durée de fixation, et enfin déshydraté par passage dans des concentrations croissantes d'éthanol (50%, 70%). Les échantillons sont conservés dans l'éthanol à 70%.

Des coupes à main levée sont pratiquées sous un stéréomicroscope. Les coupes sont récupérées et colorées par un double colorant (carmin aluné et vert d'iode) et observé par un microscope vidéo doté d'un micromètre.

Les mesures ont porté sur le nombre de faisceaux cribro-vasculaires, la distance entre les faisceaux ( $\mu\text{m}$ ), le diamètre des vaisseaux ligneux et l'épaisseur de la paroi externe des cellules épidermiques ( $\mu\text{m}$ ) (Fig.07).



**Fig. 07:** Coupe anatomique sur la tige de la fève avec les paramètres anatomiques étudiés. (A : distance entre les faisceaux cribro-vasculaires, B : diamètre du méta-xylème, C : épaisseur de la paroi externe des cellules épidermiques), en haut une coupe réalisée avec le grossissement Gx4, en bas une coupe réalisée avec grossissement Gx10.

### 5. Analyse statistique

L'ensemble des données obtenus sont étudié par stat box version 6.40, une analyse de variance et comparaison de moyenne, sont établis.

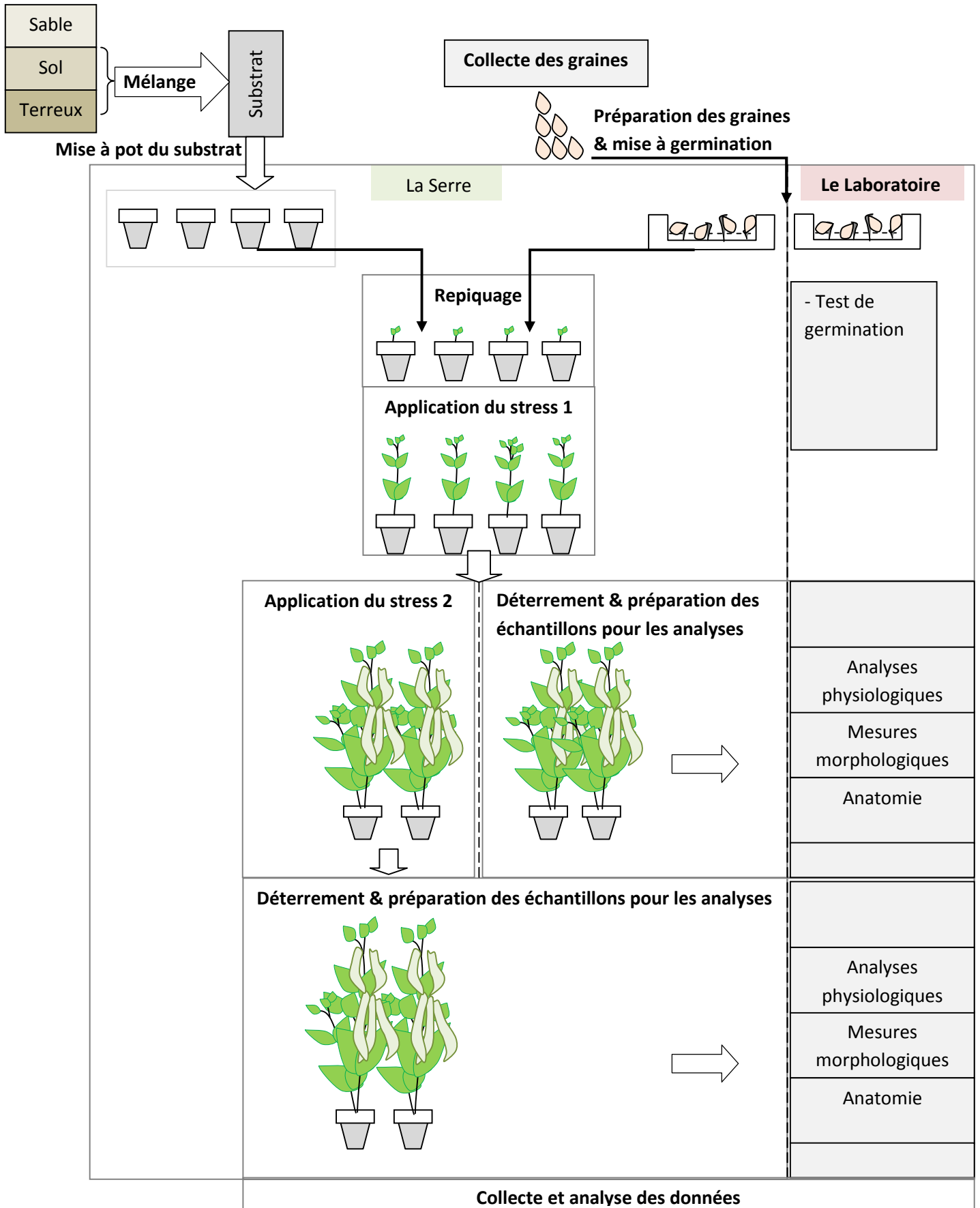


Fig. 08 : Conduite de l'expérimentation et application du stress métallique.

# Chapitre III : Résultats et Interprétations

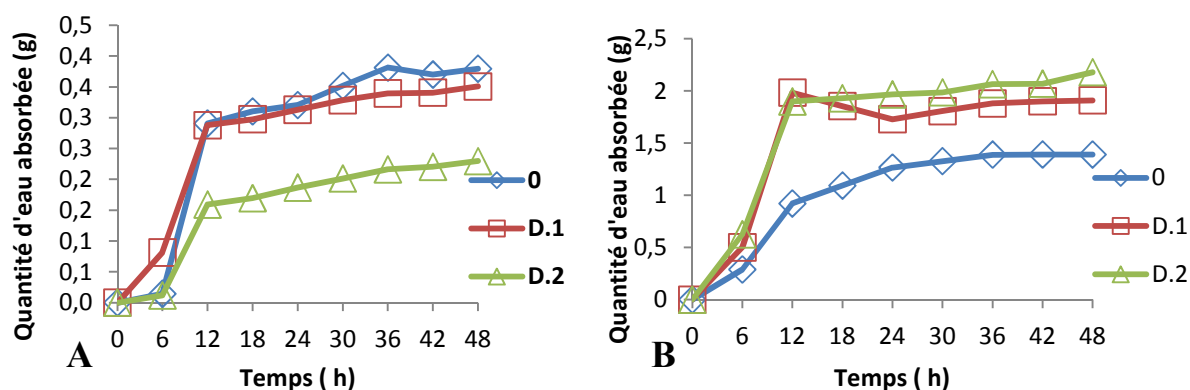
## 1. Effet du cuivre sur le processus de la germination des graines

### 1.1. Test d'imbibition

Les résultats obtenus de l'estimation du taux d'imbibition, montrent qu'une divergence comportementale très prononcée à travers les deux génotypes testés. Le milieu de germination provoque un effet marquant sur ce processus d'imbibition des graines (Fig.09). Une stabilisation de prise d'eau par les graines, est constatée au bout de 12 heures de mise en germination, et ce dans tous les milieux et chez les deux génotypes. Néanmoins, les comportements des graines à l'égard du cuivre additionnée au milieu, s'avère différents.

Chez le génotype Sidi Aïch, le taux d'imbibition est plus élevé dans le lot témoin, en comparaison à ceux additionnés de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ . La diminution de la prise s'avère relative à la concentration en cet élément additionné au milieu de germination. Au bout de 48 heures de mise en germination, l'abaissement du taux d'imbibition s'évalue à 7,61% et 38,54% respectivement dans les milieux additionnés de 100 et 200ppm. Cependant, au cours de la première période (24 heures), la réduction du taux d'imbibition ne concerne que les graines du traitement D2 et évaluée à 41,87%.

Une situation inverse est constatée chez le génotype super Agudulce. Ainsi l'amendement du milieu de germination en  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  semble être favorable à l'accroissement du taux d'imbibition. Ainsi, les augmentations respectives du taux d'imbibition des graines s'évaluent au bout de 48 heures de germination à 37,41% et 56,11% dans les traitements D1 et D2.



**Fig. 09 :** l'évolution de l'imbibition des graines de la fève (*Vicia faba*) en (g) d'eau en fonction du temps (h) pour les trois traitements (0, 100 et 200 ppm de Cu). A : géotype sidi Aïch, B : géotype Super Aguadulce.

## I.2. L'activité des $\alpha$ -amylases

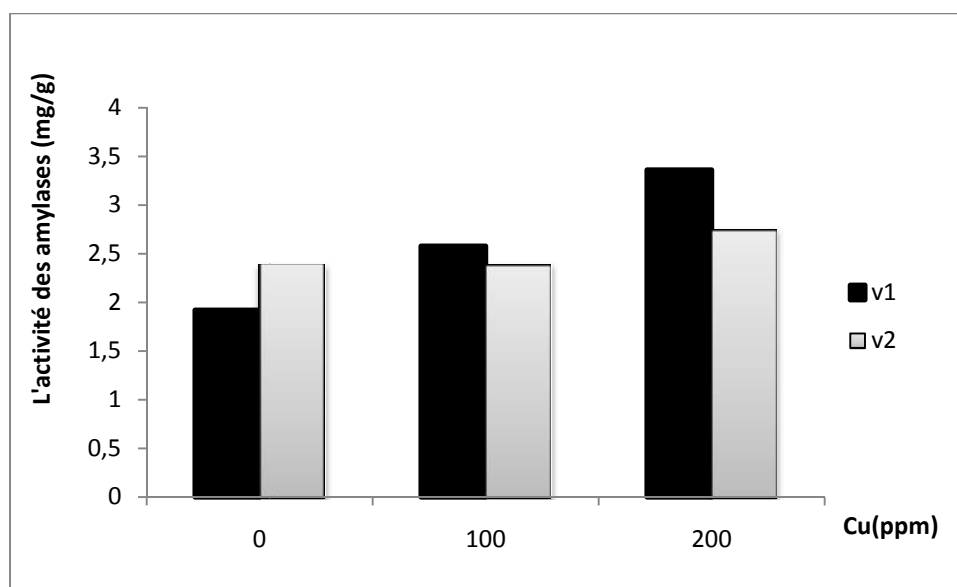
Les résultats moyens obtenus (Tab.02) montrent que l'activité des  $\alpha$ -amylases est significativement influencée par le milieu de germination et la nature de la variabilité conduite. Ainsi, l'application du cuivre à concentrations croissantes dans les milieux de germination, s'accompagne d'une nette augmentation de cette activité, qui s'annonce plus marquée chez le géotype Sidi Aïch que chez Sup Aguadulce.

Les résultats moyens (Tab.02), montrent que chez le géotype Sidi Aïch l'accroissement de l'activité des  $\alpha$ -amylases progresse d'un taux de 34,34% et 75,19% respectivement dans les lots D1 et D2 en comparaison avec celle relevée dans le traitement témoin.

Chez le géotype Sup Aguadulce, on enregistre des valeurs égales chez les graines issues des traitements, témoin et D1. L'application d'une concentration de 200ppm de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  entraîne une nette augmentation de cette activité, évaluée à 2,737 mg/g et représentant un taux d'accroissement de 14.75% par rapport à celle du lot témoin.

**Tableau n°02 :** L'activité des  $\alpha$ -amylases exprimée en quantité de maltose produite (mg/g) au niveau des graines des deux génotypes de *Vicia faba* exposés au cuivre.

Génotype	Dose de Cu (ppm)	L'activité des $\alpha$ -amylases	Evolution %
Sidi Aïch	0	1,919	/
	100	2,578	34,34
	200	3,362	75,19
Sup Aguadulce	0	2,385	/
	100	2,381	-0,16
	200	2,737	14,75



**Fig. 10 :** l'évolution des moyennes de l'activité des  $\alpha$ -amylases pour V1 (sidi Aïch) et V2 (Super Aguadulce) en fonction de la dose du cuivre.

### I.3. La longueur de la racicule

L'étude des résultats obtenus (Tab.03), démontre que l'élaboration de la longueur de la racicule est faiblement influencée par l'application du stress métallique ( $p > 0,05$ ). La variabilité conduite exerce un effet hautement significatif sur les variations d'expression de ce paramètre ( $p < 0,005$ ). L'interaction des deux facteurs d'étude n'impose aucune variation notable ( $p > 0,05$ ). Ceci indique que les deux génotypes testés ont manifesté des comportements identiques en réaction à l'application du cuivre.

**Tableau n°03** : L'analyse de la variance de la longueur de la racicule

Facteurs	Test F	Probabilité (p)
Dose de Cu (F1)	3,707	0,05502 ns
Génotype (F2)	13,239	0,00342***
Interaction (F1*F2)	0,132	0,87717 ns

ns : Non significatif

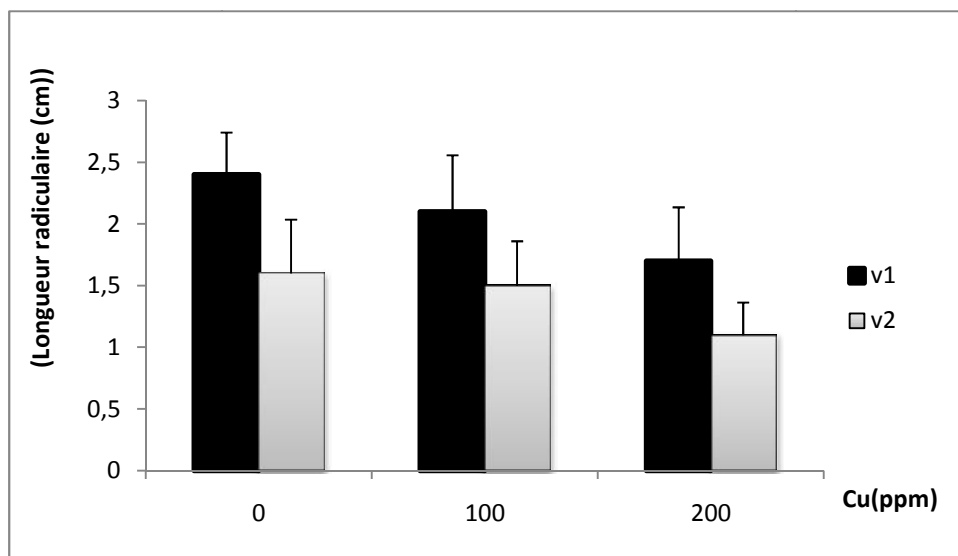
\* : Significatif

\*\* : hautement significatif

Les résultats moyens obtenus (Tab.04) montrent que dans le traitement témoin, la longueur moyenne de la racicule est de 2.4cm chez le génotype sidi Aïch et 1.6cm chez le génotype super Aguadulce. L'application du stress métallique provoque des nettes régressions des grandeurs de ce paramètre. Chez le génotype sidi Aïch, des diminutions de l'ordre de 12,5% et 29,16% sont constatées respectivement dans les traitements conduites à 100 et 200ppm de  $\text{CuSO}_4, 5\text{H}_2\text{O}$ . Alors que chez le génotype super Aguadulce ces réductions sont de l'ordre de 6,25% et 31,25% respectivement chez les graines des lots D1 et D2.

**Tableau n°04** : La longueur de la racicule en cm des deux génotypes de la fève exposés au cuivre.

Génotype	Dose de Cu (ppm)	Long racicule (Cm)	Evolution %
Sidi Aïch <sup>A</sup>	0	2,4 ± 0,34	/
	100	2,1 ± 0,45	-12,5
	200	1,7 ± 0,43	-29,16
Sup Aguadulce <sup>B</sup>	0	1,6 ± 0,43	/
	100	1,5 ± 0,36	-6,25
	200	1,1 ± 0,26	-31,25

**Fig. 11** : l'évolution des moyennes de la longueur des racicules en cm pour V1 (sidi Aïch) et V2 (Super Aguadulce) en fonction de la dose du cuivre (0, 100, 200 ppm).

➤ **Discussion**

La germination est l'ensemble des événements qui commencent par l'étape d'absorption de l'eau par la graine (Bradford, 1995) et se terminent par l'élongation de l'axe embryonnaire et l'émergence de la radicule à travers les structures qui entourent l'embryon (Bewley, 1997).

Nombreuses sont les contraintes environnementales qui peuvent compromettre l'aptitude des graines à germer ; salinité, stress hydrique, humidité et température inadéquates. Cependant, rares sont les travaux qui ont étudié l'impact du stress par les métaux lourds sur la germination. L'inhibition de ce processus semble dépendre, toutefois, du métal et de sa concentration, de la durée d'exposition des graines, de l'espèce végétale, voire même de la variété et de la graine, notamment la nature de ses téguments.

L'état d'imbibition des graines en germination dépend de la qualité d'eau et de la quantité d'eau du milieu. Les résultats obtenus démontrent l'impact du cuivre sur le processus de germination, dépend de sa concentration et du matériel végétal utilisé. Ainsi, les deux génotypes testés répondent de manière controversée au stress métallique appliqué. Chez le génotype Sidi Aïch, l'application du cuivre est accompagnée d'une nette inhibition du taux d'imbibition des graines essentiellement à une concentration de 200ppm. Une situation contraire est observée chez les graines du génotype Sup Aguadulce, où l'application du stress induit un accroissement de prise d'eau. Ces résultats sont comparés par le travail de (Mihoub et al., 2004) sur l'imbibition des graines de petit pois (*Pisum sativum* L.) il indique qu'au cours de la germination, la teneur en eau des graines n'est affectée ni par Cd, ni par Cu.

Les étapes précoces de la croissance de l'axe embryonnaire dépendraient, d'abord, de ses propres réserves puis, ensuite, essentiellement de la mobilisation des réserves cotylédonaire (Basha et Beevers, 1975; Murray, 1979 ; Murray et al., 1979). L'activité des  $\alpha$ -amylases, se trouvent significativement augmentée par l'application du cuivre, principalement à forte dose (200ppm), surtout chez le génotype Sidi Aïch. L'élongation radicaire est totalement réduite chez les deux génotypes expérimentés et surtout au niveau du traitement 200ppm.

Les problèmes de germination peuvent être dus à des modifications du métabolisme de la graine. Lors d'une exposition des graines au Cu, des diminutions du contenu en huile, de la concentration en protéines, en méthionine, en carbohydrates, en lipides et une augmentation des phénols se produisent (Khurana et al., 2006). Le Cu inhibe le transport des nutriments à

partir des cotylédons. Il y a moins d'acides aminés dans les cotylédons à cause d'une inhibition de la protéolyse, réduction du transport des sucres et des carbohydrates vers les cellules en croissance, et inhibition des amylases et phosphatases (Mihoub et *al.*, 2005).

## 2. Deuxième Essai : Effet du cuivre sur les paramètres morphologiques, physiologiques et anatomiques de la fève

### 2.1. Effet du cuivre sur les paramètres physiologiques

#### 2.1.1. Teneur en eau relative (RWC)

##### ➤ Application 1

L'examen des résultats obtenus (Tab.05), montre que la variation des teneurs relatives en eau est faiblement affectée par l'intensité de stress appliqué ( $p > 0,05$ ), ainsi que par la variabilité génotypique ( $p > 0,05$ ) et par l'interaction des deux facteurs d'étude ( $p > 0,05$ ).

**Tableau n°05:** probabilité «  $p$  » de l'analyse de la variance des paramètres physiologiques des deux génotypes étudiés.

Variables	Application 1			Application 2		
	Dose de Cu (F1)	Génotype (F2)	Interaction (F1xF2)	Dose de Cu (F1)	Génotype (F2)	Interaction (F1xF2)
RWC	0.640ns	0.22ns	0.479ns	0.0053**	0.65ns	0.72ns
P. osmotique	0.148ns	0.159ns	0.053ns	0,00965**	0,00192***	0,1179ns
Chlr a	0.0825 ns	0.0023** *	0.00059***	0.0043***	0.169 ns	0.762 ns
Chlr b	0.9621ns	0.632 ns	0.320 ns	0.0442*	0.739 ns	0.508 ns
Chlr a+b	0.004***	0.00001***	0***	0.0072**	0.268 ns	0.692 ns
Caroténoïde	0.0480*	0.0303*	0.382 ns	0.0114*	0.932 ns	0.461 ns
Protéines	0***	0***	0.003***	0***	0***	0.08
Proline	0,299 ns	0,776 ns	0,703 ns	0.0266*	0.176 ns	0.360 ns
Sucres Soluble	0,158 ns	0,447 ns	0,984 ns	0.0046***	0.001***	0.981 ns
PS PR	0.04325ns	0.00961**	0.34222ns	0***	0.49457ns	0.20029ns
PS PA	0.18967ns	0.03554*	0.52237ns	0.00001***	0.00198***	0.01921*

ns Non significatif

\* Significatif

\*\* Hautement significatif

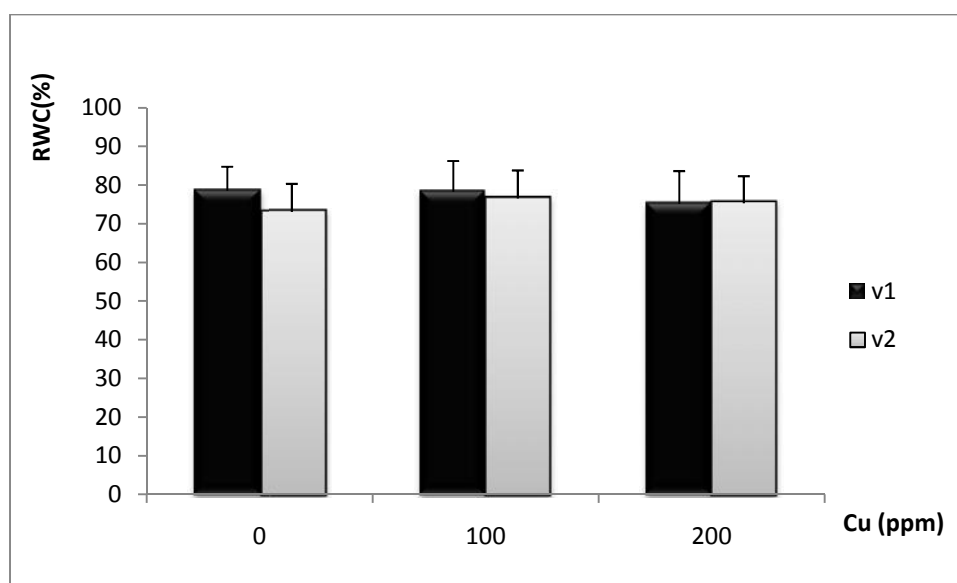
\*\*\* Très hautement significatif

Les résultats moyens obtenus (Tab.06), montrent une évolution controversée à travers les deux génotypes étudiés. Sous le traitement métallique D1, la teneur relative en eau estimée chez le génotype sidi Aïch (78,59 %) est sensiblement identique à celle trouvée au lot témoin (78,28 %). Au niveau du traitement D2, on signale une diminution légère de l'ordre de 4,39%. Chez le génotype Sup Aguadulce, les teneurs relatives en eau sont inférieures à celles enregistrées par le premier génotype (Fig.12). Ainsi, l'évolution de ce paramètre pour ce

génotype est apparue positive par rapport au lot témoin, elle est de l'ordre de 4,67% au niveau du traitement D1 et de l'ordre de 3% au niveau de D2.

**Tableau n°06** : Teneur en eau relative (RWC) dans les feuilles des deux génotypes de la fève exposés au cuivre (Application 1).

Génotype	Dose de Cu (ppm)	RWC (%)	Evolution %
Sidi Aïch	0	78,59 ± 6,21	/
	100	78,28±7,99	-0,39
	200	75,14±8,51	-4,39
Sup Aguadulce	0	73,13 ± 7,22	/
	100	76,55±7,28	4,67
	200	75,33±7,01	3



**Fig. 12:** l'évolution des moyennes de la teneur relative en eau (%) pour V1 (sidi Aïch) et V2 (Super Aguadulce) en fonction de la dose du cuivre (0, 100, 200 ppm).

### Application 2

L'étude des résultats (Tab.05) montre que le stress du cuivre constitue une source de variation de la teneur relative en eau ( $p < 0,01$ ). La variabilité génotypique et l'interaction des deux facteurs d'étude n'exercent aucun effet sur la variation de ce paramètre ( $p > 0,05$ ). L'effet non significatif de l'interaction entre les deux facteurs (dose de cuivre\*génotype) explique que la réponse des deux génotypes testés se fait d'une manière similaire.

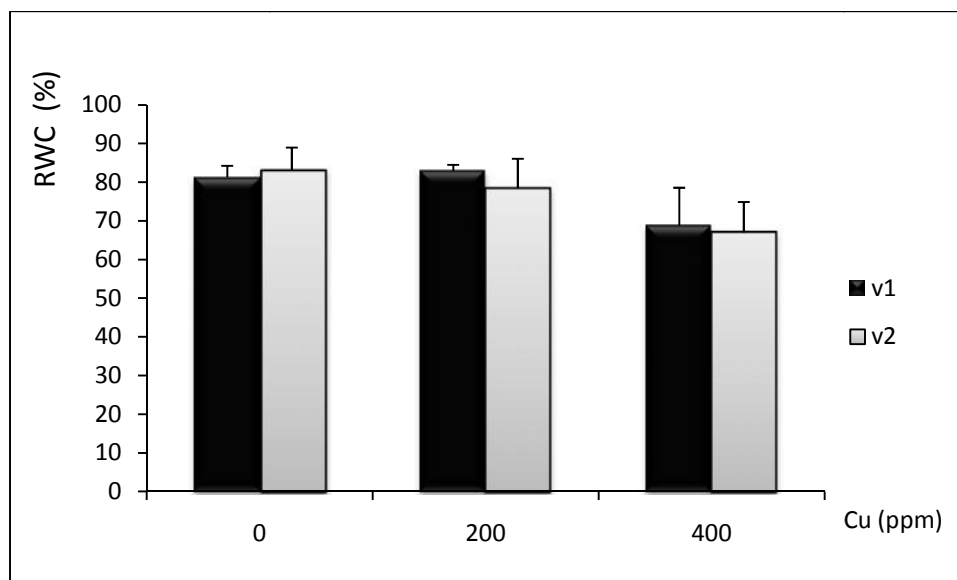
Les résultats moyens (Tab.07) montrent que l'application du cuivre chez le génotype Sidi Aïch, provoque des évolutions inverses entre les deux concentrations D1 et D2. Ainsi au niveau du traitement D1, la teneur relative enregistre une légère augmentation par rapport au

lot témoin, cette augmentation est estimée à 2,08%, alors qu'au niveau du traitement D2, la teneur relative en eau exprime une régression évaluée à 15,40%.

Chez le génotype Sup Aguadulce, la teneur en eau relative diminuée au fur et à mesure que la contrainte métallique s'installe (Fig.13). Ainsi, au niveau du lot témoin, les plants maintiennent une teneur en eau relative estimée à 83,04%. Au niveau des lots D1 et D2, ces teneurs sont évaluées respectivement à 78,41% et à 66,98%, exprimant des régressions de l'ordre de 5,57% et 19,34% par rapport au témoin.

**Tableau n°07** : Teneur en eau relative (RWC) dans les feuilles des deux génotypes de la fève exposés au cuivre (Application 2).

Génotype	Dose de Cu (ppm)	RWC (%)	Evolution %
Sidi Aïch	0 <sup>A</sup>	81,22 ± 3,00	/
	200 <sup>A</sup>	82,91 ± 1,56	2,08
	400 <sup>B</sup>	68,71 ± 9,84	-15,40
Sup Aguadulce	0 <sup>A</sup>	83,04 ± 5,91	/
	200 <sup>A</sup>	78,41 ± 7,68	-5,57
	400 <sup>B</sup>	66,98 ± 7,91	-19,34



**Fig. 13:** l'évolution des moyennes de la teneur relative en eau (%) pour V1 (sidi Aïch) et V2 (Super Aguadulce) en fonction de la dose du cuivre (0, 200, 400 ppm).

### ➤ Discussion

La teneur en eau relative représente un excellent indicateur physiologique, pour estimer l'état d'hydratation des plantes dans les conditions de stress. Les résultats obtenus montrent que l'effet de cuivre, se traduit par des évolutions controversées de la RWC entre les

deux génotypes pendant la première période du traitement. Chez le génotype Sidi Aïch, la teneur relative en eau diminue en fonction de la dose appliquée. Par contre le génotype Super Aguadulce enregistre un accroissement fonctionnel de la dose de cuivre appliquée. Pendant la deuxième période du traitement, ce paramètre est totalement diminué et surtout après le traitement D2 chez les deux génotypes.

Ces résultats sont conformes à ceux indiqués par Martinez et collaborateurs (2011), ils signalent une légère diminution de la teneur relative en eau sous l'effet de cuivre chez *Bituminaria bituminosa*, et une réduction plus marquée sous l'effet de zinc.

La diminution de la teneur relative en eau sous le stress imposé par le cuivre, est attribuée à l'augmentation de la transpiration de la plante (Demirevska-Kepova *et al.*, 2004, Ashan *et al.*, 2007). Les feuilles sont petites, crispées et ont une teinte vert foncé (Bessoule et Mench, 2002) et elles ferment leurs stomates pour limiter les pertes en eau (Chatterjee, 2000).

### 2.1.2. Potentiel osmotiques (P.O)

#### ➤ Application 1

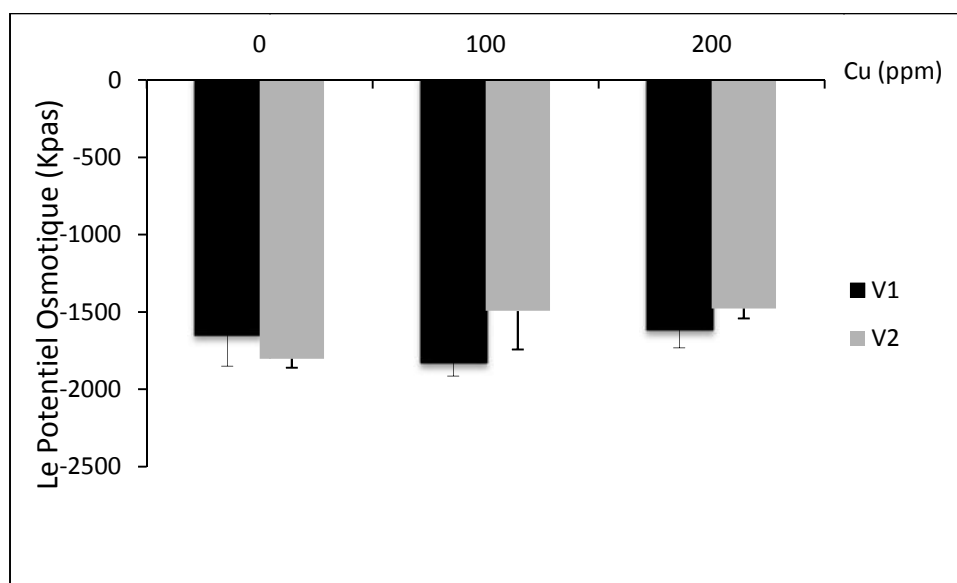
Le traitement des résultats (Tab.05) indique que le cuivre n'influe que faiblement sur les variations du potentiel osmotique ( $p > 0,05$ ). Même observation est à noter pour le facteur génotypique et l'interaction entre les deux facteurs d'étude ( $p > 0,05$ ). Ceci indique que les deux génotypes testés ont manifesté des comportements identiques en réaction à l'application du cuivre.

Les résultats obtenus (Tab. 08), montrent que chez le génotype sidi Aïch, le potentiel osmotique enregistré pour le lot témoin est de -1645,67 Kp. Au niveau du traitement D1, la valeur moyenne est évaluée à -1825 Kp, exprimant une régression de 10,89% par rapport au témoin. Le lot D2 affiche une faible augmentation de 2,02% par rapport au lot témoin.

Chez le génotype Super Aguadulce, la valeur la plus faible du potentiel osmotique est enregistrée au niveau du traitement témoin (-1801,67 Kp), cette valeur a augmenté chez les plantes soumises au stress métallique, où ce paramètre atteint respectivement -1650 Kp et -1694,33 Kp pour les traitements D1 et D2, exprimant des accroissements de l'ordre de 8,41% et 5,95% par rapport au témoin.

**Tableau n°08** : Potentiel osmotiques (Kpas) des feuilles des deux génotypes de la fève exposés au cuivre (Application 1).

Génotype	Dose de Cu (ppm)	P.O (Kpas)	Evolution %
Sidi Aïch	0	-1645,67± 203,39	/
	100	-1825±88,70	-10,89
	200	-1612,33 ±118,09	2,02
Sup Aguadulce	0	-1801,67 ± 56,87	/
	100	-1650 ± 47,31	8,41
	200	-1694,33 ± 13,61	5,95



**Fig. 14:** l'évolution des moyennes du potentiel osmotique (Kp) pour V1 (sidi Aïch) et V2 (Super Aguadulce) en fonction de la dose du cuivre (0, 100, 200 ppm).

### ➤ Application 2

Les résultats obtenus (Tab.05), montrent que l'addition du  $\text{Cu SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  au cours de la deuxième période du traitement a un effet significatif sur la variation du potentiel osmotique ( $p < 0,01$ ). La nature du génotype testé affect également ces variations d'une manière significative ( $p < 0,05$ ). L'interaction entre les deux facteurs étudiés n'influe que faiblement sur la fluctuation de ce paramètre ( $p > 0,05$ ). Ce qui indique que les deux génotypes étudiés se sont comportés d'une manière identique vis-à-vis de l'application de ce stress.

Les résultats moyens (Tab.09) montrent que l'application des doses croissantes en Cu, implique une augmentation du potentiel osmotique (à l'exception du lot D1 pour le premier génotype).

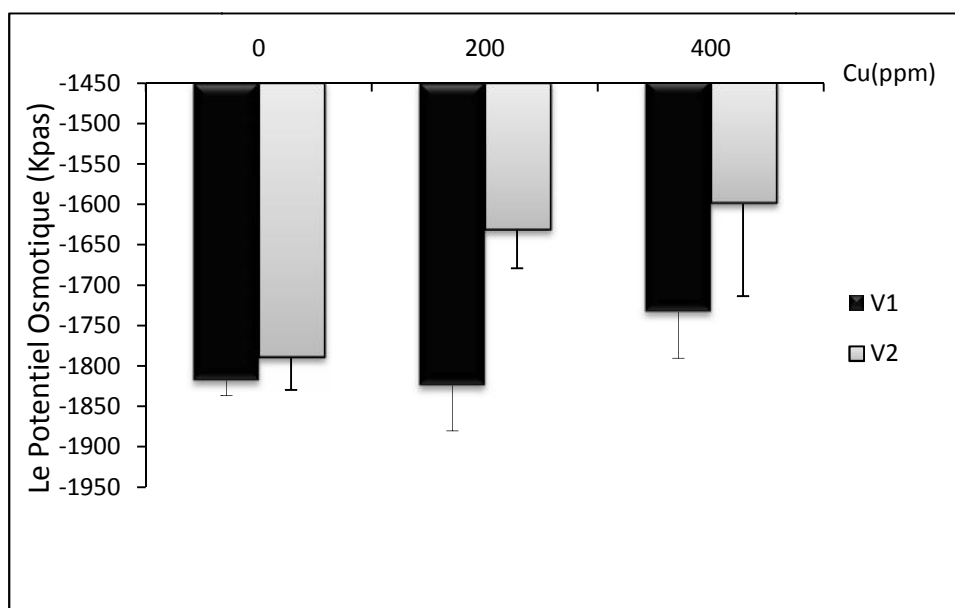
Chez le génotype Sidi Aïch, on constate des faibles variations des niveaux du potentiel osmotique par rapport au lot témoin. Au niveau du traitement D1, cette variation est de l'ordre

de -0,34%. Au niveau du traitement D2, on enregistre une augmentation de 4,64% par rapport au lot témoin.

Chez le génotype Sup Aguadulce, le potentiel osmotique accroît après l'application du cuivre (Fig. 15). Le témoin enregistre une valeur moyenne de -1788.33 Kpas. Dans les lots D1 et D2, les valeurs enregistrées sont évaluées respectivement à -1631 et à -1599,33 Kpas, exprimant ainsi, des progressions de l'ordre de 8,79% et 10,57% par rapport au lot témoin.

**Tableau n°09** : Potentiel osmotiques en Kpas des feuilles des deux génotypes de la fève exposés au cuivre (Application 2).

Génotype	Dose de Cu (ppm)	P.O (Kpas)	Evolution %
Sidi Aïch <sup>B</sup>	0 <sup>B</sup>	-1817.33 ± 18.90	/
	200 <sup>AB</sup>	-1823,66± 56,43	-0,34
	400 <sup>B</sup>	-1733 ± 57,03	4,64
Sup Aguadulce <sup>A</sup>	0 <sup>B</sup>	-1788.33 ± 41.04	/
	200 <sup>AB</sup>	-1631± 47,88	8,79
	400 <sup>B</sup>	-1599,33 ± 113,77	10,57



**Fig. 15:** l'évolution des moyennes du potentiel osmotique (Kp) pour V1 (sidi Aïch) et V2 (Super Aguadulce) en fonction de la dose du cuivre (0, 200, 400 ppm).

### ➤ Discussion

Dans la présente étude, on signale une augmentation du potentiel hydrique dans les conditions du stress à l'exception du niveau du traitement D1 chez le génotype Sidi Aïch. Suite à la première application du cuivre, on constate une légère diminution du potentiel

osmotique. Durant la deuxième application, la même tendance d'évolution a été constatée surtout chez le génotype Sup Aguadulce.

Contrairement à ce qui a été trouvé par Kholodova *et al* (2011), le potentiel osmotique du *Mesembryanthemum crystallinum* est diminué en fonction de la dose du cuivre et du zinc.

De nombreuses études ont mis en évidence une perturbation importante du statut hydrique des plantes traitées aux métaux lourds. Elles ont principalement relevé une diminution de la transpiration, ainsi qu'une diminution de la teneur en eau (Pourrut, 2008 ; Brunet *et al.*, 2009). Pour maintenir la turgescence des cellules, la plante synthétise massivement des osmolytes, et en particulier de la proline (Qureshi *et al.*, 2007 ; Azooz *et al.*, 2011). En plus, les perturbations du statut hydrique conduisant à la fermeture des stomates (Brunet *et al.*, 2008) suite à l'implication de la sécrétion de l'acide abscissique induit par la présence du métal (Parys *et al.*, 1998; Atici *et al.*, 2005). Ceci limite fortement les échanges gazeux avec l'atmosphère, et par conséquent les pertes d'eau par transpiration (Parys *et al.*, 1998; Vassil *et al.*, 1998).

### 2.1.3. Teneur en proline

#### ➤ Application 1

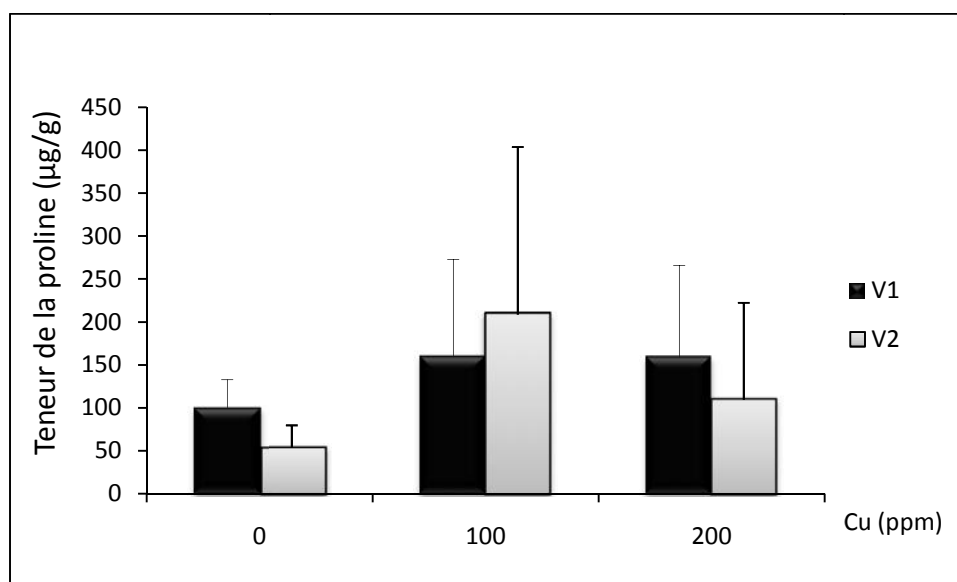
L'étude des résultats obtenus (Tab.05), montre que les niveaux d'accumulation de la proline dépend faiblement de la variation des concentrations du cuivre ( $p > 0,05$ ). La nature du génotype testée n'exerce aucun effet significatif sur cette variation ( $p > 0,05$ ). La même observation a été signalée pour l'interaction des deux facteurs d'étude ( $p > 0,05$ ). Ceci explique les comportements similaires des deux génotypes testés, en réaction au stress métallique appliqué.

Les résultats moyens (Tab.10), montrent que les plantes témoins accumulent une teneur en proline faible, estimée à 100,12  $\mu\text{g/g}$  pour le génotype sidi Aïch et 53,95  $\mu\text{g/g}$  pour le génotype super Aguadulce. L'application du  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  engendre une augmentation de la teneur en proline par rapport au témoin. Chez le génotype sidi Aïch on enregistre des valeurs très avoisinantes chez les plantes soumises au traitement métallique à concentration D1 et à D2 avec des évolutions respectives de l'ordre de 58,94%, 58,32%. Chez le génotype super Aguadulce on remarque une forte augmentation de ce paramètre (Fig.16). Pour le lot D1, la valeur moyenne du taux de la proline est évaluée à 208,76  $\mu\text{g/g}$ . Au niveau du traitement D2,

la valeur moyenne enregistrée est de  $109,38\mu\text{g/g}$ . Ces deux valeurs exprimant des accroissements successives de l'ordre de 286,95% et 102,74% par rapport au lot témoin.

**Tableau n°10** : Teneur en proline en  $\mu\text{g/g}$  dans les feuilles des deux génotypes de la fève exposés au cuivre (Application 1).

Génotype	Dose de Cu (ppm)	Proline ( $\mu\text{g/g}$ )	Evolution %
Sidi Aïch	0	$100,12 \pm 32,95^{\text{ns}}$	/
	100	$159,13 \pm 113,88^{\text{ns}}$	58,94%
	200	$158,51 \pm 107,53^{\text{ns}}$	58,32%
Sup Aguadulce	0	$53,95 \pm 25,92^{\text{ns}}$	/
	100	$208,76 \pm 195,15^{\text{ns}}$	286,95%
	200	$109,38 \pm 113,11^{\text{ns}}$	102,74%



**Fig. 16** : l'évolution de la teneur en proline ( $\mu\text{g/g}$ ) des deux génotypes expérimentés en fonction de la dose du cuivre (0, 100, 200 ppm).

### ➤ Application 2

L'analyse des résultats obtenus (Tab.05), montre que la variation des teneurs en proline est significativement influencée par l'application du cuivre ( $p < 0,05$ ). La variabilité génotypique n'exerce aucun effet significatif sur l'élaboration de cette variation ( $p > 0,05$ ). L'interaction des deux facteurs d'étude n'impose aucune variation notable sur la fluctuation de ce paramètre ( $p > 0,05$ ). Ceci indique que les deux génotypes testés, ont manifesté des comportements similaires en présence de stress métallique.

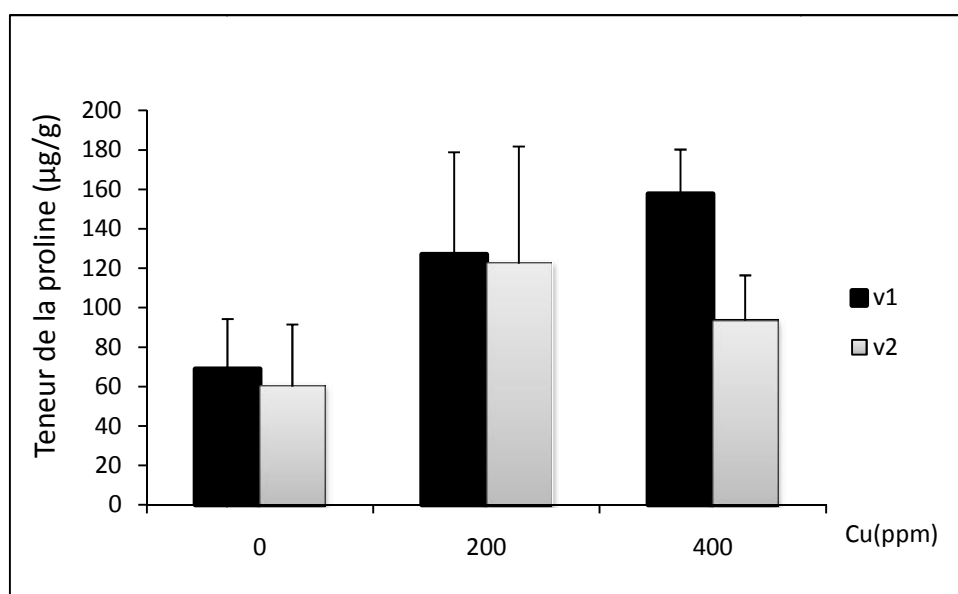
Les résultats moyens obtenus (Tab.11), indiquent que l'application du cuivre induit une augmentation des teneurs en proline chez les deux génotypes. La grandeur de cette augmentation est d'une ampleur différente à travers les deux génotypes testés.

Chez le génotype sidi Aïch, dans les conditions optimales (témoin), la teneur en proline est évaluée à 68,89  $\mu\text{g/g}$ . Au niveau du traitement D1, la teneur moyenne enregistrée est de 127,04  $\mu\text{g/g}$  exprimant un accroissement de l'ordre de 84,40% par rapport au témoin. Le lot D2 enregistre la valeur la plus importante évaluée à 157,65 $\mu\text{g}$  avec une augmentation de l'ordre de 102,71%.

Chez le génotype Sup Aguadulce, les valeurs du taux en proline enregistrées sont plus faibles que celles enregistrées par le premier génotype (Fig.17). La teneur de la proline accumulée par le témoin est estimée à 60  $\mu\text{g/g}$ . Pour les traitements D1 et D2, les teneurs enregistrées sont évaluées respectivement à 122,35  $\mu\text{g/g}$  et à 93,46 exprimant ainsi des évolutions progressives de l'ordre de 103,92% et 55,76%.

**Tableau n°11** : Teneur en proline en  $\mu\text{g/g}$  dans les feuilles des deux génotypes de la fève exposés au cuivre (Application 2).

Génotype	Dose de Cu (ppm)	Proline ( $\mu\text{g/g}$ )	Evolution %
Sidi Aïch <sup>A</sup>	0	68,89 $\pm$ 25,36	/
	200	127,04 $\pm$ 51,88	84,40
	400	157,65 $\pm$ 22,59	102,71
Sup Aguadulce <sup>B</sup>	0	60 $\pm$ 31,49	/
	200	122,35 $\pm$ 59,48	103,92
	400	93,46 $\pm$ 23,01	55,76



**Fig. 17** : l'évolution de la teneur en proline ( $\mu\text{g/g}$ ) des deux génotypes expérimentés en fonction de la dose du cuivre (0, 200, 400 ppm).

### ➤ Discussion

Le dosage de la proline a été réalisé afin d'extérioriser l'un des mécanismes de tolérance adoptés par les plantes face à la contrainte métallique. En effet, la proline est un acide aminé souvent considéré comme un biomarqueur de stress (Dinakar et *al.*, 2008 ; Szabados et Savouré, 2009).

Les résultats obtenus n'indiquent aucun effet significatif du cuivre sur la variation de la teneur en proline pendant la première période de stress. Par contre la deuxième application du cuivre influe significativement sur cette variation. D'une manière générale, les moyens enregistrés montrent une variation de grandeurs de ce paramètre chez les deux génotypes testés. Chez le génotype Sidi Aïch, l'accumulation de proline devient notable à l'échelle du traitement D2 pour la deuxième application (102,71%). A l'opposé, chez le génotype Sup Aguadulce, on note une évolution très importante estimée à 286,% enregistrée au lot D1 (application 1).

Conformément à nos résultats, une augmentation de cet acide aminé a été observée chez le *Canavalia ensiformis* sous l'effet du cuivre avec une durée d'exposition de 11 semaines, et chez *Coffea arabica* pendant 30 semaines. (Andrade et *al.*, 2010).

Une des stratégies mise en œuvre par les plantes pour contrecarrer les effets toxiques des métaux lourds, est constituée par une accumulation d'acides aminés et plus particulièrement de la proline (Sharma et Dietz, 2006). L'accumulation de proline a été observée suite à des conditions de sécheresse (Vasquez-Robinet et *al.*, 2008), de stress salin (Banu et *al.*, 2008) ou de présence de métaux lourds (Dinakar et *al.*, 2008). Cet acide aminé est considéré comme un chélateur de métaux grâce au groupement thiol (-SH) et un protecteur de la structure subcellulaire (Azooz et *al.*, 2011), cela est lié à son rôle protecteur de soluté compatible impliqué dans la stabilisation des membranes et des protéines (Mansour, 1998; Okuma et *al.*, 2000; Okuma et *al.*, 2002; Ashraf et Foolad, 2007). Mais il a aussi été montré que la proline pouvait être impliquée dans la diminution de la quantité de radicaux libres (Hong et *al.*, 2000; Okuma et *al.*, 2000; Okuma et *al.*, 2004), dans le piégeage des espèces réactives de l'oxygène (Chen et Dickman, 2005; Chen et *al.*, 2006), ou encore une fonction dans l'ajustement osmotique chez certaines espèces (Szabados et Savouré, 2009 ; Verbruggen et Hermans, 2009).

Une augmentation de ce soluté compatible a été observée sous l'effet du cadmium chez le tournesol, la silène, l'haricot et le soja (Kastori *et al.*, 1992 ; Schat *et al.*, 1997 ; Zhang *et al.*, 2000 ; Balestrasse *et al.*, 2005) Une telle augmentation de la proline a également été observée sous l'effet d'autres métaux tels que le Mn (Lei *et al.*, 2007), le Zn, Pb, Co, Cu (Alia *et al.*, 1995 ; Schat *et al.*, 1997 ; Sharmila et Pardha Saradhi, 2002 ; Sharma et Dietz, 2006).

#### 2.1.4. Teneur en sucres solubles

##### ➤ Application 1

L'étude des résultats obtenus (Tab.05), montre que la variation des teneurs en sucre soluble est faiblement influencée par l'application du cuivre à différentes concentrations ( $p > 0,05$ ). Le facteur génotypique et l'interaction entre les deux facteurs d'étude n'influent que faiblement sur l'expression de cette caractéristique ( $p > 0,05$ ). Ceci explique que la réponse des deux génotypes testés se fait d'une manière identique face à la contrainte métallique.

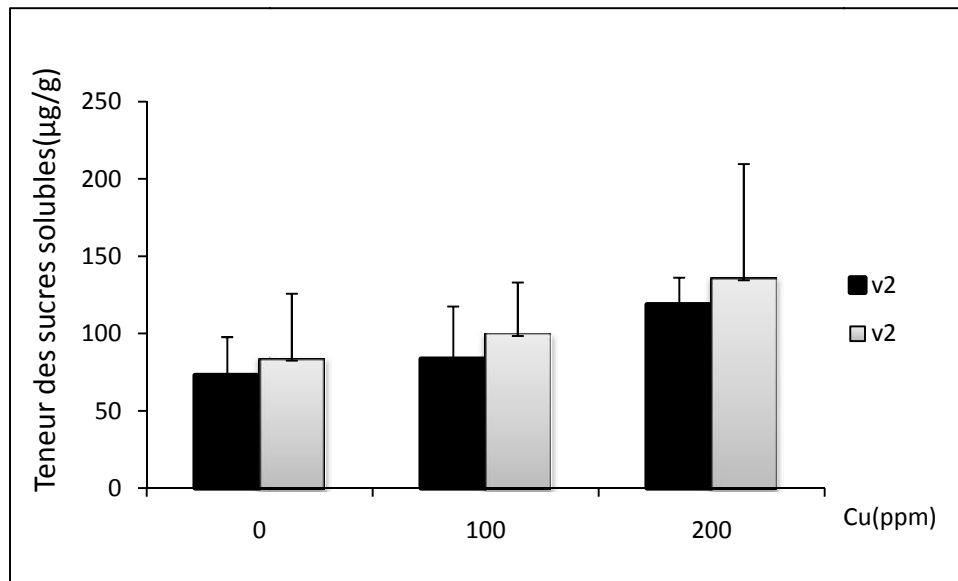
Les résultats moyens (Tab.12), montrent que la teneur en sucres solubles augmente en fonction de l'accroissement des doses du cuivre appliquées.

Dans les conditions optimales (témoin), le génotype Sidi Aïch enregistre une teneur moyenne estimée à 72,86  $\mu\text{g/g}$ . au niveau des traitements D1 et D2, ces teneurs expriment respectivement des évolutions ascendantes de l'ordre de 14,63% et de 62,86%.

Chez le génotype Sup Aguadulce, le lot témoin enregistre une teneur moyenne en sucre soluble estimée à 83,61  $\mu\text{g/g}$ . les plantes issues des traitements D1 et D2 inscrivent respectivement des évolutions progressives de la teneur en sucre, évaluées à 19,15% et 62,08% par rapport au lot témoin.

**Tableau n°12** : Teneur en sucres solubles en  $\mu\text{g/g}$  dans les feuilles des deux génotypes de la fève exposés au cuivre (Application 1).

Génotype	Dose de Cu (ppm)	Sucres solubles ( $\mu\text{g/g}$ )	Evolution %
Sidi Aïch	0	72,86 $\pm$ 25,01 <sup>NS</sup>	
	100	83,52 $\pm$ 34,02 <sup>NS</sup>	14,63
	200	118,66 $\pm$ 17,49 <sup>NS</sup>	62,86
Sup Aguadulce	0	83,61 $\pm$ 42,33 <sup>NS</sup>	
	100	99,62 $\pm$ 33,46 <sup>NS</sup>	19,15
	200	135,52 $\pm$ 74,22 <sup>NS</sup>	62,08



**Fig. 18 :** l'évolution des moyennes des sucres solubles ( $\mu\text{g/g}$ ) pour V1 (sidi Aïch) et V2 (Super Aguadulce) en fonction de la dose du cuivre (0, 100, 200 ppm).

### ➤ Application 2

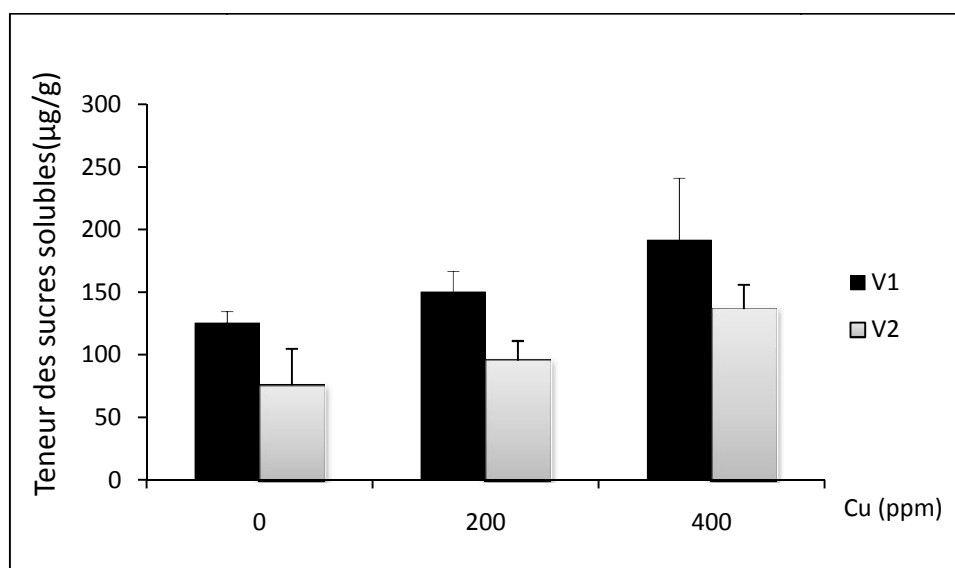
L'analyse des résultats (Tab.05) montre que la variation des teneurs en sucre soluble est fortement conditionnée par l'effet du stress métallique ( $p < 0,005$ ), ainsi que la nature du génotype testé ( $p < 0,005$ ). L'interaction des deux facteurs d'étude n'exerce aucun effet significatif sur les fluctuations de ce paramètre ( $P > 0,05$ ), indiquant que les deux génotypes expérimentés réagissent d'une façon similaire face au ce stress.

Les résultats moyens (Tab.13), affichent que l'application des doses croissantes de cuivre, induit une augmentation des taux des sucres solubles. L'allure de cette augmentation est d'une grandeur différent à travers les deux génotypes.

Chez le génotype Sidi Aïch, les valeurs de la teneur en sucres solubles sont plus importantes que celles enregistrées par le deuxième génotype (Fig.19). Au lot témoin, on enregistre une valeur moyenne estimée à  $125,33 \mu\text{g/g}$ . Au niveau des traitements D1 et D2, les accumulations respectives des sucres solubles sont de l'ordre de  $150,10 \mu\text{g/g}$  et  $191,71 \mu\text{g/g}$ , exprimant des progressions respectives de l'ordre de  $19,76\%$  et  $52,26\%$  par rapport au témoin. La même tendance d'évolution a été signalée chez le génotype Sup Aguadulce, ainsi le lot témoin inscrit une valeur moyenne de  $75,74 \mu\text{g/g}$ . Dans les traitements D1 et D2, les teneurs moyennes en sucres solubles sont évaluées respectivement à  $95,52 \mu\text{g/g}$  et à  $136,48 \mu\text{g/g}$ , représentant des évolutions croissantes de  $26,43\%$  et  $80,26\%$ .

**Tableau n°13:** Teneur en sucres solubles en  $\mu\text{g/g}$  dans les feuilles des deux génotypes de la fève exposés au cuivre (Application 2).

Génotype	Dose de Cu (ppm)	Sucres solubles ( $\mu\text{g/g}$ )	Evolution %
Sidi Aïch <sup>A</sup>	0 <sup>B</sup>	125,33± 9,29	/
	200 <sup>B</sup>	150,10± 16,60	19,76
	400 <sup>A</sup>	191,71± 49,36	52,96
Sup Aguadulce <sup>B</sup>	0 <sup>B</sup>	75,71± 29,15	/
	200 <sup>B</sup>	95,52± 15,61	26,43
	400 <sup>A</sup>	136,48± 19,61	80,26



**Fig. 19 :** l'évolution des moyennes des sucres solubles ( $\mu\text{g/g}$ ) pour V1 (sidi Aïch) et V2 (Super Aguadulce) en fonction de la dose du cuivre (0, 200, 400 ppm).

### ➤ Discussion

Outre les changements de teneur en acides aminés, une accumulation de glucides solubles a été rapportée en réponse à différents stress environnementaux et particulièrement des métaux lourds (Samarakoon et Rauser, 1979 ; Moya *et al.*, 1993 ; Costa et Spitz, 1997 ; Dubey et Singh, 1999).

Les résultats obtenus à partir de l'estimation de la teneur en sucre soluble ne montrent aucun effet significatif de tous les facteurs étudiés durant la première application. Par contre au deuxième période d'application, l'élaboration de ce paramètre est conditionnée par l'intensité du cuivre et la nature du génotype testé.

Les sucres solubles, principalement, saccharose, glucose et fructose, jouent un rôle central dans la structure, le métabolisme et le fonctionnement des plantes. Ils sont de plus impliqués dans de nombreux mécanismes de réponse aux stress, biotiques ou abiotiques (Ramel, 2009).

A coté de la proline, les sucres solubles totaux contribuent fortement à l'ajustement osmotique chez les plantes en conditions de stress. 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) remettent cette accumulation à une adaptation très possible de la plante pour ajuster et maintenir un potentiel osmotique favorable.

### **2.1.5. Taux des pigments photosynthétiques**

#### **2.1.5.1. Chlorophylle a**

##### **➤ Application 1**

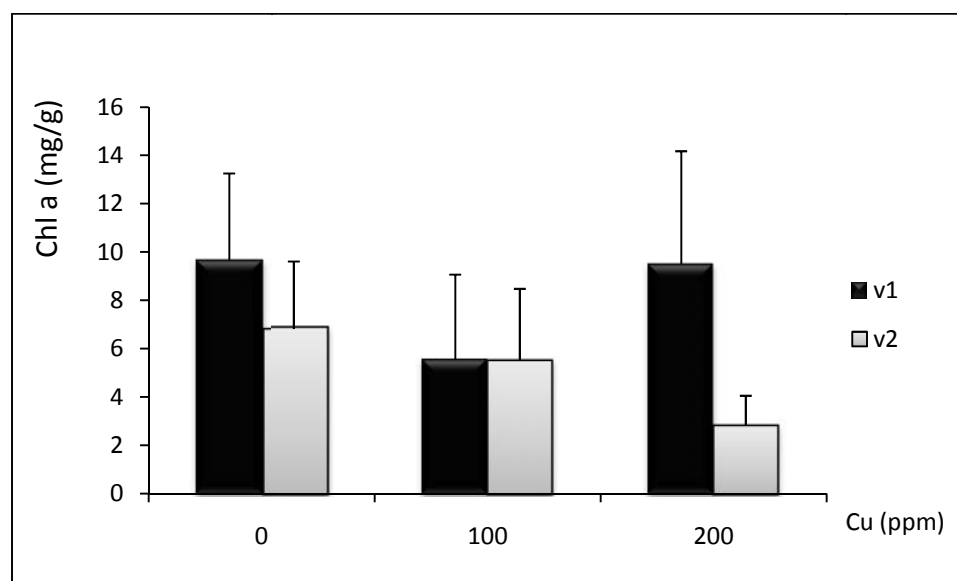
L'examen des résultats obtenus (Tab.05), montre que l'application du Cu n'exerce aucune effet significatif sur la fluctuation des niveaux de la chlorophylle a ( $p > 0,05$ ). Le facteur génotype influe d'une manière très hautement significative sur la variation de cet élément ( $p < 0,005$ ). L'interaction des deux facteurs d'étude provoque également un effet significatif ( $p < 0,005$ ) sur l'expression de cette caractéristique, ceci est expliqué par la réponse différente des deux génotypes testés à l'égard du stress appliqué.

Les résultats obtenus (Tab.14) montrent que l'augmentation des doses de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  appliquées provoque une progression de la quantité de la Chlorophylle a. L'intensité de cette évolution est d'une ampleur différente à travers les deux génotypes testés.

Chez le génotype Sidi Aïch, la quantité de la Chlorophylle a enregistrée par les témoins (9,67 mg/g) est sensiblement identique à celle enregistrée par les plantes soumises au traitement métallique D2 (9,50mg/g). Au niveau du traitement D1, ce paramètre diminue de 42,50% par rapport au lot témoin. Chez le génotype Sup Aguadulce, l'application croissante du Cu induit une nette diminution de la teneur en chlorophylle a, cette régression est estimée à 19,53% sous le traitement D1, et à 58,60% chez les plantes issues du traitement D2 par rapport au témoin qui enregistre 6,86mg/g.

**Tableau n°14** : Les teneurs en Chlorophylle a en mg/g des feuilles des deux génotypes de la fève exposés au cuivre (Application 1).

Génotype	Dose de Cu (ppm)	Chl a (mg/g)	Evolution %
Sidi Aïch <sup>A</sup>	0	9,67±3,59 <sup>A</sup>	/
	100	5,56±3,50 <sup>BC</sup>	-42,50
	200	9,50±4,67 <sup>A</sup>	-1,76
Sup Aguadulce <sup>B</sup>	0	6,86 ± 2,79 <sup>AB</sup>	/
	100	5,52±2,96 <sup>AB</sup>	-19,53
	200	2,84±1,21 <sup>C</sup>	-58,60

**Fig. 20** : l'évolution des moyennes des teneurs en Chlorophylle a (mg/g) pour le génotype Sidi Aïch (V1) et Super Aguadulce (V2) en fonction de la dose du cuivre (0, 100, 200 ppm).

### ➤ Application 2

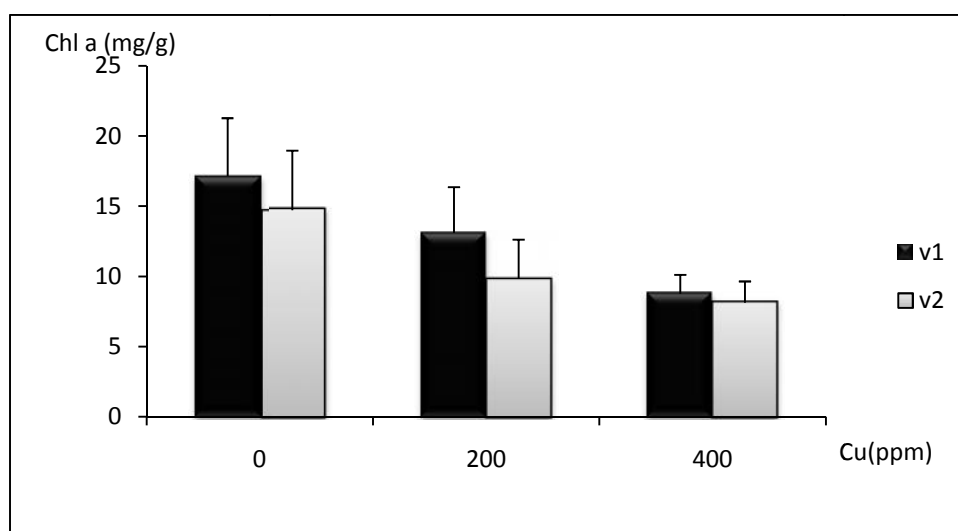
L'étude de l'analyse des résultats (Tab.05) montre que la variation de la quantité de la chlorophylle a est grandement conditionnée par l'intensité du cuivre ( $P < 0,005$ ). L'application croissante du  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  provoque un abaissement de ce paramètre. Par contre le facteur génotype et l'interaction entre les deux facteurs, n'exercent aucune variation notable ( $p > 0,05$ ). Ce qui indique que les deux génotypes testés ont réagi d'une manière identiques sous l'effet du cuivre.

Pour le génotype Sidi Aïch, on enregistre pour le témoin, une moyenne évaluée à 17,17 mg/g. Dans les lots, D1 et D2, les régressions de la chlorophylle a atteignent respectivement 13,12 mg/g et 8,79 mg/g, exprimant ainsi des abaissements de l'ordre de 23,58% et 48,80%. Chez le génotype Super Aguadulce, les moyennes de la chlorophylle a

enregistrées sont d'un ordre plus bas, en comparaison avec celles enregistrées pour le premier génotype (Fig.21). Ainsi, dans le lot témoin, on enregistre une valeur moyenne évaluée à 14,73 mg/g. Dans les traitements D1 et D2, ce paramètre affiche respectivement 9,86 et 8,14mg/g, inscrivint des évolutions de l'ordre de -33,06% et -44,73%.

**Tableau n°15** : Les teneurs en Chlorophylle a en mg/g des feuilles des deux génotypes de la fève exposés au cuivre (Application 2).

Génotype	Dose de Cu (ppm)	Chl a (mg/g)	Evolution %
Sidi Aïch	0 <sup>A</sup>	17,17 ± 4,12	/
	200 <sup>B</sup>	13,12 ± 3,25	-23,58
	400 <sup>B</sup>	8,79 ± 1,34	-48,80
Sup Aguadulce	0 <sup>A</sup>	14,73 ± 4,24	/
	200 <sup>B</sup>	9,86 ± 2,77	-33,06
	400 <sup>B</sup>	8,14 ± 1,51	-44,73



**Fig. 21** : l'évolution des moyennes des teneurs en Chlorophylle a (mg/g) pour le génotype Sidi Aïch (V1) et Super Aguadulce (V2) en fonction de la dose du cuivre (0, 200, 400 ppm).

### 2.1.5.2. Chlorophylle b

#### ➤ Application 1

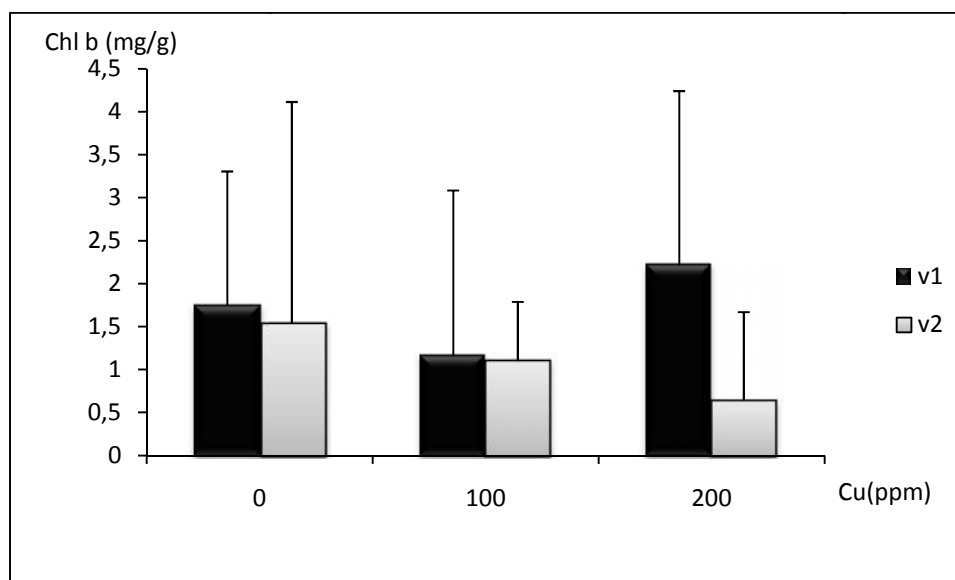
L'analyse des données obtenues (Tab.05), illustre que l'expression de cette caractéristique est faiblement influencée par le cuivre ( $p > 0,05$ ), la nature du génotype testé ( $p > 0,05$ ) et l'interaction des deux facteurs d'étude ( $p > 0,05$ ). Ceci indique que les réactions manifestées à la suite de l'application du cuivre, par les deux génotypes testés s'avèrent équivalentes.

Les résultats moyens obtenus (Tab.16), montrent que l'application croissante de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  provoque des variations régressives des niveaux de la chlorophylle b chez le génotype Sup Aguadulce. Ainsi, les lots D1 et D2 inscrivent des diminutions respectives par rapport au lot témoin, estimées à 28,10% et 58,16%.

Pour le génotype Sidi Aïch, on enregistre des valeurs moyennes de la chlorophylle b supérieures par rapport au l'autre génotype, et surtout au niveau du traitement D2 (Fig.22). Ainsi, au niveau du lot témoin, la valeur moyenne de la chlorophylle b est estimée à 1,75 mg/g. Pour le niveau de traitement D1, on signale une régression qui atteint 1,16 mg/g exprimant une réduction par rapport au témoin de l'ordre de 33,71%. Pour le lot D2, la moyenne enregistrée est de 2,21 mg/g manifestant une progression de l'ordre de 26,28%.

**Tableau n°16:** Les teneurs en Chlorophylle b en mg/g des feuilles des deux génotypes de la fève exposés au cuivre (Application 1).

Génotype	Dose de Cu (ppm)	Chl b (mg/g)	Evolution %
Sidi Aïch	0	1,75 ± 1,56 <sup>NS</sup>	/
	100	1,16±1,92 <sup>NS</sup>	-33,71
	200	2,21±2,03 <sup>NS</sup>	26,28
Sup Aguadulce	0	1,53 ± 2,58 <sup>NS</sup>	/
	100	1,10±0,69 <sup>NS</sup>	-28,10
	200	0,64±1,02 <sup>NS</sup>	-58,16



**Fig. 22 :** l'évolution des moyennes des teneurs en chlorophylle b (mg/g) pour le génotype Sidi Aïch (V1) et Super Aguadulce (V2) en fonction de la dose du cuivre (0, 100, 200 ppm).

➤ **Application 2**

L'analyse de la variance (Tab.05) révèle que les variations de la chlorophylle b dépendent grandement de l'intensité du cuivre ( $p < 0.05$ ). Le facteur génotypique n'affecte que faiblement les variations de la teneur en cet élément ( $p > 0,05$ ). L'interaction des deux facteurs étudiés n'exerce également aucun effet significatif sur les fluctuations de ce paramètre, cela indique que les réactions des deux génotypes testés sont identiques en présence de stress avec le cuivre.

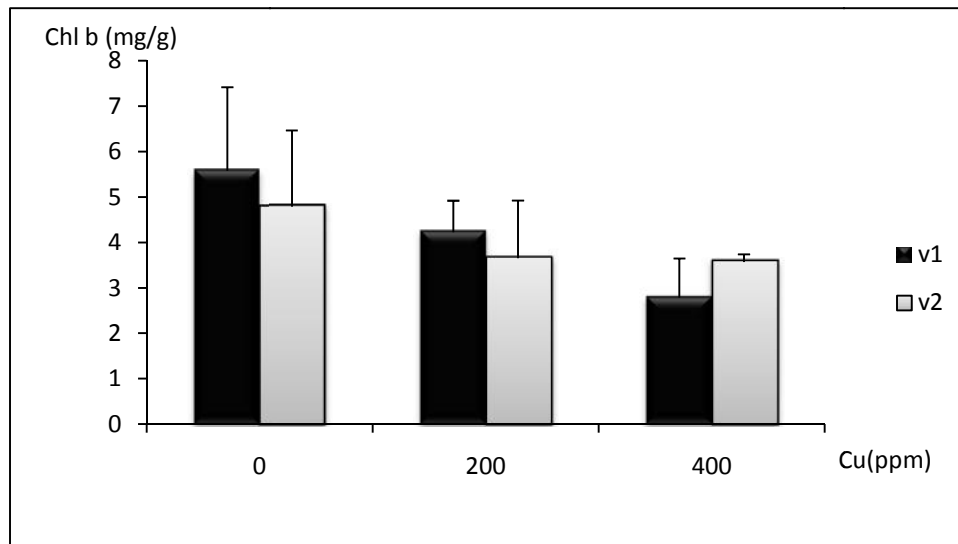
Les résultats moyens montrent que l'intensité du cuivre à travers l'application croissante des doses D1 et D2, provoque une réduction de la quantité des chlorophylles b chez les deux génotypes (Tab.17).

Chez le génotype sidi Aïch, dans les conditions optimales (témoin), on enregistre une valeur moyenne de la chlorophylle b estimée à 5,59 mg/g. Sous les traitements métalliques D1 et D2, les valeurs moyennes enregistrées expriment des évolutions régressives de l'ordre de 24,33 et 50,09%.

Chez le génotype Sup Aguadulce, le témoin exprime une teneur moyenne de la chlorophylle b de l'ordre de 4,79 mg/g. Sous l'application de cuivre à différentes doses, D1 et D2, les teneurs en chlorophylle b estimées sont sensiblement identiques, on enregistre respectivement 3,66 mg/g et 3,57 mg/g, inscrivant ainsi des régressions respectives de 23,59% et 25,47% par rapport au témoin.

**Tableau n°17** : Les teneurs en chlorophylle b en mg/g des feuilles des deux génotypes de la fève exposés au cuivre (Application 2).

Génotype	Dose de Cu (ppm)	Chl b (mg/g)	Evolution %
Sidi Aïch	0 <sup>A</sup>	5,59 ± 1,84	/
	200 <sup>AB</sup>	4,23 ± 0,69	-24,33
	400 <sup>B</sup>	2,79 ± 0,86	-50,09
Sup Aguadulce	0 <sup>A</sup>	4,79 ± 1,68	/
	200 <sup>AB</sup>	3,66 ± 1,27	-23,59
	400 <sup>B</sup>	3,57 ± 0,17	-25,47



**Fig. 23 :** l'évolution des moyennes des teneurs en chlorophylle b (mg/g) pour le génotype Sidi Aïch (V1) et Super Aguadulce (V2) en fonction de la dose du cuivre (0, 200, 400 ppm).

### 2.1.5.3. Chlorophylle a+b

#### ➤ Application 1

Le traitement des résultats (Tab.05) indique que la variation des taux de la chlorophylle a+b est très dépendante de l'intensité du stress appliqué ( $p < 0,005$ ), cette variation est également influencée par le facteur génotypique et l'interaction des deux facteurs d'étude ( $p < 0,005$ ). Ceci indique que les deux génotypes testés ont manifestés des comportements différents en réaction à l'application du stress métallique.

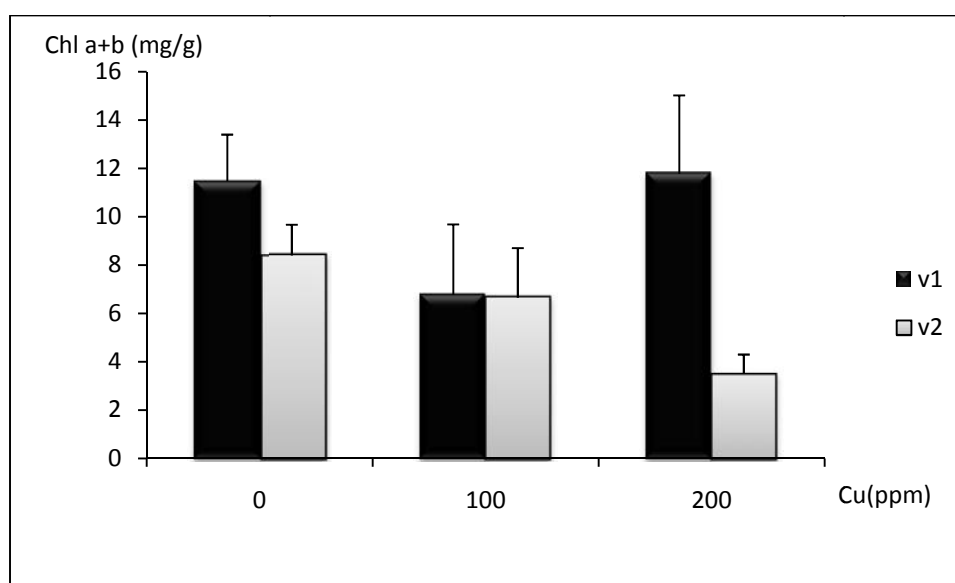
Les résultats moyens (Tab.18) montrent que l'application des doses croissantes de cuivre, est à la source d'une diminution notable des taux de chlorophylle a+b. Les deux génotypes testés expriment différemment cette diminution.

Chez le génotype Sidi Aïch, le témoin exprime une moyenne de 11,47mg/g. Dans le traitement D1, la moyenne enregistrée est de 6,67mg/g, avec une diminution par rapport au témoin, de l'ordre de 41,06%. Pour le traitement D2, on assiste à une augmentation du taux de la chlorophylle a+b qui atteint 11,77mg/g exprimant une augmentation de l'ordre de 2,61%.

Chez le génotype Super Aguadulce, les valeurs du taux de chlorophylle a+b sont plus faibles en comparaison avec celles enregistrées pour le génotype Sidi Aïch (Fig.24). Ainsi, le témoin enregistre 8,39 mg/g de moyenne. Dans les lots D1 et D2, les moyennes enregistrées sont respectivement 6,65 et 3,50 mg/g, exprimant des diminutions du taux de chlorophylle a+b de l'ordre de 20,74 et 58,28%.

**Tableau n°18:** Taux des chlorophylles a+b en mg/g des feuilles des deux géotypes de la fève exposés au cuivre (Application 1).

Géotype	Dose de Cu (ppm)	Chl a+b (mg/g)	Evolution %
Sidi Aïch <sup>A</sup>	0 <sup>A</sup>	11,47 ± 1,93 <sup>A</sup>	/
	100 <sup>B</sup>	6,76±2,91 <sup>C</sup>	-41,06
	200 <sup>B</sup>	11,77±3,24 <sup>A</sup>	2,61
Sup Aguadulce <sup>B</sup>	0 <sup>A</sup>	8,39 ±1,28 <sup>BC</sup>	/
	100 <sup>B</sup>	6,65±2,42 <sup>B</sup>	-20,74
	200 <sup>B</sup>	3,50±0,79 <sup>D</sup>	-58,28



**Fig. 24 :** l'évolution des moyennes des teneurs en Chlorophylle a+B (mg/g) pour le géotype Sidi Aïch (V1) et Super Aguadulce (V2) en fonction de la dose du cuivre (0, 100, 200 ppm).

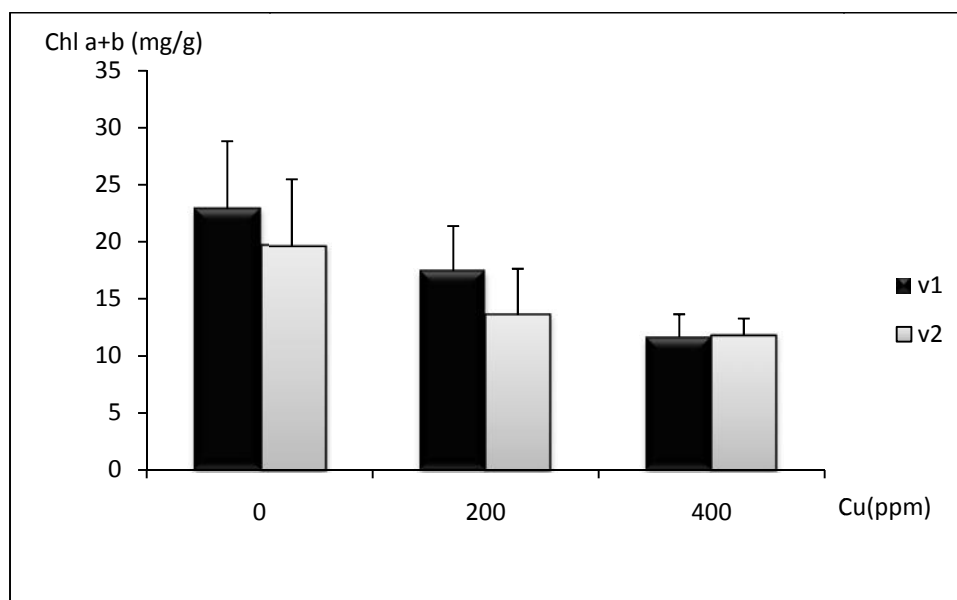
### ➤ Application 2

L'analyse des résultats (Tab.05), montre que le stress induit par le cuivre, provoque des fluctuations de grande intensité sur les niveaux de chlorophylle a+b ( $p < 0,01$ ), ce qui indique que l'exposition des plantes à des concentrations différentes du Cu s'accompagne d'une grande vacillation des teneurs en cet élément. Le facteur génotypique n'exerce aucun effet significatif sur la variation de ce paramètre, ainsi que l'interaction des deux facteurs d'étude ( $p > 0,05$ ), ceci s'explique par la réponse similaire des deux géotypes testés contre le traitement par le cuivre.

Les résultats moyens (Tab.19) montrent que la quantité de la chlorophylle a+b diminue en fonction de l'intensité du cuivre. Dans les conditions optimales, la quantité moyenne enregistrée par les témoins des deux génotypes est apparue élevée 22,86mg/g (sidi Aïch) et 19,62mg/g (Sup Aguadulce). Sous le traitement D1 et D2, le génotype sidi Aïch marque une réduction de 17,44 mg/g à 11,64 mg/g, présentant des évolutions régressives de 23,71% et 49,08%, alors que chez le génotype Sup Aguadulce, les diminutions enregistrées sont de l'ordre de 30,78% et 39,96% respectivement pour les traitements D1 et D2.

**Tableau n°19:** Taux des chlorophylles a+b en mg/g des feuilles des deux génotypes de la fève exposés au cuivre (Application 2).

Génotype	Dose de Cu (ppm)	Chl a+b (mg/g)	Evolution %
Sidi Aïch	0 <sup>A</sup>	22,86 ± 5,96	/
	200 <sup>B</sup>	17,44 ± 3,94	-23,71
	400 <sup>B</sup>	11,64 ± 2,02	-49,08
Sup Aguadulce	0 <sup>A</sup>	19,62 ± 5,87	/
	200 <sup>B</sup>	13,58 ± 4,06	-30,78
	400 <sup>B</sup>	11,78 ± 1,50	-39,96



**Fig. 25 :** l'évolution des moyennes des teneurs en chlorophylle a+b (mg/g) pour le génotype Sidi Aïch (V1) et Super Aguadulce (V2) en fonction de la dose du cuivre (0, 200, 400 ppm).

### 2.1.5.4. Caroténoïdes

#### ➤ Application 1

L'analyse de la variance (Tab.05), montre que l'intensité du cuivre exerce un effet significatif sur l'élaboration de la teneur en caroténoïdes ( $p < 0,05$ ). La variabilité génotypique influe également d'une manière significative ( $p < 0,05$ ). Tandis que l'effet de l'interaction des deux facteurs d'étude, n'indique aucun effet significatif sur la fluctuation de ce paramètre ( $p > 0,05$ ). Ceci indique que les deux génotypes expérimentés ont réagi d'une manière identique sous le traitement métallique.

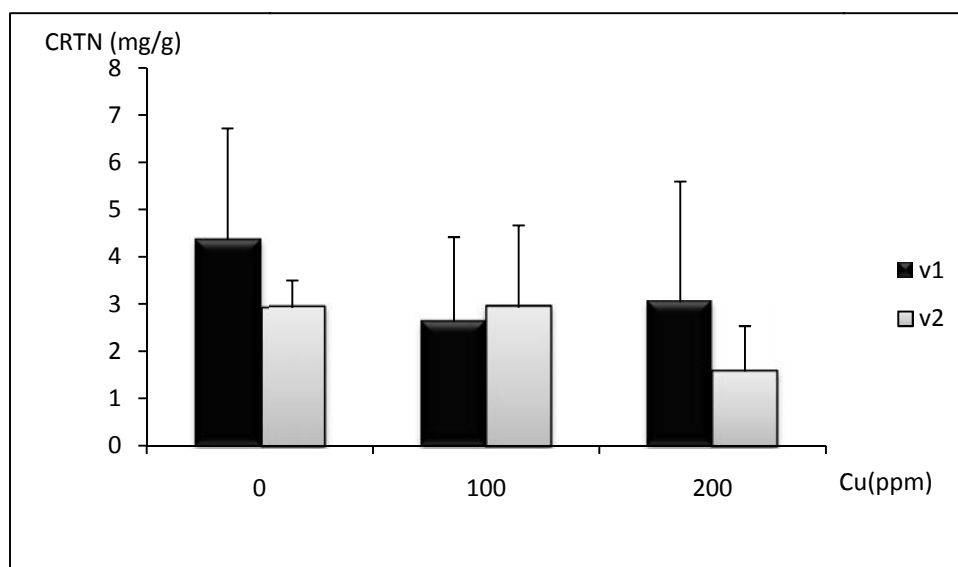
Les résultats moyens obtenus (Tab.20), montre que l'application croissante du cuivre engendre une diminution de la teneur en caroténoïdes chez les deux génotypes expérimentés.

Chez le génotype sidi Aïch, la valeur la plus élevée de cette dernière est enregistrée au niveau du traitement témoin, elle est évaluée à 4,37 mg/g. Sous l'effet du cuivre, les teneurs moyennes enregistrées dans les lots D1 et D2, sont respectivement estimées à 2,62 mg/g et à 3,04 mg/g, exprimant des réductions respectives de l'ordre de 40,04% et 30,43% par rapport au témoin.

Chez le génotype Sup Aguadulce, on enregistre des valeurs égales chez les graines issues des traitements, témoin et D1. L'application d'une concentration de D2 de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  entraîne une nette diminution de la quantité des caroténoïdes, évaluée à 1,57 mg/g et représentant une réduction de 46,23% par rapport à celle du lot témoin.

**Tableau n°20:** Taux des caroténoïdes en mg/g des feuilles des deux génotypes de la fève exposés au cuivre (Application 1).

Génotype	Dose de Cu (ppm)	CRTN (mg/g)	Evolution %
Sidi Aïch <sup>A</sup>	0 <sup>A</sup>	4,37 ± 2,36	/
	100 <sup>A</sup>	2,62 ± 1,79	-40,04
	200 <sup>A</sup>	3,04 ± 2,55	-30,43
Sup Aguadulce <sup>B</sup>	0 <sup>A</sup>	2,92 ± 0,59	/
	100 <sup>A</sup>	2,93 ± 1,74	0,34
	200 <sup>A</sup>	1,57 ± 0,96	-46,23



**Fig. 26 :** l'évolution des moyennes des teneurs en caroténoïde (mg/g) pour le génotype Sidi Aïch (V1) et Super Aguadulce (V2) en fonction de la dose du cuivre (0, 100, 200 ppm).

### ➤ Application 2

L'étude statistique des résultats (Tab.05), montre que le traitement métallique induit par le cuivre provoque un effet significatif sur la variation des niveaux des caroténoïdes ( $p < 0,05$ ). Par contre le facteur génotypique et l'interaction entre les deux facteurs d'étude n'affecte que faiblement la variation de ce paramètre ( $p > 0,05$ ).

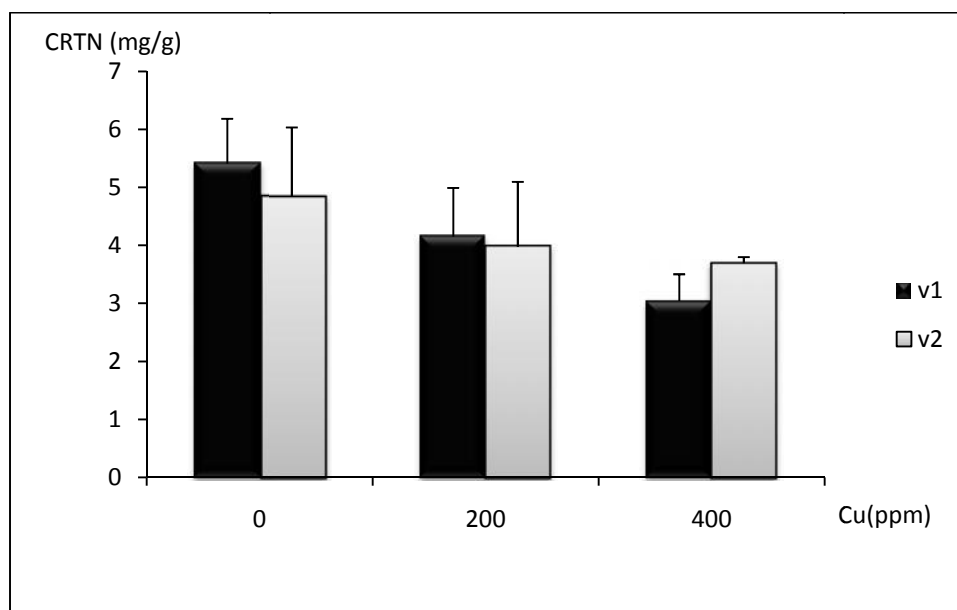
Les résultats moyens obtenus (Tab.21), montrent que la teneur en caroténoïdes diminue progressivement avec l'intensité du cuivre. L'ampleur de cette diminution est d'une grandeur différente à travers les deux génotypes testés.

Chez le génotype Sidi Aïch, dans le lot témoin, le taux des caroténoïdes s'évalue à 5,41mg/g. Dans les lots D1 et D2, ces taux arrivent successivement à 4,16 et 3,05 mg/g exprimant des régressions de l'ordre de 23,10% et 43,62%.

Chez le génotype Sup Aguadulce, le lot témoin enregistre une valeur moyenne évaluée à 4,84 mg/g. Sous l'intensité du cuivre, des régressions de l'ordre de 17,77% et de 23,55% sont enregistrées respectivement dans les traitements D1 et D2.

**Tableau n°21:** Taux des caroténoïdes en mg/g des feuilles des deux géotypes de la fève exposés au de cuivre (Application 2).

Géotype	Dose de Cu (ppm)	CRTN (mg/g)	Evolution %
Sidi Aïch	0 <sup>A</sup>	5,41 ± 0,77	/
	200 <sup>B</sup>	4,16 ± 0,84	-23,10
	400 <sup>B</sup>	3,05 ± 0,46	-43,62
Sup Aguadulce	0 <sup>A</sup>	4,84 ± 1,20	/
	200 <sup>B</sup>	3,98 ± 1,12	-17,77
	400 <sup>B</sup>	3,70 ± 0,11	-23,55



**Fig. 27 :** l'évolution des moyennes des teneurs des caroténoïdes (mg/g) pour le géotype Sidi Aïch (V1) et Super Aguadulce (V2) en fonction de la dose du cuivre (0, 200, 400 ppm).

#### ➤ Discussion

Les mesures de la teneur en pigments chlorophylliennes permettent d'évaluer la toxicité du cuivre vis-à-vis les plantes des deux géotypes expérimentés. L'exposition de ces plantes à différentes concentration du cuivre induit un abaissement de la teneur en pigments photosynthétiques, sauf qu'au niveau de traitement 200ppm (première application) pour le géotype Sid Aïch, qui enregistre les valeurs les plus importantes de la teneur en chlorophylle b.

Le cuivre peut augmenter ou diminuer le taux de chlorophylle foliaire et modifie la fluorescence chlorophyllienne et l'activité du photosystème II (Cook et *al.*, 1997)

Le Cu serait responsable d'une inhibition de la photosynthèse par la peroxydation des lipides des membranes des thylakoïdes, le blocage de l'activité de la ribulose, 1-5, biphosphate carboxylase-oxygénase (Cook et *al.*, 1997, Vinit-Dunand et *al.*, 2002), de la

synthèse de la chlorophylle (Chl), et en interférant au niveau des photosystèmes (Cuypers 2000). Il y a diminution des contenus en Chl totale, a et b (Chatterjee et Chatterjee 2000, Demirevska- Kepova *et al.*, 2004). Et elle peut s'accompagner d'une diminution des contenus en caroténoïdes (Lou *et al.*, 2004). Cependant des augmentations de Chl dans les feuilles sont aussi observées (Cook *et al.*, 1997) et seraient dues à une concentration des métabolites cellulaires suite à l'inhibition de l'expansion cellulaire par le Cu, c'est l'effet « bronzing » (Bessoule et Mench 2002). Chugh et Sawhney (1999), ont étudiés l'effet de Cu sur la photosynthèse de *l'Elsholtzia splendens*. Ils ont suggéré que le Cu à basse concentration accrue la teneur de la chlorophylle a, tandis que la hausse concentration de Cu la diminue. Mais le contenu de la chlorophylle b est moins influencé par la haute ou basse concentration de Cu (Li *et al.*, 2003)

La diminution du taux de chlorophylle chez les plantes exposées aux métaux lourds est un phénomène très courant et supposé comme étant préliminaire à l'inhibition de la photosynthèse (Prasad, 1999). Le cuivre semble plus affecter la biosynthèse des chlorophylles que le cadmium chez *Lemna trisulca* (Prasad *et al.*, 2001) et *Chlamydomonas reinhardtii* (Prasad *et al.*, 1998) qui lui-même semble avoir plus d'effets que le plomb chez *Triticum aestivum* (Oncel *et al.*, 2000). Cependant, les effets observés semblent dépendre de l'âge des feuilles, les feuilles mûres étant plus sensibles que les feuilles néoformées (Krupa et Moniak, 1998).

### 2.1.6. Taux des protéines totales

#### ➤ Application 1

Le traitement des résultats (Tab.05) indique que le l'application du cuivre influe d'une manière très hautement significatif sur la variation des taux des protéines totales ( $p < 0,005$ ), cette variation est également influencée par le facteur génotypique et l'interaction des deux facteurs d'étude ( $p < 0.005$ ). Ceci indique que les deux génotypes testés ont manifesté des comportements différents en réaction à l'application du stress métallique.

Les résultats moyens (Tab.22) montrent que l'application des doses croissantes de  $\text{CuSO}_4, 5\text{H}_2\text{O}$  dans le substrat de culture induit une diminution des taux en protéines totales des graines. La diminution enregistrée est très différente à travers les deux génotypes testés.

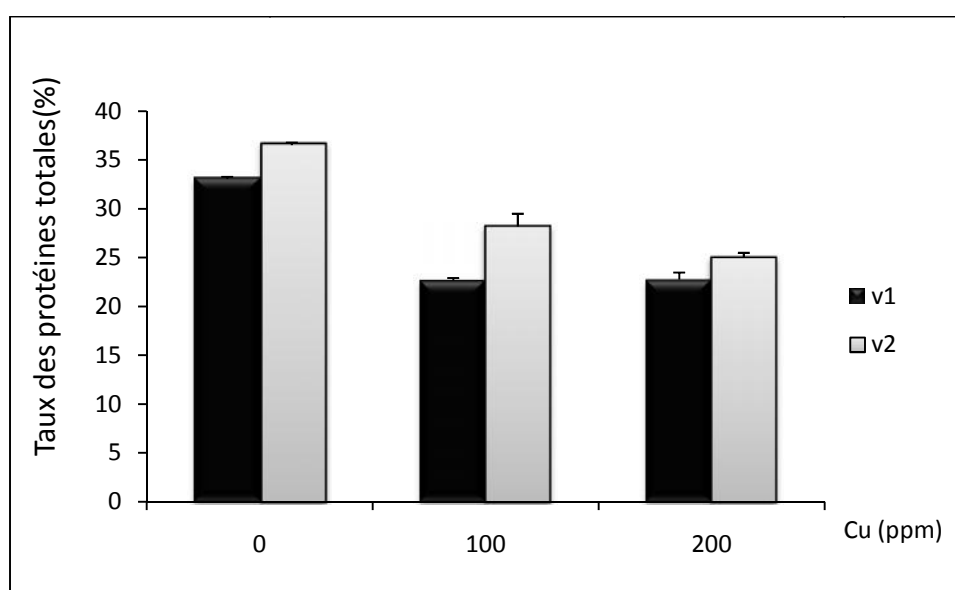
Chez le génotype Sidi Aïch, le taux des protéines totales enregistré au lot témoin est de l'ordre de 33,06%. Au niveau des traitements D1 et D2, on mentionne respectivement 22,65%

et 22,75%, ces deux valeurs sont presque égales, et inscrivent des diminutions respectives de l'ordre de 31,48% et 31,18% par rapport au témoin.

Chez le génotype Super Aguadulce, les valeurs du taux des protéines sont plus importantes que celles enregistrées avec le premier génotype (Fig.28). Ainsi, pour le lot témoin, la valeur moyenne est de 36.51%. Pour les lots D1 et D2, ces valeurs sont évaluées dans un ordre respectif à 28,21% et à 25,04 %.inscrivant des diminutions de l'ordre de 22,73% et 31,41%.

**Tableau n°22** : Taux des protéines totales (%) au niveau des graines des deux génotypes de la fève exposés au cuivre (Application 1).

Génotype	Dose de Cu (ppm)	protéines totales (%)	Evolution %
Sidi Aïch <sup>A</sup>	0 <sup>A</sup>	33,06 ± 0,22 <sup>B</sup>	/
	100 <sup>B</sup>	22,65 ± 0,26 <sup>E</sup>	-31,48
	200 <sup>C</sup>	22,75 ± 0,73 <sup>E</sup>	-31,18
Sup Aguadulce <sup>B</sup>	0 <sup>A</sup>	36,51 ± 0,26 <sup>A</sup>	/
	100 <sup>B</sup>	28,21 ± 1,28 <sup>C</sup>	-22,73
	200 <sup>C</sup>	25,04 ± 0,45 <sup>D</sup>	-31,41



**Fig. 28** : l'évolution des moyennes des taux des protéines totales (%) pour V1 (sidi Aïch) et V2 (Super Aguadulce) en fonction de la dose du cuivre (0, 100, 200 ppm).

➤ **Application 2**

L'analyse de la variance (Tab.05) indique que la variation des doses du Cu ajoutée après la deuxième application affect la teneur en protéines totales d'une manière hautement significative ( $p < 0,005$ ). La variabilité génotypique influe également d'une manière très hautement significatif sur l'expression de ce paramètre ( $p < 0,005$ ). Par contre l'effet de l'interaction des deux facteurs d'étude est non significatif ( $p > 0,05$ ). Ce qui indique que les deux géotypes se sont comportés d'une manière identique vis-à-vis de l'application de ce stress.

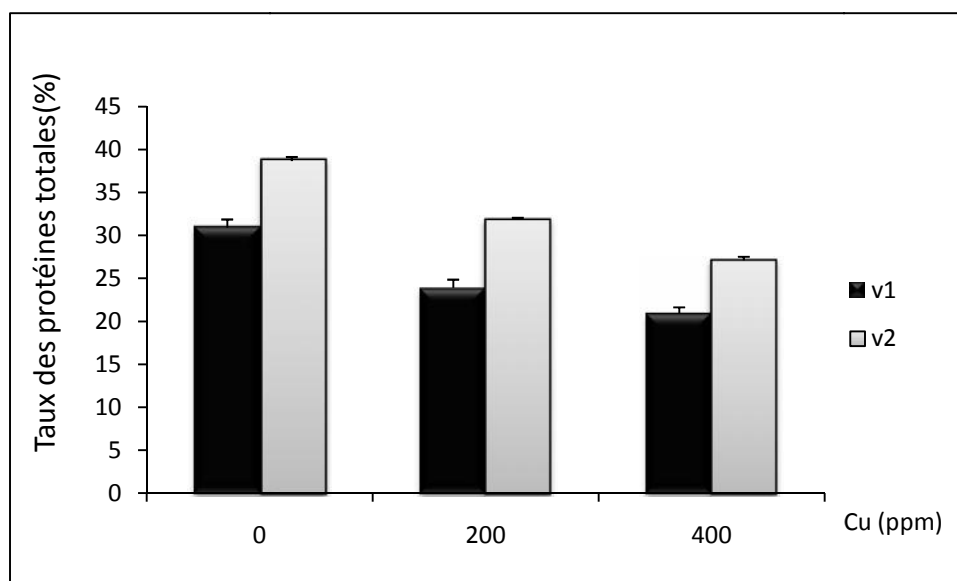
L'observation des résultats moyens (Tab.23) révèle une diminution du taux des protéines en fonction de l'intensité des doses en Cu appliquées. L'allure de cette diminution est d'une grandeur différente à travers les deux géotypes.

Chez le géotype Sidi Aïch, le lot témoin inscrit une moyenne évaluée à 30.95%. Dans les lots D1 et D2, les moyennes de ces taux sont dans un ordre respectif 23,91 et 20,95%, exprimant ainsi, des diminutions de l'ordre de 22,74% et 32,31%.

Chez le géotype Super Aguadulce, les taux moyens enregistrés des protéines sont plus important, en comparaison avec le premier géotype (Fig.29). Ainsi, pour le lot témoin, la moyenne enregistrée est de 38.67%. Pour les traitements D1 et D2, les valeurs moyennes du taux des protéines inscrivent dans un ordre respectif 31,89% et 27,14% exprimant des diminutions de l'ordre de 17,53 et 29,82% par rapport au témoin.

**Tableau n°23** : Taux des protéines totales (%) au niveau des graines des deux géotypes de la fève exposés au cuivre (Application 2).

Géotype	Dose de Cu (ppm)	protéines totales (%)	Evolution %
Sidi Aïch <sup>A</sup>	0 <sup>A</sup>	30,95 ± 0,93 <sup>B</sup>	/
	200 <sup>B</sup>	23,91 ± 0,97 <sup>E</sup>	-22,74
	400 <sup>C</sup>	20,95 ± 0,70 <sup>E</sup>	-32,31
Sup Aguadulce <sup>B</sup>	0 <sup>A</sup>	38,67 ± 0,48 <sup>A</sup>	/
	200 <sup>B</sup>	31,89 ± 0,18 <sup>C</sup>	-17,53
	400 <sup>C</sup>	27,14 ± 0,40 <sup>D</sup>	-29,82



**Fig. 29:** l'évolution des moyennes des taux des protéines (%) pour V1 (sidi Aïch) et V2 (Super Aguadulce) en fonction de la dose du cuivre (0, 200, 400 ppm).

#### ➤ Discussion

Les résultats obtenus montrent que l'exposition des deux génotypes à différentes concentrations du cuivre engendre une diminution des taux des protéines totales au niveau des grains. L'excès de Cu dans les cellules est à l'origine d'un stress oxydant (Mench *et al.*, 1998, Pilon-Smits 2005, Boojar et Goodarzi, 2007). Le Cu va induire la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) et de radicaux libres (Hall, 2002). Les ERO sont dangereux pour les cellules car s'ils ne sont pas réduits ils altèrent les protéines et les acides aminés, l'ADN, l'ARN et entraînent la peroxydation des lipides membranaires (Cuypers, 2000 et Boojar et Goodarzi 2007).

Les protéines sont l'une des principales cibles des ERO induisant une augmentation de la teneur en protéines carbonylées (Dean *et al.*, 1997). Le pool de protéines ainsi oxydées doit être dégradé afin d'éviter l'accumulation de protéines non fonctionnelles (Shringarpure *et al.*, 2003). Le système protéolytique végétal est composé par les protéases, principalement localisé dans les lysosomes et organites, et la voie ubiquitine-protéasome, dans le cytosol et le noyau (Rawlings *et al.*, 2004; Kurepa et Smalle, 2008). D'autres études ont montré qu'en réponse aux dommages oxydatifs, les activités des endoprotéases sont stimulées chez les plantes (Gallego *et al.*, 2002; Romero-Puertas *et al.*, 2002) de même qu'en réponse à la présence de métaux lourds tel que le Cd, l'Hg ou le Pb (Jana et Choudhuri, 1984; McCarthy *et al.*, 2001; Garcia *et al.*, 2006; Pena *et al.*, 2006).

Reinheckel *et al* (1998), a démontré que les cellules augmentaient leur taux de protéolyse après exposition à des agents du stress oxydant. L'hypothèse prédominante est que les protéines intracellulaires oxydées par les radicaux libres seraient préférentiellement dégradées par les enzymes protéolytiques. Cette sélection serait possible par la détection des groupements carbonyles produits lors de l'oxydation.

### 2.1.7. Poids sec de la partie racinaire

#### ➤ Application 1

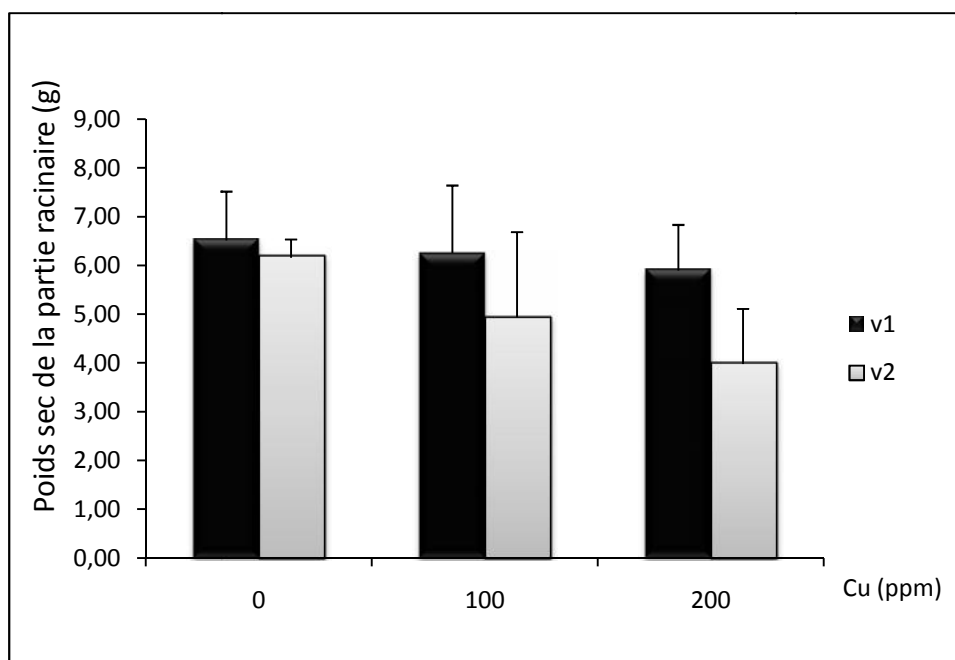
L'analyse des résultats (Tab.05) montre que la variation de poids sec de la partie racinaire est significativement influencée par la contamination avec le cuivre ( $p < 0.05$ ), l'application de cet polluant à différente dose s'accompagne d'une diminution progressive de ce paramètre. La variabilité génotypique influe d'une manière hautement significative sur la fluctuation des niveaux de cet élément ( $p < 0,01$ ). L'interaction des deux facteurs d'étude n'exerce aucun effet sur cette variation ( $p > 0,05$ ). Ceci indique que les deux génotypes testés ont manifesté des comportements identiques en réaction à l'application du stress métallique.

Chez le génotype Sidi Aïch, le témoin enregistre une moyenne qui s'évalue à 6.52 g. Pour les lots D1 et D2, les poids sec enregistrés sont respectivement de l'ordre de 6.26 et 5,90 g inscriviant des diminutions par rapport au témoin estimées à 3,98% et 10,50%.

Chez le génotype Super Aguadulce, le poids sec de la partie racinaire est plus faible par rapport au premier génotype (Fig.30). Ainsi, pour le témoin, la valeur moyenne est de 6.16g. Pour les traitements D1 et D2, les poids sec enregistrés sont respectivement de l'ordre de 4,94 et 3,98g exprimant ainsi des régressions de 19,80% et 35,98%.

**Tableau n°24** : Poids sec de la partie racinaire en (g) des deux génotypes de la fève exposés au cuivre (Application 1).

Génotype	Dose de Cu (ppm)	PS PR	Evolution %
Sidi Aïch <sup>A</sup>	0 <sup>A</sup>	6,52 ± 1,00	/
	100 <sup>AB</sup>	6,26±1,38	-3,98
	200 <sup>B</sup>	5,90±0,94	-10,50
Sup Aguadulce <sup>B</sup>	0 <sup>A</sup>	6,16 ± 0,38	/
	100 <sup>AB</sup>	4,94±1,75	-19,80
	200 <sup>B</sup>	3,98±1,13	-35,98



**Fig. 30:** l'évolution des moyennes du Poids sec de la partie racinaire en (g) pour V1 (sidi Aïch) et V2 (Super Aguadulce) en fonction de la dose du cuivre (0, 100, 200 ppm).

### ➤ Application 2

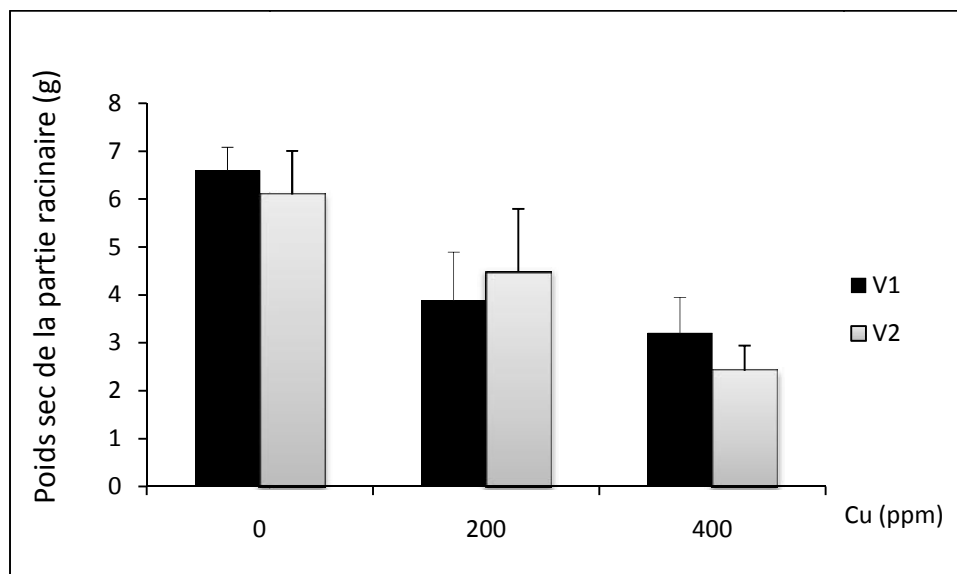
L'examen des résultats obtenus (Tab.05) indique que le poids sec de la partie racinaire est influencé d'une manière très hautement significatif par l'intensité du cuivre ( $p < 0,005$ ). Le facteur génotype ne se manifeste aucun effet significatif ( $p > 0,05$ ), ainsi que l'interaction entre les deux facteurs d'étude ( $p > 0,05$ ). Ceci s'explique par les comportements identiques des deux génotypes testés, en réaction au stress métallique appliqué.

L'analyse des résultats obtenus révèle que l'accroissement du degré de stress est accompagné d'une diminution de poids sec de la partie racinaire (Tab.25). En effet, dans les conditions optimales, on enregistre une valeur moyenne évaluée à 6,6 g chez le génotype sidi Aïch, et 6,1g chez le génotype Sup Aguadulce.

Dans les conditions de stress, le génotype Sidi Aïch enregistre des valeurs moyennes évaluées à 3,88 g, et à 3,2g respectivement pour les traitements D1 et D2, exprimant des évolutions respectives de -41,21% et -51,51% par rapport au témoin. La même tendance d'évolution a été constatée chez le génotype Sup Aguadulce (Fig.31), où on a relevé un poids sec estimé à 4,48 g au niveau du traitement D1, et à 2,42g dans le lot D2, présentant ainsi des régressions respectives de l'ordre de 26,55% et 60,32%.

**Tableau n°25** : Poids sec de la partie racinaire en (g) des deux géotypes de la fève exposés au cuivre (Application 2).

Géotype	Dose de Cu (ppm)	PS PR	Evolution %
Sidi Aïch	0 <sup>A</sup>	6,6 ±0,48	/
	200 <sup>B</sup>	3,88±1,02	-41,21
	400 <sup>C</sup>	3,2±0,75	-51,51
Sup Aguadulce	0 <sup>A</sup>	6,1±0,91	/
	200 <sup>B</sup>	4,48 ±1,32	-26,55
	400 <sup>C</sup>	2,42 ±0,53	-60,32

**Fig. 31** : l'évolution des moyennes du Poids sec de la partie racinaire en (g) pour V1 (sidi Aïch) et V2 (Super Aguadulce) en fonction de la dose du cuivre (0, 200, 400 ppm).

### 2.1.8. Poids sec de la partie aérienne

#### ➤ Application 1

L'examen des résultats obtenus (Tab.05), montre que le facteur stress métallique provoque un effet faiblement significatif sur la variation des poids sec de la partie aérienne ( $p > 0.05$ ). La variabilité génotypique exerce un effet significatif sur cette variation ( $p < 0.05$ ). L'interaction des deux facteurs d'étude manifeste un effet non significatif ( $p > 0,05$ ). Ce qui indique que les deux géotypes testés ont une réponse similaire à l'égard du stress en Cu imposé.

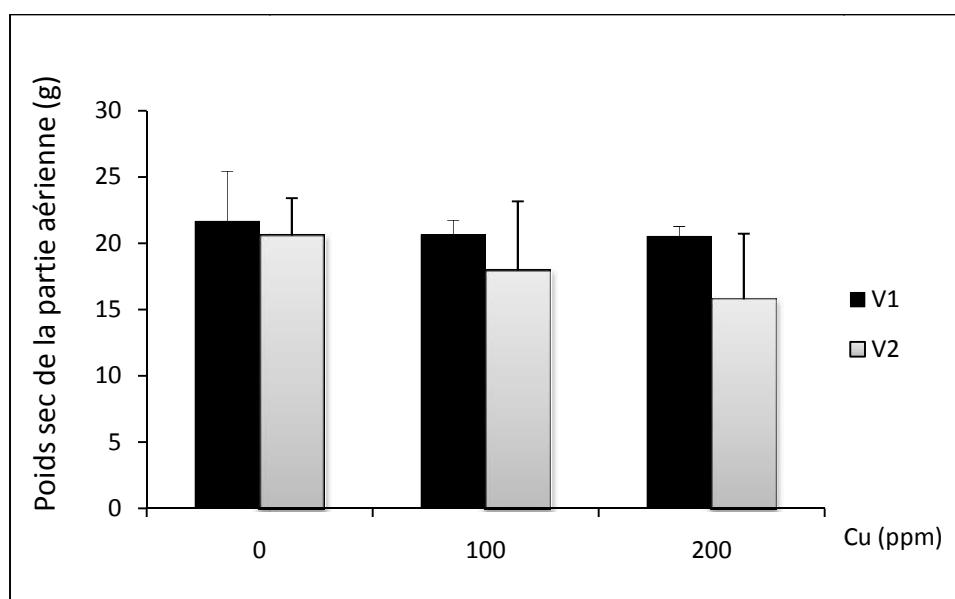
Les résultats moyens mentionnés dans le tableau n°26, relèvent que L'application croissante du cuivre induit une diminution des poids sec de la partie aérienne chez les deux géotypes expérimentés. Cependant, dans les conditions optimales (témoin), on enregistre une

valeur moyenne estimée à 21,66g pour le génotype Sidi Aïch, et à 20,58g pour le génotype Sup Aguadulce.

Dans les conditions du stress, chez le génotype Sidi Aïch on enregistre pour les traitements D1 et D2, des diminutions respectives de l'ordre de 4,61% et de 5,17%. Sous les mêmes conditions, une même tendance d'évolution a été enregistrée pour le génotype Sup Aguadulce, où on a enregistré dans les lots D1 et D2, des régressions respectives évaluées à 12,82% et à 23,32%.

**Tableau n°26** : Poids sec de la partie aérienne en (g) des deux génotypes de la fève exposés au cuivre (Application 1).

Génotype	Dose de Cu (ppm)	PS PA	Evolution %
Sidi Aïch <sup>A</sup>	0	21,66±3,75	/
	100	20,66±1,06	-4,61
	200	20,54±0,73	-5,17
Sup Aguadulce <sup>B</sup>	0	20,58±2,82	/
	100	17,94±5,22	-12,82
	200	15,78±4,95	-23,32



**Fig. 32** : l'évolution des moyennes du Poids sec de la partie aérienne en (g) pour V1 (sidi Aïch) et V2 (Super Aguadulce) en fonction de la dose du cuivre (0, 100, 200 ppm).

### ➤ Application 2

L'étude des résultats obtenus après la deuxième période du traitement (Tab.05) montre que le facteur stress métallique influe d'une manière très hautement significatif sur la fluctuation du poids sec de la partie aérienne ( $p < 0,005$ ), ceci indique que ce facteur constitue

une source de variation de ce paramètre. La nature du génotype expérimenté influe également d'une manière très hautement significatif sur cette variation ( $p < 0,005$ ). L'interaction des deux facteurs d'études exerce un effet significatif ( $p < 0,05$ ), ceci s'explique par la différence de réponses exprimées par les deux génotypes testé à l'égard de ce stress.

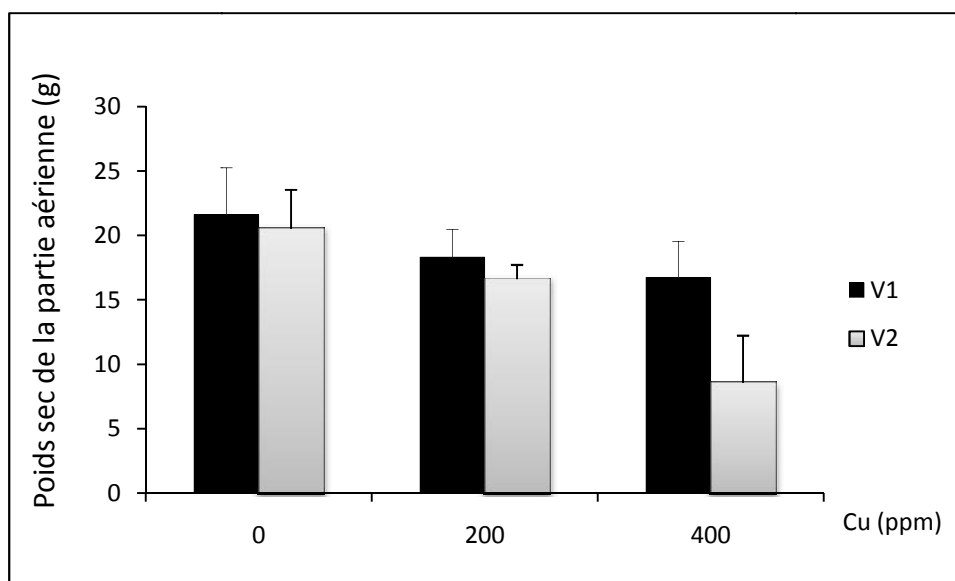
Les résultats moyens (Tab.27) dévoilent que l'application des doses croissantes en cuivre induit une diminution dans le poids sec de la partie aérienne. L'ampleur de cette diminution est différente à travers les génotypes testés.

Chez le génotype Sidi Aïch, pour le lot témoin, le poids sec enregistré est de 21,62 g. Pour les traitements D1 et D2, les moyennes enregistrées sont respectivement 18,32 g et 16,76g présentant ainsi des évolutions descendantes estimées à 15,26% et 22,48%.

Chez le génotype Super Aguadulce, les valeurs moyennes du poids sec de la partie aérienne sont plus faibles en comparaison avec le génotype Sidi Aïch (Fig.33). Ainsi, pour le témoin, la valeur moyenne enregistrée est de 20,52 g. Pour les lots D1 et D2, les valeurs moyennes enregistrées sont dans un ordre respectif 16,62 g et 8,58, évaluant ainsi des régressions de l'ordre de 19 et 58,18% par rapport au témoin.

**Tableau n°27** : Poids sec de la partie aérienne en (g) des deux génotypes de la fève exposés au cuivre (Application 2).

Génotype	Dose de Cu (ppm)	PS PA	Evolution %
Sidi Aïch <sup>A</sup>	0 <sup>A</sup>	21,62 ± 3,65 <sup>A</sup>	/
	200 <sup>B</sup>	18,32 ± 2,15 <sup>A</sup>	-15,26
	400 <sup>C</sup>	16,76 ± 2,80 <sup>A</sup>	-22,48
Sup Aguadulce <sup>B</sup>	0 <sup>A</sup>	20,52 ± 1,03 <sup>A</sup>	/
	200 <sup>B</sup>	16,62 ± 1,11 <sup>A</sup>	-19
	400 <sup>C</sup>	8,58 ± 3,66 <sup>B</sup>	-58,18



**Fig. 33** : l'évolution des moyennes du Poids sec de la partie aérienne en (g) pour V1 (sidi Aïch) et V2 (Super Aguadulce) en fonction de la dose du cuivre (0, 200, 400 ppm).

#### ➤ Discussion

Les racines sont le premier organe du végétal exposé aux métaux, et en particulier le Cu. En effet, il est admis qu'en cas de contamination par un élément trace, la croissance des racines est affectée avant que celles des parties aériennes ne le soit.

Les résultats obtenus démontrent que la production de la biomasse sèche de la partie aérienne et souterraine diminuée en fonction de la dose appliquée, cette diminution devient plus marquée après la deuxième période de l'application de Cu, où le génotype Sup Aguadulce enregistre les valeurs le plus basse sous traitement D2.

Dans le cas d'une exposition au Cu par la solution du sol, les plantes concentrent d'abord le Cu dans les racines et ce sont les organes qui subissent en premier les impacts du Cu (Cuypers 2000) et qui sont les plus atteints (Paschke et Redente 2002). La diminution de la croissance des racines a pour conséquence une diminution de la surface de prélèvement de la plante et donc une diminution du prélèvement en eau et nutriments (Brun et *al.*, 2003). L'inhibition de la croissance racinaire peut s'expliquer par les processus de lignification. Quand le Cu est en excès dans les cellules des racines la concentration en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et les quantités de peroxydases impliquées dans la synthèse de la lignine augmentent (Lin et *al.*, 2005). L'augmentation de la lignine peut engendrer une diminution de l'accessibilité du Cu aux cellules (Cuypers 2000). La lignine peut aussi se lier avec les polysaccharides des parois cellulaires, ce qui va les rigidifier et gêner la croissance des cellules (Dos Santos et *al.*, 2004),

et l'imprégnation en Cu du végétal induit une diminution de la biomasse aérienne des plantes d'autant plus importante que la contamination est élevée (Cook et al., 1997, Vinit-Dunand et al. 2002). Ces diminutions seraient dues à des faibles niveaux de Ca dans les feuilles car le Ca affecte la division et l'élongation cellulaire (Cook et al. 1997).

Nos résultats sont en accord avec ceux trouvés par Bes et al (2008), ils indiquent que le Cu induit une diminution de la biomasse sèche aérienne du *Xanthium strumarium*. Une diminution de biomasse sèche souterraine du *Festuca arundinacea L* et *Lolium perenne L* a été observé par Zhao et al (2010). Alaoui-Sossé (2004), à montré aussi que le poids sec de la partie aérienne et souterraine du *Cucumis sativus* est diminué sous l'effet du cuivre.

## 2.2. Effet du cuivre sur les paramètres morphologiques

### 2.2.1 Effet du cuivre sur la partie aérienne de la fève

#### 2.2.1.1 La surface foliaire

L'étude des résultats (Tab.28), indique que l'application de cuivre influe faiblement sur la variation des surfaces foliaires ( $p > 0,05$ ), la même observation a été remarqué pour le facteur génotype ( $p > 0,05$ ). Tandis que l'interaction des deux facteurs d'études influe d'une manière significative sur cette variation ( $p < 0,05$ ), cela indique que les deux génotypes expérimentés ont manifesté des réponses différentes face au stress métallique.

**Tableau n°05:** probabilité «  $p$  » de l'analyse de la variance des paramètres morphologiques des deux génotypes étudiés.

Variables	Application 1			Application 2		
	Dose de Cu (F1)	Génotype (F2)	Interaction (F1xF2)	Dose de Cu (F1)	Génotype (F2)	Interaction (F1xF2)
Surface foliaire	0.21462 ns	0.59206 ns	0.01097*	/	/	/
Nbre de feuilles	0.04209*	0.0007***	0.74265 ns	0.00006***	0.00005***	0.23614 ns
Nbre de gousses	0.38267 ns	0.00001***	0.19283 ns	0,38267 ns	0,00001***	0,19283 ns
Hauteur de tige	0.04085*	0.00002***	0.6164 ns	0.00001***	0***	0.54002 ns
Long racinaire	0.00239**	0.25794 ns	0.73614 ns	0***	0.31317 ns	0.5362 ns
Volume racinaire	0.00001***	0.26699 ns	0.42544 ns	0***	0.78016 ns	0.10525 ns

ns Non significatif

\* Significatif

\*\* Hautement significatif

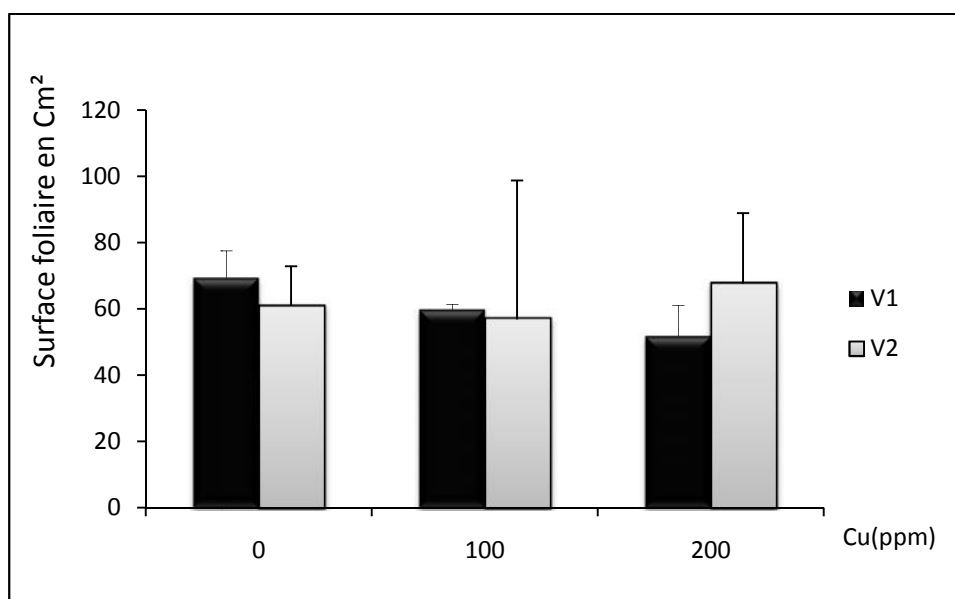
\*\*\* Très hautement significatif

Les résultats dégagés à partir de l'estimation de cette caractéristique (Tab.29), montrent que l'application croissante de cuivre entraîne une réduction des surfaces foliaires chez le génotype Sidi Aïch. Au niveau du traitement témoin, on signale une moyenne estimée

à 69,08cm<sup>2</sup>, au niveau des plantes issues des traitements D1 et D2, ces valeurs affichent respectivement 59,34 cm<sup>2</sup> et 51,60cm<sup>2</sup>, présentant des évolutions régressives de 14,10% et 25,30%. Chez le génotype Sup Aguadulce, dans le lot témoin, les plantes affichent une valeur moyenne qui s'évalue à 60,87cm<sup>2</sup>, au niveau du traitement D1, on a enregistré la plus faible surface foliaire estimée à 56,88cm<sup>2</sup>, cependant les plantes cultivées dans le niveau de traitement D2 ont réagi différemment, avec une surface estimée à 67,72cm<sup>2</sup>, valeur exprimant une augmentation de 11,25% par rapport au lot témoin.

**Tableau n°29:** La surface foliaire en cm<sup>2</sup> des feuilles des deux génotypes de la fève exposés au cuivre.

Génotype	Dose de Cu (ppm)	Surface Foliaire (cm <sup>2</sup> )	Evolution %
Sidi Aïch	0	69,08± 8,47 <sup>A</sup>	/
	100	59,34±2,07 <sup>AB</sup>	-14,10
	200	51,60±9,42 <sup>B</sup>	-25,30
Sup Aguadulce	0	60,87± 13,05 <sup>AB</sup>	/
	100	56,88±41,91 <sup>AB</sup>	-6,55
	200	67,72±21,23 <sup>AB</sup>	11,25



**Fig. 34:** l'évolution des moyennes de la surface foliaire en cm<sup>2</sup> des feuilles pour V1 (sidi Aïch) et V2 (Super Aguadulce) en fonction de la dose du cuivre (0, 100, 200 ppm).

### ➤ Discussion

Pour la surface foliaire qui est la zone principale de transpiration de la plante, les résultats obtenus montrent une variation différente des niveaux de surface foliaire entre les deux génotypes testés, ou le génotype Sidi Aïch qui est le plus affecté par l'intensité du

cuivre. Par contre le génotype Super Aguadulce, manifeste une évolution controversée de ce paramètre entre les doses apportées, avec une élévation de 11,25% de la surface foliaire enregistré après le traitement D1.

Nos résultats se conforment par les travaux de Cuypers et *al* (2004), qui rapportent que le traitement par le Cu induit une réduction estimée à 23% de la surface foliaire des plantes *Phaseolus vulgaris* L. D'autres travaux démontrent également que la surface foliaire se montre plus sensible à la contamination du milieu par les métaux lourds, c'est le cas du traitement avec le plomb qui selon Brunet (2008), permet une nette réduction des grandeurs de cette surface chez les plants de *Lathyrus sativus*.

#### 2.2.1.2. Nombre de feuilles

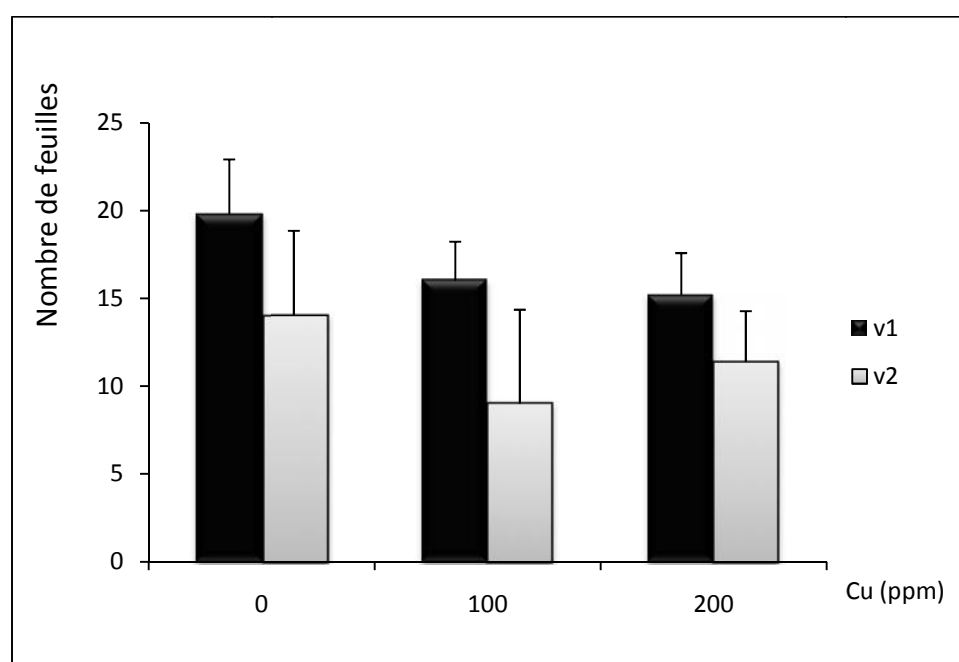
##### ➤ Application 1

L'analyse des données obtenues (Tab.28), montre que l'expression de cette caractéristique est significativement influencée par le cuivre ( $p < 0,05$ ). Également, la nature des génotypes expérimentés permettent des variations très hautement significative ( $p < 0,005$ ). L'interaction des deux facteurs d'études n'indique aucun effet sur cette variation ( $p > 0,05$ ), indiquant ainsi, que les deux génotypes testés ont réagi de manières identiques sous l'effet du cuivre.

L'exposé des résultats obtenus (Tab.30) révèle que l'accroissement du degré de stress est accompagné d'une diminution du nombre des étages foliaires. En effet, dans les conditions optimales (lot témoin), les plantes comptent en moyenne un nombre de 19,80 chez le génotype sidi Aïch, et 14 chez le génotype Sup Aguadulce. Dans les conditions de stress ce nombre moyen décroît nettement chez le génotype sidi Aïch, et atteint 16 au niveau du traitement D1, et 15,2 au niveau du traitement D2, exprimant des évolutions respectives de -19,19% et -23,23% par rapport au témoin. La même tendance d'évolution a été constatée chez le génotype Sup Aguadulce (Fig.35), où on a marqué un nombre moyen de 9,8 au niveau de D1, et 11,4 dans le traitement D2 exprimant des régressions respectives de 30% et 18,57%.

**Tableau n°30** : Nombre de feuilles des deux géotypes de la fève exposés au cuivre (Application 1).

Géotype	Dose de Cu (ppm)	Nbr F	Evolution %
sidi Aïch <sup>A</sup>	0 <sup>A</sup>	19,80± 3,11	/
	100 <sup>A</sup>	16 ± 2,23	-19,19
	200 <sup>A</sup>	15,2 ± 2,38	-23,23
Sup Aguadulce <sup>B</sup>	0 <sup>A</sup>	14 ± 4,85	/
	100 <sup>A</sup>	9,8 ± 5,35	-30
	200 <sup>A</sup>	11,4 ± 2,88	-18,57

**Fig. 35** : l'évolution des moyennes de Nombre de feuilles pour V1 (Sidi Aïch) et V2 (Super Aguadulce) en fonction de la dose du cuivre (0, 100, 200 ppm).

### ➤ Application 2

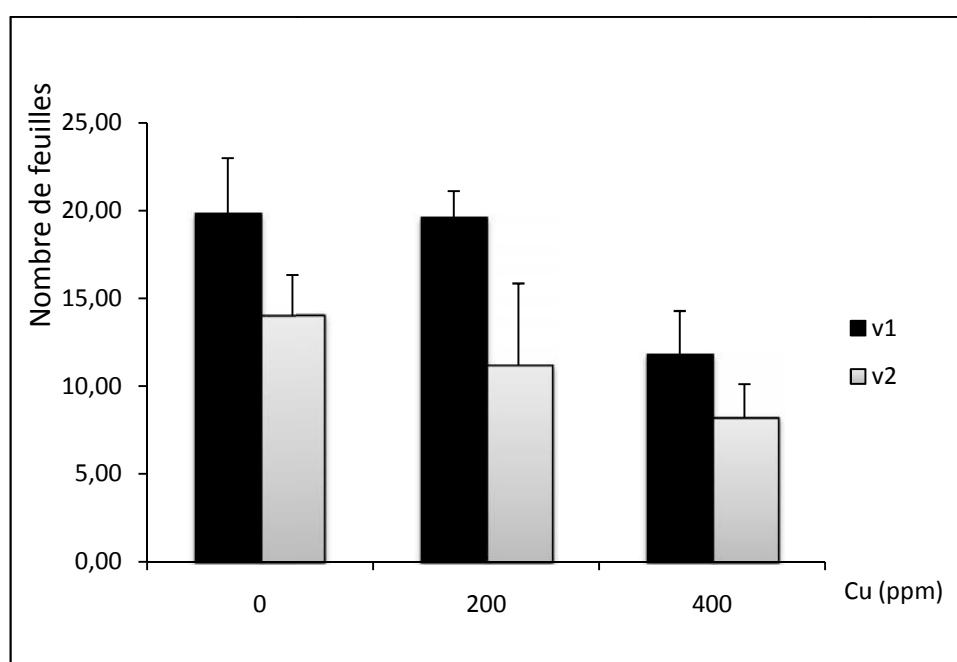
L'analyse des résultats obtenus (Tab.28), indique que la deuxième application du cuivre provoque des variations plus importantes au niveau de nombre des feuilles ( $p < 0,005$ ). Ainsi la nature des géotypes testés influe d'une manière très hautement significative sur la fluctuation de cet élément ( $p < 0,005$ ). L'interaction des deux facteurs d'étude n'exerce aucune variation notable ( $p > 0,05$ ) sur l'expression et les variations des niveaux de nombre des feuilles. Ceci indique que les deux géotypes testés, ont manifesté des comportements similaires en présence de la contrainte métallique.

Les résultats moyens obtenus à travers l'évaluation du nombre des feuilles (Tab.31) indiquent que la diminution de cette dernière est accentuée par l'intensité du cuivre.

Chez le génotype Sidi Aïch, la moyenne qui a été enregistrée au début du stress (19.6) est sensiblement identique à celle des témoins (19.8), par contre au niveau du traitement métallique D2, ce paramètre fortement diminué et atteint 11.8, présente une régression de 40,40% par rapport au lot témoin. Chez le génotype Sup Aguadulce, les valeurs du nombre des feuilles sont plus faibles que celles enregistrées pour le premier génotype (Fig.36). Ainsi, pour le témoin, on enregistre une moyenne qui s'évalue à 14 feuilles. Pour les lots D1 et D2, ces valeurs diminuent pour atteindre respectivement 11.2 et 8.2, inscrivant des dépressions de grandeurs respectives de 20% et 41,42%.

**Tableau n°31:** Nombre des feuilles des deux génotypes de la fève exposés au cuivre (Application 2).

Génotype	Dose de Cu (ppm)	Nbr F	Evolution %
Sidi Aïch <sup>A</sup>	0 <sup>A</sup>	19,8 ± 3,11	/
	200 <sup>A</sup>	19,6 ± 1,52	-1,01
	400 <sup>B</sup>	11,8 ± 2,49	-40,40
Sup Aguadulce <sup>B</sup>	0 <sup>A</sup>	14 ± 2,35	/
	200 <sup>A</sup>	11,2 ± 4,66	-20
	400 <sup>B</sup>	8,2 ± 1,92	-41,42



**Fig. 36 :** l'évolution des moyennes (moyennes ± écart-type) du Nombre de feuilles pour V1 (sidi Aïch) et V2 (Super Aguadulce) en fonction de la dose du cuivre (0, 200, 400 ppm).

Les résultats obtenus à partir de l'estimation de ce paramètre durant les deux périodes de traitement démontrent que l'impact du cuivre sur le nombre des feuilles, dépend de sa concentration et du matériel végétal utilisé. L'application du Cu à des concentrations

croissantes induit une diminution du nombre de feuilles essentiellement à forte dose (D2 de deuxième période), où on a enregistré une régression qui dépasse 40% chez les deux génotypes testés.

### 2.2.1.3. Nombre de gousses

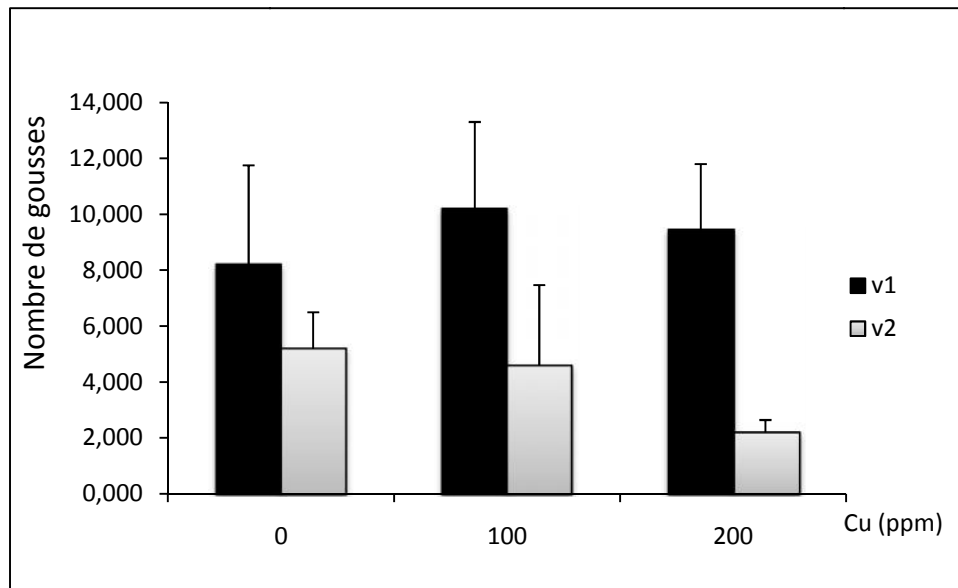
#### ➤ Application 1

L'analyse de la variance (Tab.32) montre que la variation du nombre de gousses est fortement influencée par la variation des doses de cuivre ( $p > 0,05$ ). Le facteur génotype enregistre un effet très hautement significatif sur cette variation avec  $p < 0,005$ , l'interaction des deux facteurs n'indique aucun effet significatif ( $p > 0,05$ ). Ce dernier résultat indique que les deux génotypes testés ont manifesté des comportements identiques sous l'effet du cuivre.

Les résultats obtenus suite à l'estimation du nombre des gousses, montrent qu'une divergence comportementale très prononcée est constatée à travers les deux génotypes testés (Fig.37). Chez le génotype Sidi Aïch, l'application du cuivre à différentes concentrations provoque une augmentation de nombre des gousses (Tab.32). Cependant, au niveau du traitement D1 et D2, on a relevé respectivement des données moyennes de 10,2 et 9,4 exprimant des évolutions de 24,39% et 14,63% par rapport au témoin. Par contre chez le génotype Sup Aguadulce, on a remarqué une chute de la production des gousses par plante sous l'intensité du cuivre. En effet, le témoin enregistre une valeur moyenne de 5,20 gousses, à l'échelle du traitement D1 et D2, les régressions respectives de cette caractéristique sont de l'ordre de 11,53% et 57,69% caractérisant des valeurs moyennes, dans l'ordre, évaluées à 4.6 et 2.2 gousses par plant.

**Tableau n°32:** Nombre de gousses des deux génotypes de la fève exposés au cuivre (Application 1).

Génotype	Dose de Cu (ppm)	N G	Evolution %
Sidi Aïch <sup>A</sup>	0	8,20 ± 3,56	/
	100	10,2 ± 3,11	24,39
	200	9,4 ± 2,40	14,63
Sup Aguadulce <sup>B</sup>	0	5,20 ± 1,30	/
	100	4,6 ± 2,88	-11,53
	200	2,2 ± 0,44	-57,69



**Fig. 37 :** l'évolution des moyennes de Nombre de gousses pour V1 (sidi Aïch) et V2 (Super Aguadulce) en fonction de la dose du cuivre (0, 100, 200 ppm).

#### ➤ Application 2

L'analyse des résultats obtenus (Tab.28) démontre que la variation du nombre de gousses est faiblement influencée par la deuxième application du cuivre à différentes concentrations ( $p > 0,05$ ). La variabilité génotypique influe d'une manière significative sur cette variation ( $p < 0,05$ ). L'interaction entre la nature du génotype testé et le facteur stress métallique n'exerce aucun effet sur la fluctuation des niveaux de production des gousses par plante ( $p > 0,05$ ). Ceci indique que, la réponse des deux génotypes testés s'avère identique face au stress appliqué.

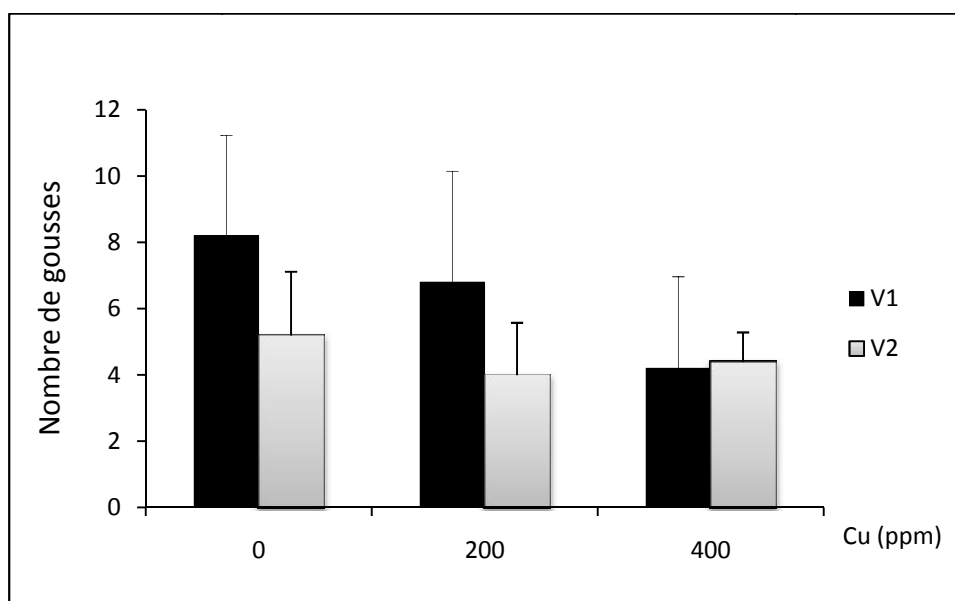
Les résultats moyens (Tab.33) montrent que l'application des doses croissantes de Cu dans le substrat de culture induit une diminution du nombre des gousses. La diminution enregistrée est très différente à travers les génotypes testés.

Chez le génotype Sidi Aïch, on enregistre pour le témoin un nombre évalué à 8,2. Pour les lots D1 et D2, les valeurs moyennes sont respectivement évaluées à 6,8 et 4,2 inscrivait des diminutions respectives par rapport au témoin de l'ordre de 17,07% et 48,78%.

Chez le génotype Super Aguadulce, les valeurs moyennes du nombre des gousses sont faibles par rapport à celles enregistrées par le premier génotype (Fig.38). De plus, on a signalé des régressions d'ordre 23,07% et 15,38% respectivement pour les traitements D1 et D2.

**Tableau n°33** : Nombre de gousses des deux géotypes de la fève exposés au cuivre (Application 2).

Géotype	Dose de Cu (ppm)	N G	Evolution %
Sidi Aïch <sup>A</sup>	0 <sup>A</sup>	8,2 ± 3,03	/
	200 <sup>AB</sup>	6,8 ± 3,35	-17,07
	400 <sup>B</sup>	4,2 ± 2,77	-48,78
Sup Aguadulce <sup>B</sup>	0 <sup>A</sup>	5,2 ± 1,92	/
	200 <sup>AB</sup>	4 ± 1,58	-23,07
	400 <sup>B</sup>	4,4 ± 0,89	-15,38

**Fig. 38** : l'évolution des moyennes (moyennes ± écart-type) de Nombre de gousses pour V1 (sidi Aïch) et V2 (Super Aguadulce) en fonction de la dose du cuivre (0, 200, 400 ppm).

### ➤ Discussion

Après avoir analysé les données qui concernent le nombre des gousses des deux géotypes de fèves cultivées dans des milieux pollués avec le cuivre. La réduction de la récolte qui a été enregistrée par les deux Géotypes se traduit par l'effet nocif de cuivre sur l'altération de la reproduction des plantes selon des mécanismes variés. Les résultats obtenus au cours de la première période du traitement montrent que seul le géotype Sup Aguadulce qui a été affecté par l'intensité du cuivre avec une diminution plus prononcée à concentration D2, estimée à 57,69%. Durant la deuxième période du traitement, la production des gousses a diminué chez les deux géotypes étudiés, la régression la plus marquée celle qui a enregistré au lot D2 chez le géotype Sidi Aïch (48,78%).

Par exemple, chez *Poa annua* et *Senecio vulgaris*, des expositions à des sols contaminés par le cuivre engendrent, non seulement des diminutions du nombre d'individus capables de produire des fleurs et des fruits, mais également des retards de floraison et de fructification chez les individus reproductifs (Brun *et al.*, 2003). La même étude a également révélé une baisse de la production de graines chez les individus exposés. Ryser et Sauder (2006) ont également observé des retards et inhibitions de la floraison chez *Hieracium piloselloïdes* poussant sur un sol riche en nickel et en cuivre. Ces auteurs notent en particulier un effet sur la formation des capitules floraux.

D'autres métaux semblent agir préférentiellement au niveau du pollen. Ainsi, des inhibitions de la germination et de la croissance du tube pollinique ont été observées chez *Vicia augustifolia*, *V. tetraspora* et *Plantago depressa* exposées au cadmium (Xiong et Peng, 2001) et chez le kiwi *Actinidia deliciosa* exposé au chrome (Speranza *et al.*, 2007). Par ailleurs, Mohanty *et al.* (2004) expliquent la forte proportion d'infertilité du pollen (64%) chez *Oryza sativa* exposé à l'aluminium par une fréquence élevée d'aberrations chromosomiques.

En sol contaminé, les plantes favorisent la reproduction végétative aux dépens de la reproduction sexuée (Vidic *et al.* 2006) et les individus produisent moins de graines et de plus petite taille (Brun *et al.* 2003).

#### 2.2.1.4. Hauteur de la tige

##### ➤ Application 1

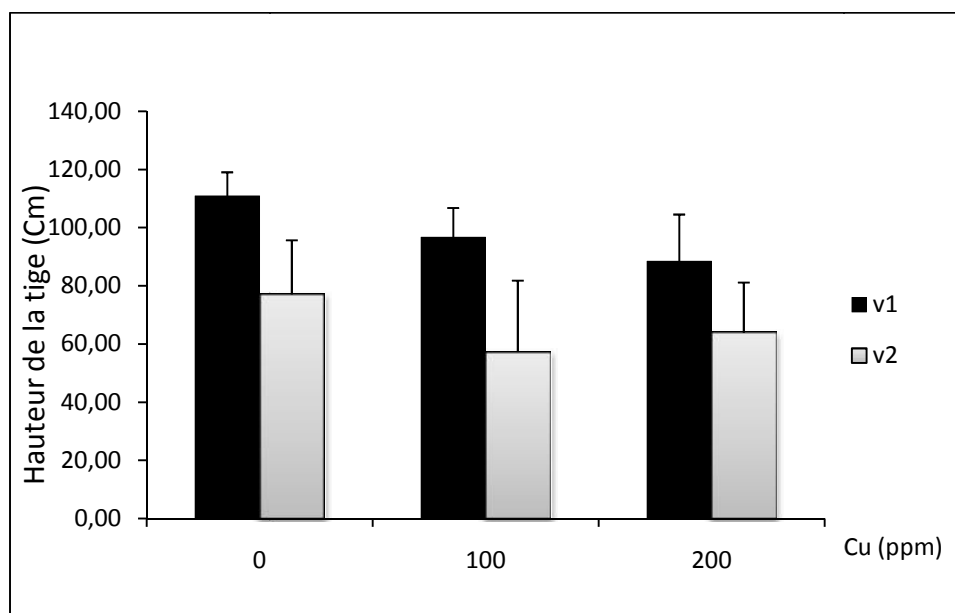
L'analyse des résultats obtenus (Tab.28), indique que la variation de hauteur des tiges est fortement conditionnée par l'application du cuivre ( $p < 0,05$ ). La nature des géotypes testés influe d'une manière très hautement significative sur l'élaboration de cette caractéristique ( $p < 0,005$ ). L'interaction des deux facteurs d'études n'indique aucun effet sur cette variation ( $p > 0,05$ ). Ceci explique que les deux géotypes testés, ont manifesté des comportements similaires en présence de la contrainte métallique.

Les résultats dégagés à partir de l'estimation de cette caractéristique montrent que l'application croissante de stress métallique entraîne une diminution de la hauteur des tiges des plantes (Tab.34). Chez le géotype Sidi Aïch, au niveau du traitement témoin, on signale 110,9cm, valeur supérieure à celles enregistrées au niveau D1 et D2, où ce paramètre affiche respectivement 96,70 cm et 88,50 cm présentant des régressions respectives de 12,80% et

20,19%. Chez le génotype Sup Aguadulce, dans les conditions optimales (témoin), les plantes affichent une valeur évaluée à 77,1cm. Au niveau du traitement D1, on a enregistré la plus faible hauteur estimée à 57,30cm. Cependant les plantes cultivées dans le traitement D2, affichent une valeur moyenne de 63,90cm. Sous l'intensité du cuivre, cet abaissement successif de la hauteur des tiges est d'ordre 34,55% (D1) et 17,12% (D2) par rapport au lot témoin.

**Tableau n°34:** Hauteur de la tige en cm des deux génotypes de la fève exposés au cuivre (Application 2)

Génotype	Dose de Cu (ppm)	H T (cm)	Evolution %
Sidi Aïch <sup>A</sup>	0 <sup>A</sup>	110,9 ± 8,17	
	100 <sup>A</sup>	96,70±10,12	-12,80
	200 <sup>A</sup>	88,50±16,02	-20,19
Sup Aguadulce <sup>B</sup>	0 <sup>A</sup>	77,1± 18,54	
	100 <sup>A</sup>	57,30±24,49	-34,55
	200 <sup>A</sup>	63,90±17,26	-17,12



**Fig. 39:** l'évolution des moyennes de la hauteur de tige (cm) pour V1 (sidi Aïch) et V2 (Super Aguadulce) en fonction de la dose du cuivre (0, 100, 200 ppm).

### ➤ Application 2

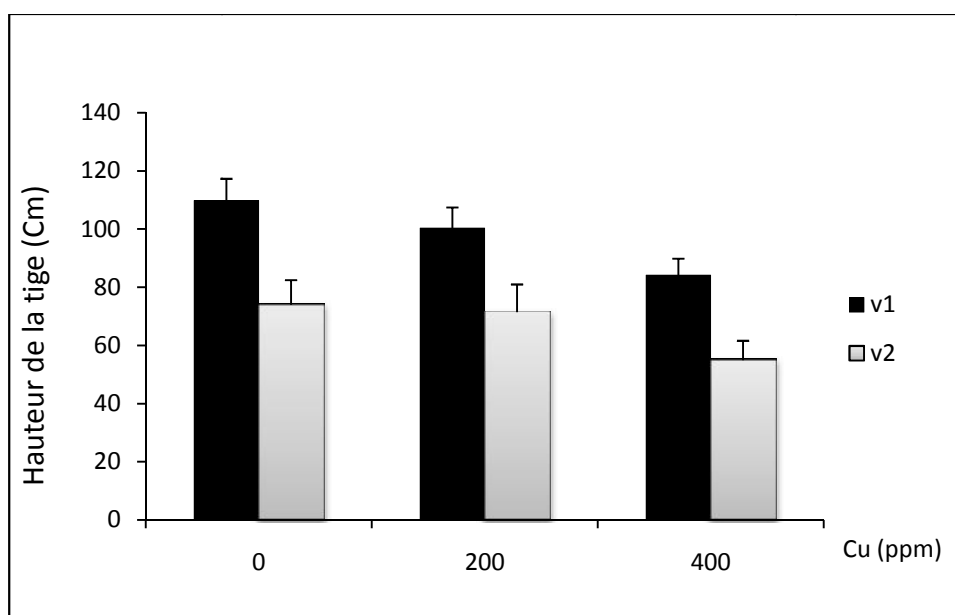
L'analyse des résultats (Tab.28) montre que la hauteur des tiges est significativement influencée par l'augmentation de la dose de Cu ( $p < 0.005$ ). L'accroissement de l'intensité du cuivre est accompagné d'une nette régression de la hauteur des tiges. Le facteur génotypique

affecte également ces variations d'une manière très hautement significative ( $p < 0.005$ ). L'interaction entre deux facteurs d'étude (dose de cuivre \* génotype) n'a aucun effet sur les variations de ce paramètre ( $p > 0,05$ ). Ce qui indique que les deux génotypes se sont comportés d'une manière identique vis-à-vis de l'application de ce stress.

Les résultats obtenus à la suite de l'estimation de cette dernière (Tab.35) montre que la valeur la plus élevée de la hauteur de la tige est enregistrée au niveau du traitement témoin, elle est évaluée à 109,90 cm pour le génotype Sidi Aïch, et 74,02 pour le génotype Sup Aguadulce. Une dominance de la hauteur des tiges a été constatée par le génotype Sidi Aïch (Fig.40). Ces valeurs ont diminué d'une façon plus importante au niveau de traitements D2 chez les deux génotypes testés, ce paramètre atteint respectivement 84,20 et 59,9cm et présentant des régressions de 23,38% et 45,49% par rapport au lot témoin.

**Tableau n°35** : Hauteur de la tige en Cm des deux Génotypes de la fève exposés au cuivre (Application 2).

Génotype	Dose de Cu (ppm)	H T (cm)	Evolution %
Sidi Aïch <sup>A</sup>	0	109.90 ± 7.40	/
	200	100.42 ± 7.04	-8,62
	400	84.20 ± 5.62	-23,38
Sup Aguadulce <sup>B</sup>	0	74.02 ± 8.47	/
	200	71.50 ± 9.49	-3,40
	400	59,9 ± 6.60	-45,49



**Fig. 40** : l'évolution des moyennes de la hauteur de tige (cm) pour V1 (sidi Aïch) et V2 (Super Aguadulce) en fonction de la dose du cuivre (0, 200, 400 ppm).

## 2.2.2. Effet du cuivre sur la partie sous terrain de la fève

### 2.2.2.1. Volume racinaire

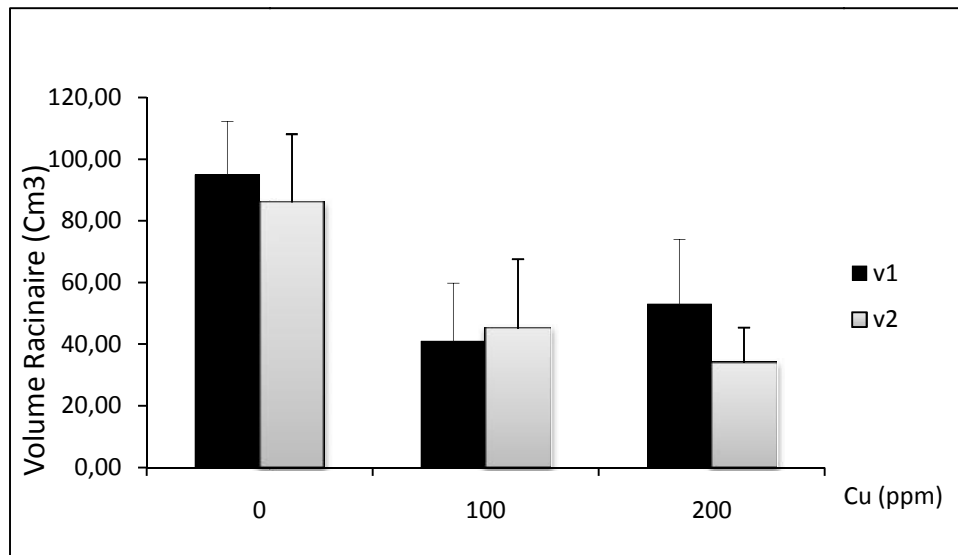
#### ➤ Application 1

L'analyse des résultats obtenus (Tab.28) démontre que les variations des niveaux des volumes racinaires sont grandement conditionnées par la contrainte métallique ( $p < 0,005$ ). Sous les mêmes conditions, la nature des génotypes expérimentés n'exerce aucune effet sur cette variation ( $P > 0,05$ ). L'interaction de la variabilité génotypique conduite et la contrainte métallique, semblent provoquer de faibles variations dans l'expression de cette caractéristique ( $P > 0,05$ ). Ceci indique que les deux génotypes testés, ont manifesté des comportements similaires en présence de la contrainte métallique.

Les résultats obtenus (Tab.36), démontre que la pollution induit par le cuivre provoque une nette diminution du volume racinaire et que cette diminution est plus prononcée au niveau du lot D2. Ainsi que l'évolution de ce paramètre varie selon le génotype étudié (Fig.41). En effet, dans le traitement témoin, le volume moyen de la racine est de 95ml chez le génotype sidi Aïch et 86ml chez le génotype super Aguadulce. L'application du stress métallique provoque une régression de ce paramètre par rapport au témoin. On signale chez le génotype Sidi Aïch une diminution de l'ordre de 56,84% à concentration D1 et 44,21% à concentration D2, alors que chez le génotype super Aguadulce ces régressions s'estiment respectivement à 47,67% et 60,46%, au niveau des traitements, D1 et D2.

**Tableau n°36** : Volume racinaire en ml des deux génotypes de la fève exposés au cuivre (Application 1).

Génotype	Dose de Cu (ppm)	V R (ml)	Evolution %
Sidi Aïch	0 <sup>A</sup>	95 ± 17,32	
	100 <sup>B</sup>	41,00±18,84	-56,84
	200 <sup>B</sup>	53,00±21,10	-44,21
Sup Aguadulce	0 <sup>A</sup>	86 ± 22,19	
	100 <sup>B</sup>	45,00±22,64	-47,67
	200 <sup>B</sup>	34,00±11,40	-60,46



**Fig. 41:** l'évolution des moyennes de volume racinaire (ml) pour V1 (sidi Aïch) et V2 (Super Aguadulce) en fonction de la dose du cuivre (0, 100, 200 ppm).

### ➤ Application 2

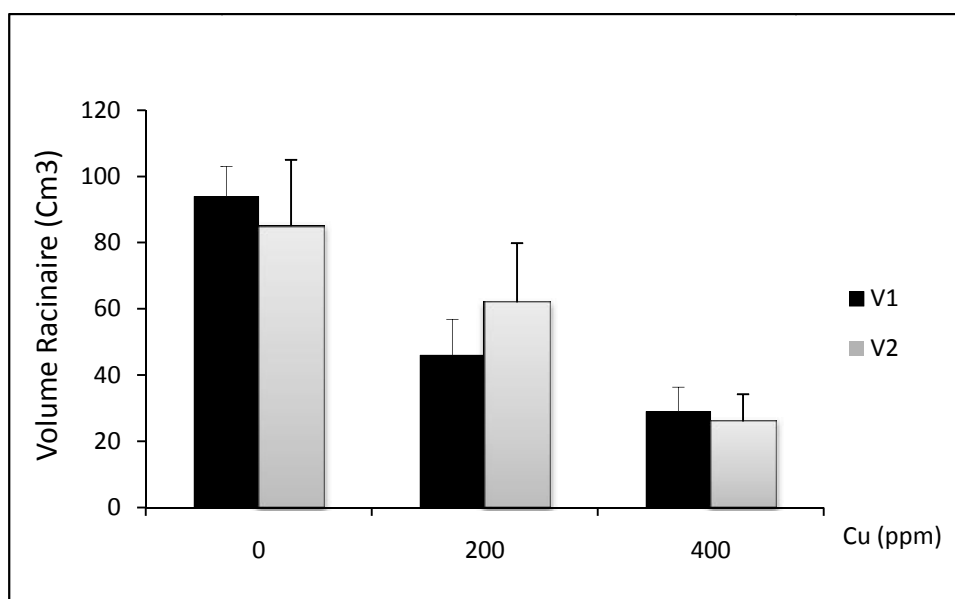
L'analyse des résultats obtenus (Tab.28) indique que l'application du cuivre à différentes concentrations provoque une nette vacillation entre les niveaux des volumes racinaires mesurés ( $p < 0,005$ ). Sous les mêmes conditions, les variations de cette caractéristique s'opèrent d'une manière indépendante de la nature des génotypes conduits ( $p > 0,05$ ). L'interaction des deux facteurs d'étude ne provoquent aucune modification notable ( $p > 0,05$ ) dans l'élaboration de ce volume. Cette observation indique que les deux génotypes testés ont manifesté des comportements similaires en présence de la contrainte métallique.

Les résultats mentionnés (Tab.37) indiquent que le volume racinaire diminue d'une façon importante avec l'augmentation des doses appliquées. Chez le génotype Sidi Aïch, les plants du lot témoin, enregistrent la valeur la plus élevée estimée à  $94 \text{ cm}^3$ . L'application du cuivre à une dose D1, permet une régression du volume à un taux de 51,06%, et elle le sera d'une valeur de 69,15% chez les plants issus du traitement D2.

Les mêmes variations des volumes racinaires ont été observées pour le génotype Sup Aguadulce. Ainsi, dans le lot témoin, la valeur moyenne relevée s'évalue à  $85 \text{ cm}^3$ . Au niveau des traitements, D1 et D2, ce paramètre décroît par rapport au lot témoin, on signale respectivement  $62 \text{ cm}^3$  et  $26 \text{ cm}^3$ , exprimant des régressions respectives de l'ordre de 27,05% et 69,41%.

**Tableau n°37** : Volume racinaire en ml des deux génotypes de la fève exposés au cuivre (Application 2).

Génotype	Dose de Cu (ppm)	V R (ml)	Evolution %
Sidi Aïch	0 <sup>A</sup>	94 ± 8,94	/
	200 <sup>B</sup>	46 ± 10,84	-51,06
	400 <sup>C</sup>	29 ± 7,42	-69,15
Sup Aguadulce	0 <sup>A</sup>	85 ± 20	/
	200 <sup>B</sup>	62 ± 17,89	-27,05
	400 <sup>C</sup>	26 ± 8,22	-69,41



**Fig. 42:** l'évolution des moyennes de volume racinaire (ml) pour V1 (sidi Aïch) et V2 (Super Aguadulce) en fonction de la dose du cuivre (0, 200, 400 ppm).

### 2.2.2.2. Longueur racinaire

#### ➤ Application 1

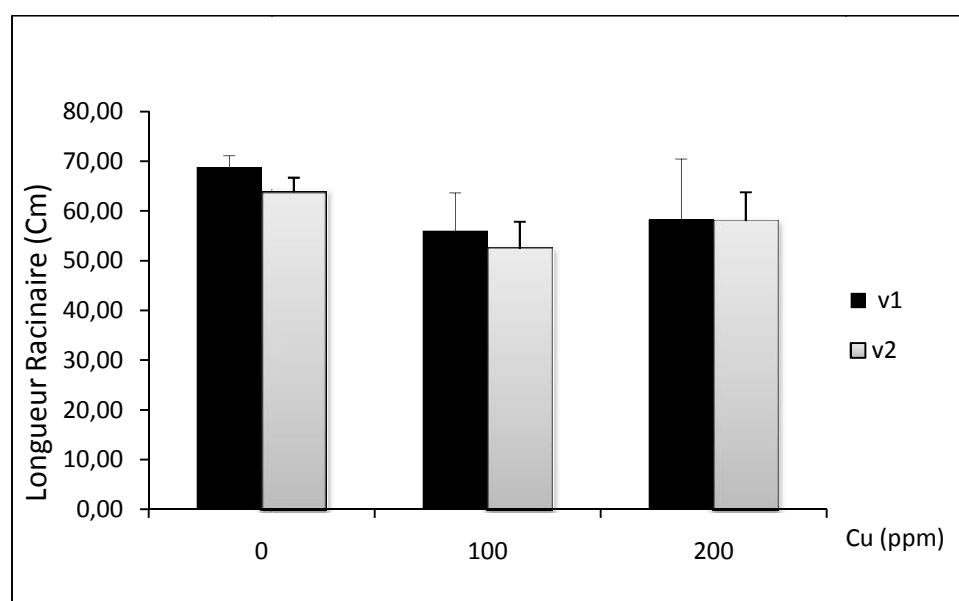
L'analyse des résultats obtenus (Tab.28) démontre que les variations de la longueur racinaire, sont grandement conditionnées par la variation des niveaux de stress métallique ( $P < 0.01$ ). La nature des génotypes expérimentés n'exerce aucune effet significatif sur la variation de la longueur racinaire ( $p > 0,05$ ). L'action combinée entre les facteurs d'étude n'influe également, que faiblement sur cette variation ( $p > 0,05$ ). Cette constatation indique que les génotypes testés ont manifesté des comportements presque identiques sous l'effet du cuivre.

Les résultats moyens illustrés dans le tableau n°38, indique que la profondeur d'enracinement est nettement diminuée dans les conditions du stress (Fig.43). Chez le génotype Sidi Aïch, on constate une réduction de 18,6% chez les plants du traitement D1, par rapport au témoin. A l'échelle du traitement D2, cette diminution est de l'ordre de 15,4%. Ces deux proportions présentent respectivement deux longueurs évaluées à 56 cm et 58,20 cm.

Chez le génotype Sup Aguadulce, la longueur moyenne la plus élevée est enregistrée par les plants témoins (63,80cm). L'application du traitement métallique s'accompagne d'un abaissement des longueurs racinaires, et ce au niveau des deux lots, D1 et D2, où ce paramètre enregistre respectivement 52,40cm et 58cm exprimant des diminutions de grandeurs respectives, par rapport au témoin, de 17,86% et 9,06%.

**Tableau n°38** : Longueur racinaire en cm des deux génotypes de la fève exposés au cuivre (Application 1).

Génotype	Dose de Cu (ppm)	L R (cm)	Evolution %
Sidi Aïch	0 <sup>A</sup>	68,80 ± 2,39	/
	100 <sup>B</sup>	56,00±7,71	-18,6
	200 <sup>B</sup>	58,20±12,30	-15,4
Sup Aguadulce	0 <sup>A</sup>	63,80 ± 2,95	/
	100 <sup>B</sup>	52,40±5,50	-17,86
	200 <sup>B</sup>	58,00±5,83	-9,09



**Fig. 43** : l'évolution des moyennes de la longueur racinaire (cm) pour V1 (sidi Aïch) et V2 (Super Aguadulce) en fonction de la dose du cuivre (0, 100, 200 ppm).

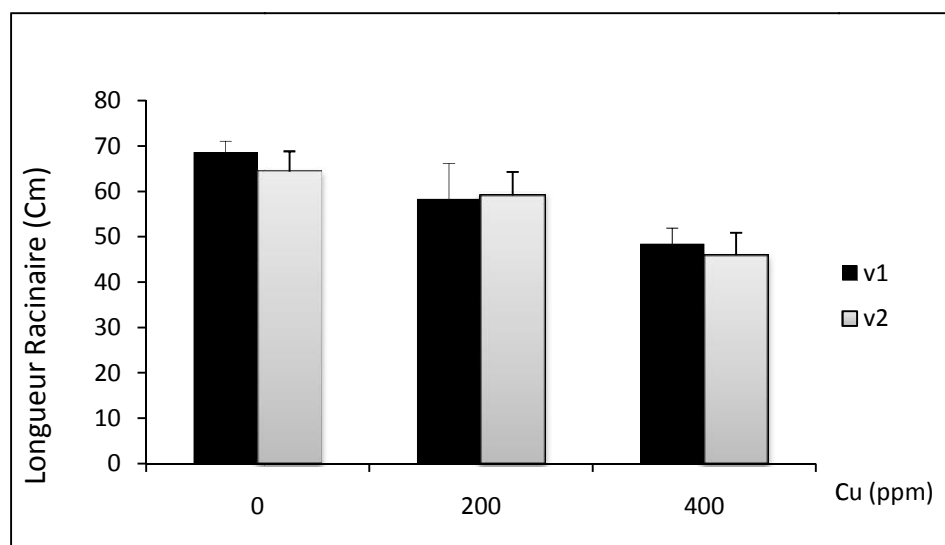
➤ **Application 2**

L'analyse des résultats obtenus (Tab.28), indique que les variations des longueurs racinaires sont très hautement influencées par les différentes applications du cuivre ( $p < 0,005$ ). Ceci indique que ce facteur constitue une source de variation sur ce paramètre. La variabilité génotypique ne manifeste aucun effet sur cette variation ( $p > 0,05$ ). L'interaction des deux facteurs d'étude n'exerce aucune variation notable ( $p > 0,05$ ) sur l'expression de cette caractéristique. Ceci indique que les deux génotypes testés, ont manifesté des comportements presque similaires en présence de la contrainte métallique.

Les résultats moyens illustrés dans tableau n°39, montrent que l'application croissante de cuivre s'accompagne d'une réduction de l'élongation des racines formées (Fig.44). D'une manière générale, c'est au niveau du lot témoin que les valeurs des longueurs racinaires sont les plus élevées. Ainsi, on note chez le génotype Sidi Aïch, une valeur moyenne estimée à 68,6 cm, alors que le génotype Sup Aguadulce, la longueur moyenne est de l'ordre de 64,4cm. Sous le traitement métallique, les longueurs des racines chez le génotype Sidi Aïch diminuent progressivement pour atteindre 58,3cm et 48,4cm respectivement dans les traitements D1 et D2. Les mêmes tendances sont constatées chez le génotype Sup Aguadulce où on relève des longueurs moyennes de 59,18 (D1) et 46 cm (D2).

**Tableau n°39** : Longueur racinaire en cm des deux génotypes de la fève exposés au cuivre (Application 2).

Génotype	Dose de Cu (ppm)	L R (cm)	Evolution %
Sidi Aïch	0 <sup>A</sup>	68,6 ± 2,53	/
	200 <sup>B</sup>	58,3 ± 7,90	-15,01
	400 <sup>C</sup>	48,4 ± 3,56	-29,44
Sup Aguadulce	0 <sup>A</sup>	64,4 ± 4,51	/
	200 <sup>B</sup>	59,18 ± 5,20	-8,10
	400 <sup>C</sup>	46 ± 4,96	-28,57



**Fig. 44 :** l'évolution des moyennes (moyennes  $\pm$  écart-type) de la longueur racinaire (cm) pour V1 (sidi Aïch) et V2 (Super Aguadulce) en fonction de la dose du cuivre (0, 200, 400 ppm)

#### ➤ Discussion

La réduction de la longueur et volume racinaire chez les deux Génotypes, occasionnée par le cuivre, dépend étroitement des doses appliquées. En effet le Cu a des effets dépressifs sur la croissance et le développement, racinaires de plusieurs espèces, comme il a été démontré chez le *Vigna unguiculata* L (Kopittke et Menzies 2006, Kopittke *et al.*, 2007a, b, 2008), *Triticum aestivum* L cultivé en hydroponie (Kinraide *et al.*, 2004) et pour la longueur racinaire de *Kummerowia stipulacea* (Zhi-Ting *et al.*, 2007).

Chez des plantes cultivées en milieu contaminé en Cu, on observe des inhibitions de la croissance racinaire, des malformations des racines, une diminution de l'élongation racinaire (Cook *et al.* 1997, Brun *et al.* 2003, Inaba et Takenaka 2005). L'accumulation des métaux au niveau de la masse racinaire est favorable à l'apparition de phénomènes de rhizotoxicité qui se traduisent par une coloration brunâtre et un épaissement des racines, une diminution de l'élongation racinaire ainsi qu'une augmentation de leur ramification (Lexmond et van der Vorm 1981 ; Panou-Filotheou et Bosabadilis 2004 ; Kopittke et Menzies 2006, Kopittke *et al.* 2007a, b). Ces symptômes sont principalement attribués à la rigidité des parois cellulaires par l'adsorption massive des métaux qui prennent la place de Ca dans l'apoplasme, en particulier au niveau de la zone d'élongation. Cette rigidité de l'apoplasme freine l'élongation racinaire et peut provoquer des ruptures au niveau des cellules du rhizoderme et du cortex externe qui seraient dues à des vitesses de croissance différentes entre les cellules des cortex internes et externes (Kopittke *et al.*, 2008).

## 2.3. Effet du cuivre sur l'anatomie de la tige

### 2.3.1. Le nombre des faisceaux cribro-vasculaires.

#### ➤ Application 1

L'étude des résultats obtenus (Tab.40), montre que le nombre des faisceaux cribro-vasculaires dépend faiblement à la variation des concentrations du cuivre ( $p > 0,05$ ). La nature du génotype testée n'exerce aucun effet significatif sur la variation des niveaux de ce paramètre ( $p > 0,05$ ). La même observation a été signalée pour l'interaction des deux facteurs d'étude ( $p > 0,05$ ). Ceci indique que les deux génotypes testés ont manifesté des comportements identiques sous l'effet du cuivre.

**Tableau n°40** : probabilité «  $p$  » de l'analyse de la variance des paramètres anatomiques des deux génotypes étudiés.

Variables	Application 1			Application 2		
	Dose de Cu (F1)	Génotype (F2)	Interaction (F1xF2)	Dose de Cu (F1)	Génotype (F2)	Interaction (F1xF2)
nombre des faisceaux cribro-vasculaires	0,3403ns	0,2523 ns	0,5360 ns	0,9735ns	0,5346 ns	0,7137 ns
Distance entre les faisceaux cribro-vasculaires	0,2605ns	0,2077 ns	0,1288ns	0,6990ns	0,0024***	0,2641 ns
Diamètre du métaxylème	0,0868ns	0,0133*	0,3019	0,0029***	0,9621 ns	0,3464 ns
Epaisseur de la paroi externe	0,5073ns	0,0783 ns	0,0602 ns	0,5381ns	0,1947 ns	0,0724 ns

\*variation significative

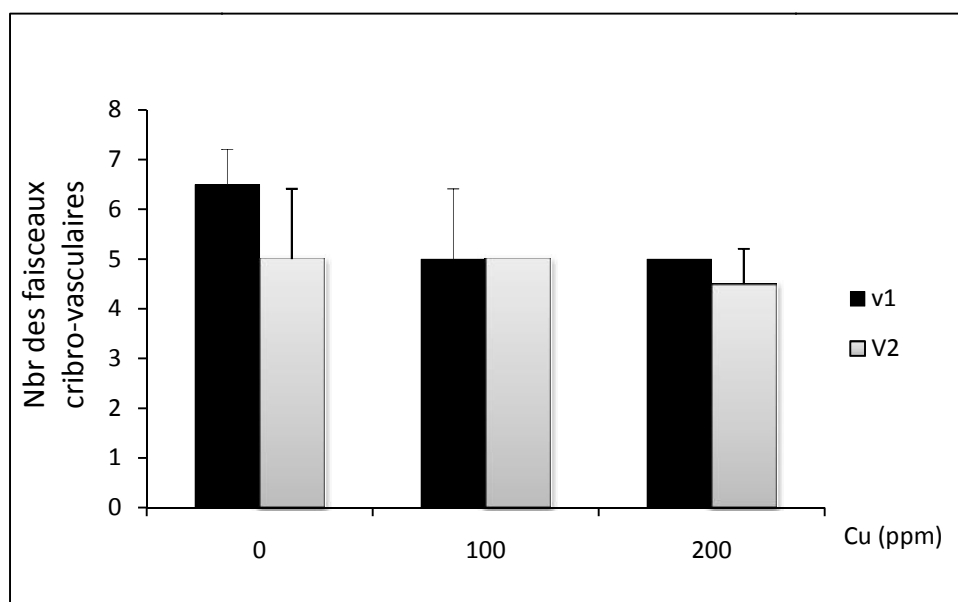
\*\*variation hautement significative

Les résultats moyens (Tab.41), montre que l'application de cuivre à des concentrations croissantes n'affecte que faiblement le nombre des faisceaux cribro-vasculaires chez deux génotypes testés (Fig.45).

Chez le génotype Sidi Aïch, les deux valeurs moyennes enregistrées dans les lots D1 et D2 sont égales à 5, et présentant des régressions respectives de l'ordre de 23,07% par rapport à celle du lot témoin. Chez le génotype Sup Aguadulce, on enregistre des valeurs égales chez les plantes issues des traitements témoin et D1(5). L'application d'une concentration D2 de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  entraîne une légère diminution de cet élément, évaluée à 4.5, représentant une évolution de -10% par rapport à celle du lot témoin.

**Tableau n°41 :** Nombre des faisceaux cribro-vasculaires des deux géotypes de la fève exposés au cuivre (Application 1).

Géotype	Dose de Cu (ppm)	Nombre des faisceaux cribrovasculaires	Evolution %
Sidi Aïch	0	6,5	/
	100	5	-23,07
	200	5	-23,07
Sup Aguadulce	0	5	/
	100	5	0
	200	4,5	-10



**Fig. 45 :** l'évolution des moyennes du nombre des faisceaux cribro-vasculaire pour V1 (sidi Aïch) et V2 (Super Aguadulce) en fonction de la dose du cuivre (0, 100, 200 ppm).

### ➤ Application 2

L'analyse des résultats (Tab.40) montre que l'élaboration de ce paramètre, n'est que faiblement influencée par les différents facteurs d'étude. L'application du cuivre, la nature des géotypes testés et leur interaction, ne permettent que de faibles variations des nombres relevés ( $p > 0.05$ ).

Les résultats moyens obtenus à travers l'estimation de nombre des faisceaux cribro-vasculaires (Tab.42), montrent que les variations manifestées sur ce paramètre, sont d'ordres différents à travers les deux géotypes testés (Fig.46).

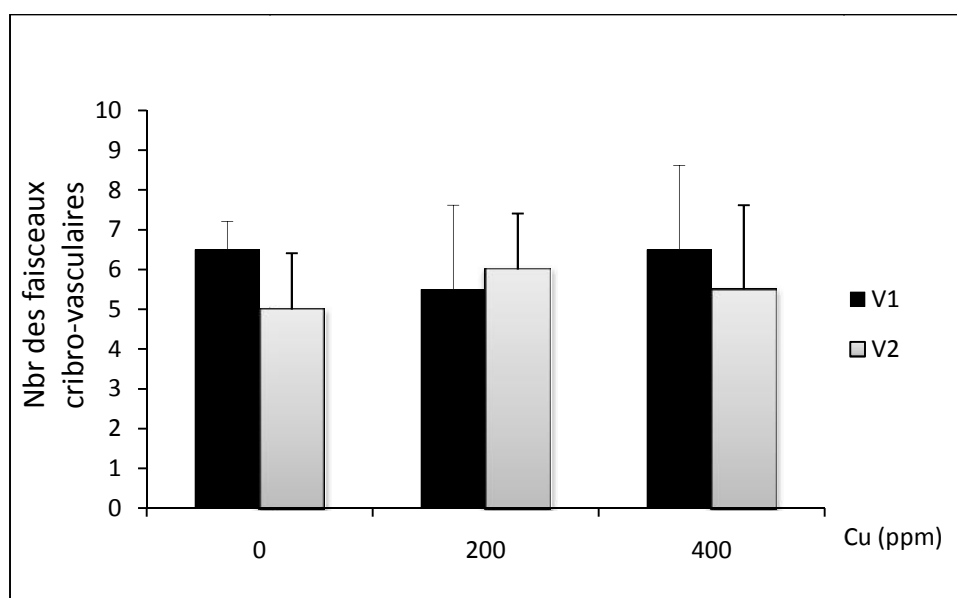
Chez le géotype Sidi Aïch, le nombre des faisceaux cribro-vasculaires enregistrés chez les plantes issues des traitements témoin et au lot D2 sont égales (6,5). Par contre

l'application du cuivre à concentration D1 induit une diminution de ce paramètre par rapport au témoin, estimée à 15,38%.

Chez le génotype Sup Aguadulce, le témoin enregistre une valeur moyenne de 5 faisceaux. Les traitements D1 et D2 inscrivent des augmentations qui atteignent respectivement, 6 et 5,5 faisceaux évaluant des progressions de l'ordre de 20% et 10% %.

**Tableau n°42 :** Nombre des faisceaux cribro-vasculaires des deux génotypes de la fève exposés au cuivre (Application 2).

Génotype	Dose de Cu (ppm)	Nombre des faisceaux cribrovasculaires	Evolution %
Sidi Aïch	0	6,5	/
	100	5,5	-15,38
	200	6,5	0
Sup Aguadulce	0	5	/
	100	6	20
	200	5,5	10



**Fig. 46 :** l'évolution des moyennes du nombre des faisceaux cribro-vasculaire pour V1 (sidi Aïch) et V2 (Super Aguadulce) en fonction de la dose du cuivre (0, 200, 400 ppm).

### 2.3.2. Distance entre les faisceaux cribro-vasculaires

#### ➤ Application 1

Au cours de cette phase d'application du stress, l'analyse des résultats obtenus des mesures du distance entre les faisceaux cribro-vasculaires (Tab.40) montre que l'élaboration de cette caractéristique n'est que faiblement influencée par les facteurs d'étude, l'application du cuivre ( $p > 0.05$ ), la nature du génotype ( $p > 0.05$ ) ainsi que de leur interaction ( $p > 0.05$ ).

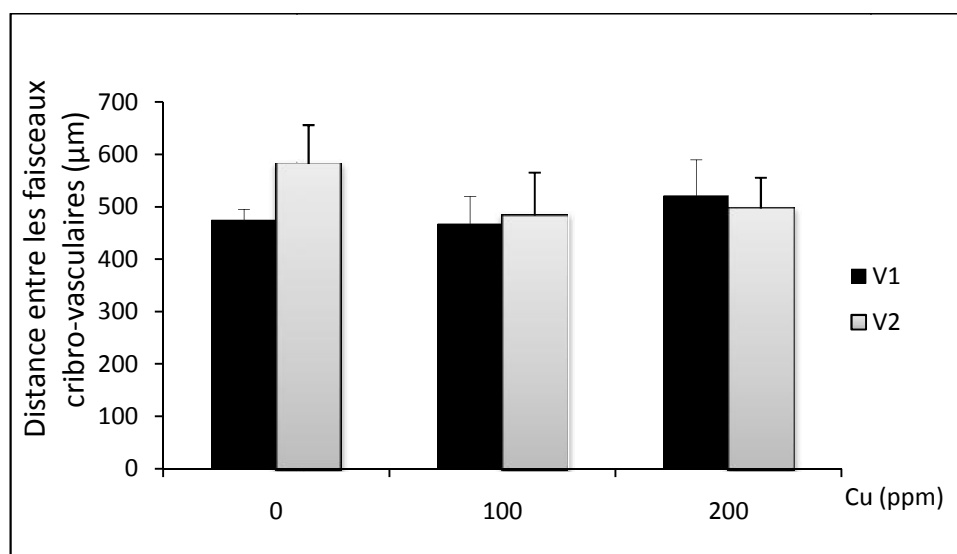
Les résultats moyens (Tab.43) montrent une nette variation des distances mesurées entre les faisceaux cribro-vasculaires pour les deux génotypes étudiés.

Chez le génotype Sidi Aïch, le témoin affiche une valeur moyenne estimée à 474,85 $\mu$ m. Pour le traitement D1, la moyenne enregistrée inscrit une légère diminution de 467,18  $\mu$ m inscrivant une régression par rapport au témoin de 1,61%. Le traitement D2 enregistre une augmentation de 520,98  $\mu$ m avec un accroissement de l'ordre de 9,71%.

Chez le génotype Sup Aguadulce, l'application croissante de cuivre entraîne une nette régression de la distance entre les faisceaux cribro-vasculaires (Fig.47). Pour le lot témoin, on signale une valeur moyenne de 582,02  $\mu$ m. Les traitements D1 et D2 inscrivent dans un ordre respectif 484,02 et 496,96  $\mu$ m évaluant des régressions par rapport au témoin de l'ordre de 16,83% et 14,61%.

**Tableau n°43 :** Distance entre les faisceaux cribro-vasculaires ( $\mu$ m) des deux génotypes de la fève exposés au cuivre (Application 1).

Génotype	Dose de Cu (ppm)	distance entre les faisceaux cribrovasculaires	Evolution %
Sidi Aïch	0	474,85 $\pm$ 20,37	/
	100	467,18 $\pm$ 52,38	-1,61
	200	520,98 $\pm$ 69,25	9,71
Sup Aguadulce	0	582,02 $\pm$ 74,46	/
	100	484,02 $\pm$ 81,66	-16,83
	200	496,96 $\pm$ 59,08	-14,61



**Fig. 47:** l'évolution des moyennes de la distance entre les faisceaux cribro-vasculaire ( $\mu$ m) pour V1 (sidi Aïch) et V2 (Super Aguadulce) en fonction de la dose du cuivre (0, 100, 200 ppm).

➤ **Application 2**

L'analyse des données obtenues (Tab.40), montre que l'expression de cet élément est faiblement conditionné par le cuivre ( $p>0,05$ ). Le facteur génotype influe d'une manière hautement significative sur la variation de ce paramètre ( $p<0,005$ ). L'interaction des deux facteurs d'étude n'exerce aucune effet significative sur cette variation ( $p>0,05$ ). Cela indique que les deux génotypes testés présentent des comportements similaires face au stress.

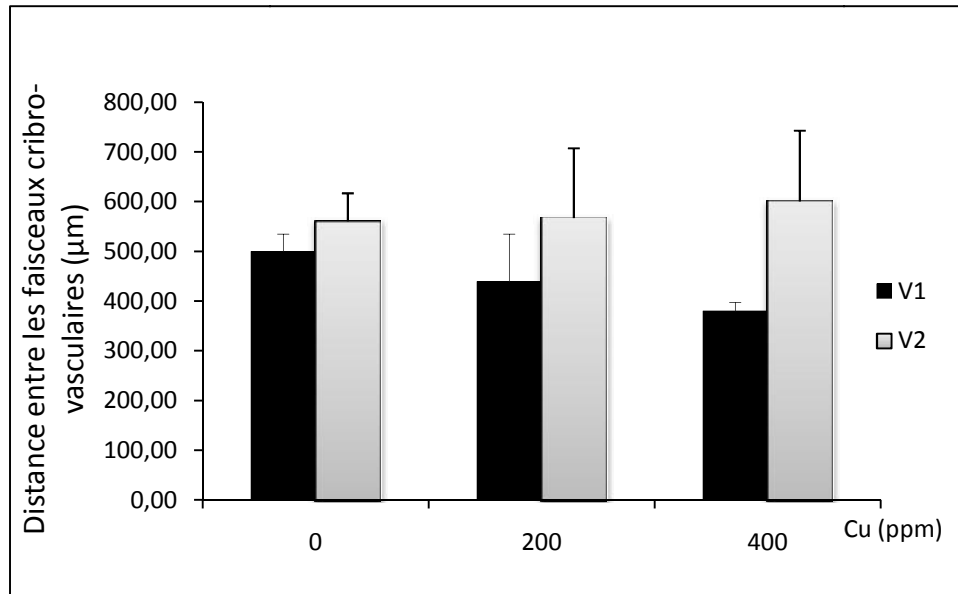
Les résultats moyens mentionnés (Tab.44), montrent qu'une divergence comportementale très prononcée est constatée à travers les deux génotypes testés.

Chez le génotype Sidi Aïch, les plants témoins enregistrent une valeur moyenne de 500,02  $\mu\text{m}$ . Cependant, pour ceux issus des traitements D1 et D2, les valeurs respectives de la distance entre les faisceaux cribro-vasculaires sont de l'ordre de 439,01  $\mu\text{m}$  et 380,17  $\mu\text{m}$ , manifestant des régressions de l'ordre de 10,20% et 23,96%.

Chez le génotype Super Aguadulce, les valeurs des moyennes de la distance entre les faisceaux cribro-vasculaires sont plus importantes que celles pour le premier génotype (Fig.48). Pour le lot témoin, on signale une valeur moyenne de 561,07  $\mu\text{m}$ . Les traitements D1 et D2 inscrivent dans un ordre respectif 567,65 et 600,96  $\mu\text{m}$  évaluant des progressions par rapport au témoin de l'ordre de 1,17% et 7,11%.

**Tableau n°44** : Distance entre les faisceaux cribro-vasculaires ( $\mu\text{m}$ ) des deux génotypes de la fève exposés au cuivre (Application 2).

Génotype	Dose de Cu (ppm)	distance entre les faisceaux cribrovasculaires	Evolution %
Sidi Aïch <sup>B</sup>	0	500,02±35,26	
	100	439,01±96,22	-12,20
	200	380,17±17,42	-23,96
Sup Aguadulce <sup>A</sup>	0	561,07±56,24	
	100	567,65±139,96	1,17
	200	600,96±142,46	7,11



**Fig. 48 :** l'évolution des moyennes de la distance entre les faisceaux cribro-vasculaire ( $\mu\text{m}$ ) pour V1 (sidi Aïch) et V2 (Super Aguadulce) en fonction de la dose du cuivre (0, 200, 400 ppm)

### 2.3.3. Diamètre du métaxylème

#### ➤ Application 1

L'analyse de la variance (Tab.40) montre que la variation du diamètre des métaxylèmes n'est pas très affectée par l'ampleur de la pollution en cuivre. Ainsi, le facteur dose de cuivre n'exerce aucun effet significatif ( $p > 0.05$ ) sur la variation de ce paramètre. A l'opposé, le facteur génotypique influe d'une manière significative ( $p < 0.005$ ) sur les variations de ce paramètre. L'interaction entre les deux facteurs d'étude a un effet non significatif ( $p > 0.05$ ).

Les résultats moyens (Tab.52), inscrivent, une tendance à la régression des valeurs du diamètre des vaisseaux ligneux, accompagnant l'application des différentes concentrations du cuivre.

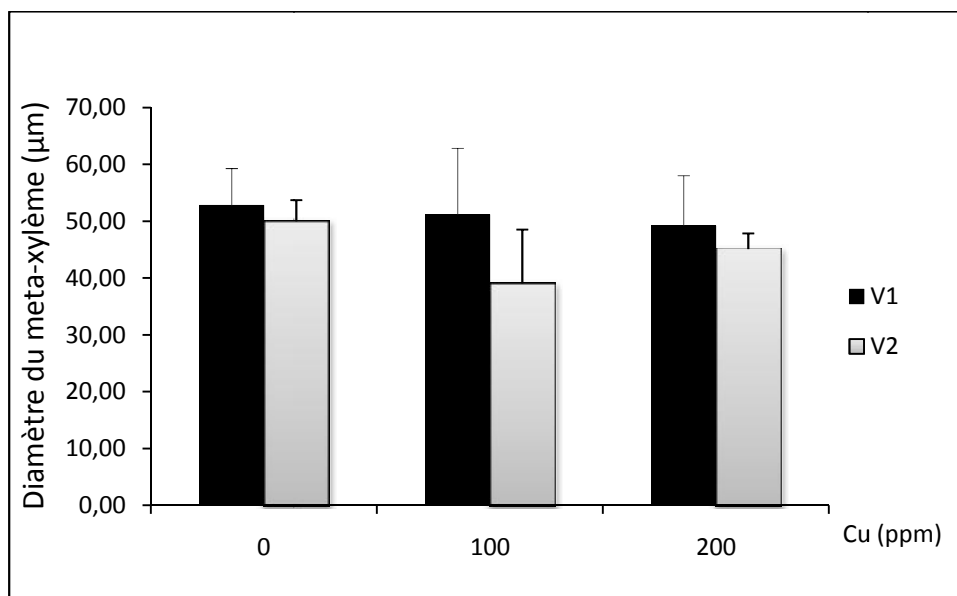
Ainsi, chez le génotype Sidi Aïch, pour le lot témoin, on enregistre une valeur moyenne de  $52,81\mu\text{m}$ . Pour les lots D1 et D2, les valeurs relevées sont respectivement de l'ordre de  $51,18$  et  $49,23\mu\text{m}$ , évaluant ainsi des diminutions de l'ordre de  $3,08\%$  et  $6,78\%$ .

Chez le génotype Super Aguadulce, les valeurs moyennes du diamètre enregistrées sont plus faibles que celles enregistrées par le premier génotype (Fig.49). Pour le témoin, on enregistre une valeur moyenne de  $50,06\mu\text{m}$ . Pour les traitements D1 et D2, ces données sont estimées

dans l'ordre, à 39,14 et 45,13 $\mu\text{m}$  évaluant des régressions par rapport au témoin de l'ordre de 21,81% et 9,84%.

**Tableau n°45** : Diamètre du méta-xylème ( $\mu\text{m}$ ) des deux génotypes de la fève exposés au cuivre (Application 1).

Génotype	Dose de Cu (ppm)	diamètre méta-xylème	Evolution %
Sidi Aïch <sup>A</sup>	0	52,81 $\pm$ 6,50	
	100	51,18 $\pm$ 11,71	-3,08
	200	49,23 $\pm$ 8,80	-6,78
Sup Aguadulce <sup>B</sup>	0	50,06 $\pm$ 3,72	
	100	39,14 $\pm$ 9,44	-21,81
	200	45,13 $\pm$ 2,78	-9,84



**Fig. 49** : l'évolution des moyennes du diamètre du méta-xylème ( $\mu\text{m}$ ) pour V1 (sidi Aïch) et V2 (Super Aguadulce) en fonction de la dose du cuivre (0, 100, 200 ppm).

### ➤ Application 2

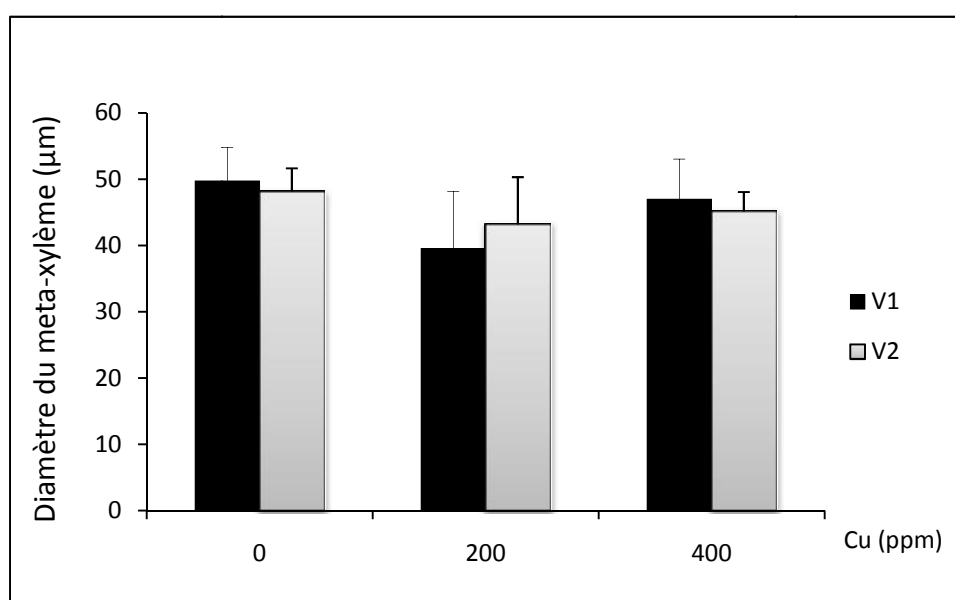
L'étude des résultats obtenus (Tab.40), montre que l'élaboration du diamètre du métaxylème est significativement influencée par l'application du cuivre ( $p < 0,005$ ). En effet, l'accroissement de la concentration du cuivre appliqué provoque une réduction de diamètre de métaxylème. La variabilité conduite n'exerce aucun effet significatif sur les variations d'expression de ce paramètre ( $p > 0,05$ ). Ainsi que pour l'interaction des deux facteurs d'étude ( $p > 0,05$ ).

Les résultats moyens présentés dans le tableau n°46, montrent que l'application des doses croissantes de Cuivre provoque une diminution du diamètre des métaxylèmes. La grandeur de cette diminution est d'une ampleur différente à travers les deux génotypes testés.

Chez le génotype Sidi Aïch, le témoin enregistre un diamètre moyen évalué à 49,74µm. Pour les lots D1 et D2, on enregistre respectivement 39,58 et 46,98 µm, inscrivant ainsi des diminutions de l'ordre de 20,42% et 5,55%. La même tendance d'évolution a été signalée chez le génotype Sup Aguadulce (Fig.50). Ainsi le lot témoin inscrit une valeur moyenne de 48,21 µm. Dans les traitements D1 et D2, les diamètres des métaxylèmes sont évalués respectivement à 43,20 et 45,13 µm, représentant des évolutions régressives de l'ordre de 10,39% et 6,38%.

**Tableau n°46 :** Diamètre du méta-xylème (µm) des deux génotypes de la fève exposés au cuivre (Application 2).

Génotype	Dose de Cu (ppm)	diamètre méta-xylème	Evolution %
Sidi Aïch	0 <sup>A</sup>	49,74 ± 5,04	/
	100 <sup>B</sup>	39,58 ± 8,59	-20,42
	200 <sup>A</sup>	46,98 ± 6,07	-5,55
Sup Aguadulce	0 <sup>A</sup>	48,21 ± 3,47	/
	100 <sup>B</sup>	43,20 ± 7,13	-10,39
	200 <sup>A</sup>	45,13 ± 2,97	-6,38



**Fig. 50 :** l'évolution des moyennes du diamètre du méta-xylème (µm) pour V1 (sidi Aïch)et V2 (Super Aguadulce) en fonction de la dose du cuivre (0, 200, 400 ppm)

### 2.3.4. Epaisseur de la paroi externe des cellules épidermiques

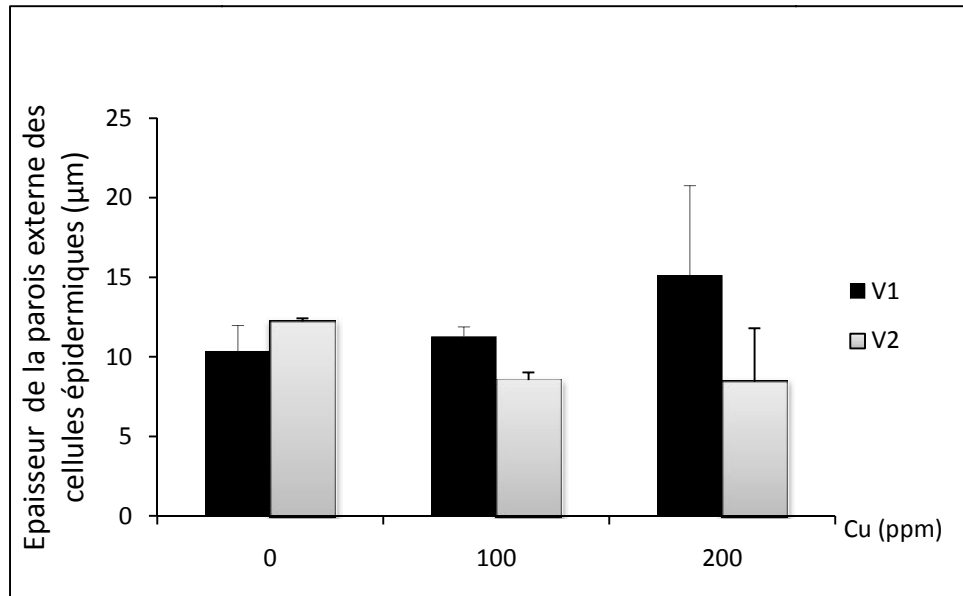
#### ➤ Application 1

L'étude des résultats obtenus (Tab.40), montre que l'élaboration de l'épaisseur de la paroi externe des cellules épidermiques est faiblement influencée par l'application du cuivre ( $p>0,05$ ). Egalement, la nature du génotype testé et l'interaction des deux facteurs d'étude n'exercent aucune effet significative sur cette variation ( $p>0,05$ ). Ceci explique les comportements identiques des deux génotypes testés, en réaction au stress métallique appliqué.

Les résultats obtenus (Tab.47) montrent que l'augmentation des doses de Cu appliquées provoque des évolutions controverses entre les deux génotypes testés (Fig.51). Une augmentation d'épaisseur des parois externes en fonction de l'intensité du cuivre a été constatée chez le génotype Sidi Aïch. Cependant, les plants témoins enregistrent une épaisseur moyenne de 10,34  $\mu\text{m}$ . Les traitements D1 et D2 inscrivent dans un ordre respectif 11,28 et 15,12  $\mu\text{m}$  évaluant des augmentations par rapport au témoin de l'ordre de 9,09% et 46,22%. Tandis que chez le génotype Sup Aguadulce, l'application croissante du cuivre provoque une régression d'épaisseur de cet élément. Au niveau du traitement D1 et traitement D2, on a enregistré respectivement 8,56 $\mu\text{m}$  et 8,45 $\mu\text{m}$ , deux valeurs sont presque égales et exprimant ainsi des réductions respectives de l'ordre de 30,06% et 30,96% par rapport au lot témoin.

**Tableau n°47 :** L'épaisseur de la paroi externe des cellules épidermiques ( $\mu\text{m}$ ) des deux génotypes de la fève exposés au cuivre (Application 1).

Génotype	Dose de Cu (ppm)	Épaisseur de parois extérieures	Evolution %
Sidi Aïch	0	10,34 $\pm$ 1,62	/
	100	11,28 $\pm$ 0,6	9,09%
	200	15,12 $\pm$ 5,64	46,22%
Sup Aguadulce	0	12,24 $\pm$ 0,20	/
	100	8,56 $\pm$ 0,47	-30,06
	200	8,45 $\pm$ 3,35	-30,96



**Fig. 51 :** l'évolution des moyennes de l'épaisseur de la paroi externe des cellules épidermiques (μm) pour V1 (sidi Aïch) et V2 (Super Aguadulce) en fonction de la dose du cuivre (0, 100, 200 ppm).

### ➤ Application 2

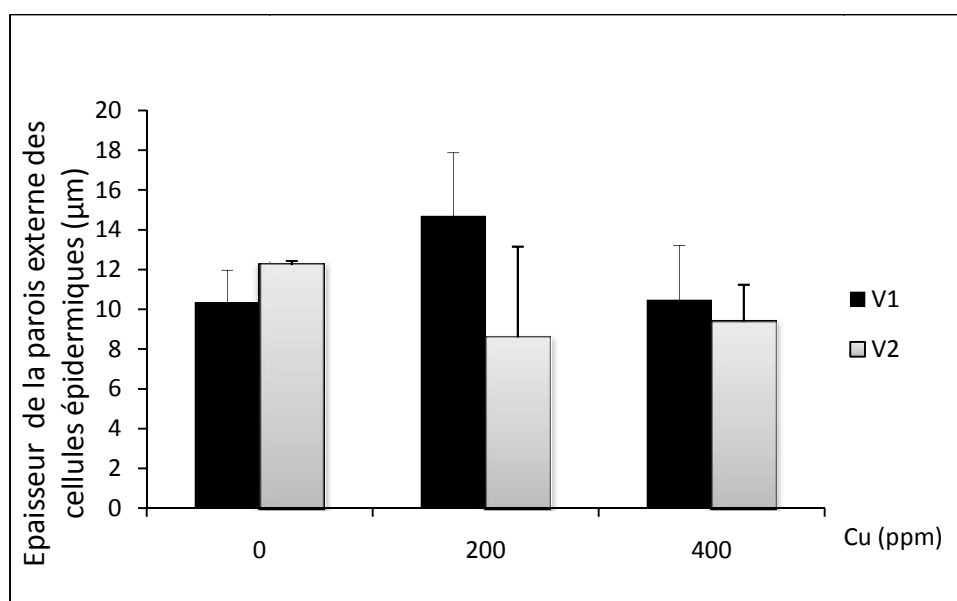
L'étude des résultats obtenus (Tab.40) démontre que l'élaboration de l'épaisseur de la paroi externe des cellules épidermiques n'est que faiblement influencée par, l'application du cuivre ( $p>0.05$ ), la nature de la variabilité conduite ( $p>0.05$ ) ainsi que par leur interaction ( $p>0.05$ ).

Pour les résultats moyens (Tab.48), chez le génotype Sidi Aïch, les plants témoins enregistrent une épaisseur moyenne de 10.34 μm. Cependant, pour ceux issus des traitements D1 et D2, les valeurs respectives de l'épaisseur sont de l'ordre de 14.68 μm et 10,46 μm, manifestant des progressions de l'ordre de 41,97% et 1,16%.

Chez le génotype Super Aguadulce, les valeurs des moyennes de l'épaisseur de la paroi externe sont plus faibles que celles pour le premier génotype (Fig.52). Pour le lot témoin, on signale une valeur moyenne de 12,24 μm. Les traitements D1 et D2 inscrivent dans un ordre respectif 8,59 et 9,38 μm évaluant des régressions par rapport au témoin de l'ordre de 29,82% et 23,36%.

**Tableau n°48 :** L'épaisseur de la paroi externe des cellules épidermiques ( $\mu\text{m}$ ) des deux génotypes de la fève exposés au cuivre (Application 2).

Génotype	Dose de Cu (ppm)	Épaisseur de parois extérieures	Evolution %
Sidi Aïch	0	$10,34 \pm 1,62$	/
	100	$14,68 \pm 3,20$	41,97
	200	$10,46 \pm 2,75$	1,16
Sup Aguadulce	0	$12,24 \pm 0,20$	/
	100	$8,59 \pm 4,57$	-29,82
	200	$9,38 \pm 1,86$	-23,36



**Fig. 52 :** l'évolution des moyennes de l'épaisseur de la paroi externe des cellules épidermiques ( $\mu\text{m}$ ) pour V1 (sidi Aïch) et V2 (Super Aguadulce) en fonction de la dose du cuivre (0, 200, 400 ppm)

### ➤ Discussion

Sur le plan anatomique, la présente étude a montré que la contamination en cuivre, suivant les doses retenues, agit différemment sur les paramètres étudiés. Ainsi, pour le nombre de faisceaux cribro-vasculaires, le cuivre ne semble avoir aucun effet sur ce paramètre même après l'incorporation de la doses 400 ppm. L'évolution de ce paramètre indique que le génotype Sidi Aïch est le plus affecté par l'intensité du cuivre, avec une diminution qui atteint jusqu'à 23,07% au cours de la première application.

Pour la distance entre les faisceaux cribro-vasculaires, l'analyse a démontré que la présence de cuivre dans le milieu n'exerce aucun effet significatif durant les deux périodes du traitement. L'intensité du cuivre induit des variations différentes à travers les deux génotypes testés. Au cours de la première application de cuivre, on remarque une diminution notable de

ce paramètre que chez le génotype Sup Aguadulce. Une situation inverse a été constatée durant la deuxième application du cuivre, où ce paramètre est affecté uniquement chez le génotype Sidi Aïch, et surtout au niveau de traitement D2.

Pour le diamètre de métaxylème, les résultats obtenus ont montré que l'expression de cette caractéristique est dépend de l'intensité du cuivre, et le matériel végétale utilisé. Ainsi l'estimation de cette dernière indique une diminution de ce paramètre dans tous les lots du traitement avec le cuivre. Chez le génotype Sidi Aïch, cette régression est accentuée au niveau du traitement D1, de la deuxième application. Alors que chez l'autre génotype, le diamètre des métaxyles sont affectés d'une manière très prononcée durant la première application du cuivre. Kasim (2005), a montré aussi que l'exposition des plants de *vicia faba L* à trois stress métallique (stress avec le cuivre, avec le cadmium et le mélange entre eux), induit une régression de diamètre de métaxylème.

Enfin, pour l'épaisseur de la paroi externe des cellules épidermiques, ce paramètre n'est pas influencé par la présence de cuivre dans le milieu. Les résultats obtenus ont montré une tendance inverse entre les deux génotypes testés après les deux applications du cuivre, où l'épaisseur est totalement diminuée chez le génotype Sup Aguadulce. Par contre, chez génotype Sidi Aïch, on a signalé une augmentation de ce paramètre même après la deuxième application de cuivre.

---

# Conclusion Générale

### Conclusion générale

La phytotoxicité par l'exposition aux métaux lourds et en particulier le cuivre, constitue l'une des contraintes majeures qui entravent le développement et la productivité des espèces végétales. L'impact de ce stress se perçoit en particulier chez les plantes à utilisation agricole. Les résultats obtenus dans le présent travail, ont permis d'évaluer les effets engendrés par ce stress métallique sur le comportement physiologique, morphologique et structural chez deux génotypes de fève expérimentés, évalués à différents stades de développement de la plante.

L'ensemble des observations mesurées concernant les processus de germination, ont permis de constater que l'application du cuivre sur les plants du génotype Sidi Aïch, est accompagnée d'une nette inhibition du taux d'imbibition des graines, en particulier en présence de la concentration de 200ppm. Une situation controversée est observée chez les graines du génotype Super Aguadulce, où l'application du stress a induit un accroissement de la prise d'eau. Concernant l'activité des  $\alpha$ -amylases, les observations indiquent un accroissement de son acuité suite à l'application du cuivre dans le milieu de germination, principalement à partir de la dose (200ppm), surtout chez le génotype Sidi Aïch. L'application des mêmes conditions expérimentales a conduit, à de fortes inhibitions de l'élongation racinaire, et à des diminutions de cette caractéristique dans les limites de 30%.

L'exposition des deux génotypes aux différentes concentrations de cuivre a provoqué des accumulations de la proline et des sucres solubles dans les feuilles. Les augmentations de la proline constatées sont comprises entre 55% et 105%, à l'exception du lot traité par 200ppm du génotype Super Aguadulce, où elle a atteint 286%.

L'intensité de stress imposé par le cuivre a occasionné des progressions des sucres solubles qui varient entre 15% et 80% pour les deux génotypes, avec une accumulation toujours plus importante constatée chez le génotype Sup Aguadulce. Ces constatations prouvent une variabilité comportementale assez prononcée chez cette espèce.

L'étude de l'effet du cuivre sur le statut hydrique des plantes, à partir de l'évaluation de la teneur relative en eau, a montré que cet effet ne se manifeste qu'après le deuxième traitement, où ce paramètre enregistre chez les deux génotypes des diminutions entre 15% à 20%.

## Conclusion générale

---

Cette situation est accompagnée d'une variation des potentiels osmotiques, avec un abaissement de l'ordre de 10% signalé durant la première application pour les plants du sidi Aïch traités à 100ppm. Au delà, le potentiel osmotique reste compris entre 0,34% à 10%, ces valeurs sont légèrement supérieures à celles enregistrées dans les conditions optimales.

L'activité photosynthétique a été fortement inhibée suite à l'exposition au cuivre. Les résultats indiquent que l'application du cuivre s'accompagne d'une nette diminution des teneurs en pigments photosynthétiques. Ainsi, les teneurs en chlorophylle a et a+b, présentant des diminutions durant les deux périodes du traitement, avec des taux de 58% enregistrée chez le génotype Sup Aguadulce et 48% chez le génotype Sidi Aïch.

Les teneurs en caroténoïdes sont également réduites de 17 à 46%, sauf qu'au niveau du lot D1, le génotype Sidi Aïch présente une valeur égale à celle de témoin.

Les doses croissantes de  $\text{Cu SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  ont été à l'origine de l'abaissement du taux des protéines totales. Ces constatations ont été signalé dans les graines des deux génotypes. Les résultats obtenus ont montré que la régression de ce paramètre peut atteindre jusqu'à 30%, ce qui rend la qualité de ce produit vulnérable et sensible à ce stress.

La biomasse a subit une forte réduction en fonction de l'accroissement des dose de cuivre appliquées. Ces réductions ont touché les deux parties (caulinaire et radicaire) des plantes. Ainsi, le génotype super Aguadulce a été le plus affecté par ce stress, et la diminution des poids sec enregistré pour la partie aérienne ou souterraine avoisine les 60% (D2). La même tendance a été signalée pour le génotype Sidi Aïch.

Les manifestations de la phytotoxicité du cuivre se résument par une diminution de la croissance des feuilles qui conduit à une réduction de la surface foliaire. Cette observation se fait progressivement avec l'augmentation de la concentration de cuivre pour le génotype sidi Aïch. Tandis que, chez le génotype super Aguadulce, cette diminution n'a affecté que les plants issus du lot D1 (-6,55%). Pour le nombre des feuilles, l'accroissement de l'intensité du cuivre, et surtout à forte dose (D2 de la deuxième application), occasionne leur réduction à une hauteur de 40%. L'application du cuivre permet également une forte inhibition de la croissance en longueur de la tige, prouvée dans ce cas par une nette réduction de sa longueur chez les plantes soumises à ce stress.

## Conclusion générale

---

L'effet du cuivre sur la morphogenèse racinaire est perceptible à un niveau plus accentué. A des doses stressantes, la croissance en longueur des racines et leur ramification se trouvent grandement inhibées, et ce chez les deux géotypes expérimentés.

L'exposition des plantes de la fève à des doses élevées de cuivre limite la production finale des gousses. Cette action s'accroît avec l'accumulation du cuivre au niveau du substrat de culture.

Sur le plan anatomique, les effets de l'application du cuivre restent très variables, à travers les différents paramètres retenus et selon les géotypes testés. D'une manière générale, on constate une réduction du nombre de faisceaux cribro-vasculaires, essentiellement au cours de la première application du stress.

L'une des principales constatations émanant de l'application du cuivre concerne, les variations du diamètre des éléments conducteurs du xylème. Ces résultats démontrent une réduction de ces diamètres, ce qui induirait l'accroissement de leur résistance hydraulique. Parmi les réactions manifestées par les plants soumis au stress avec le cuivre, s'inscrivent celles affectant l'épaississement de la paroi externe des cellules épidermiques.

Enfin, il conviendrait de suivre cette étude par des travaux évaluant la localisation et la dynamique du cuivre au sein de la plante.

-❧\* RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES \*❧-

**Adriano D C**, 2001. Copper *In* Trace elements in terrestrial environments, biogeochemistry, bioavailability, and risks of metal, Ed D C Adriano. pp 499-546.

**Adriano DC; Alloway B; Doner HE; Keller C; Lepp NW; Mench M; Naidu R; Pierzynski GM**, 1999 (Editors), Proceedings of the 5th International Conference on the Biogeochemistry of Trace Elements, Vienna, Austria.

**Alaoui-Sossé B ; Genet P ; Vinit-Dunand F ; Toussaint ML ;Epron D; Badot PM**, 2004. Effect of copper on growth in cucumber plants (*Cucumis sativus*) and its relationships with carbohydrate accumulation and changes in ion contents. Plant Science (166):1213–1218

**Alia; Prasad KVSK; Pardha Saradi P**, 1995. Effect of Zinc on free-radicals and proline in *Brassica juncea* and *Cajanus cajan*. Phytochem. 39 : 45-47.

**Allan DL; Jarrell WM**, 1989. Proton and copper adsorption to maize and soybean root cell walls. Plant Physiology 89, 823-832.

**Alloway BJ**. 1995. Heavy metals in soils. Londres: Blackie Academic and Professional. 368p.

**Andradea SAL; Priscila LG; Ricardo A; Azevedo Adriana PD; Silveira M A; Schiavinatoa, PM**, 2010. Biochemical and physiological changes in jack bean under mycorrhizal symbiosis growing in soil with increasing Cu concentrations. Environmental and Experimental Botany (68): 198–207

**Anonyme**, 2004. Toxicological profile for copper. U.S. Department Of Health and Human Services, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry. 272 p.

**Archambault DJ; Winterhalder K**, 1995. Metal Tolerance in *Agrostis-Scabra* from the Sudbury, Ontario, Area. Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique 73, 766-775.

**Ashan N; Lee DG; Lee SH; Kang KY; Lee JJ; Kim PJ; Yoon HS; Kim JS; Lee BH**, 2007. Excess copper induced physiological and proteomic changes in germinating rice seeds. Chemosphere. 67: 1182-1193.

**Ashraf M; Foolad MR**, 2007. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. Environmental and Experimental Botany 59: 206-216

**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; Sterckeman T**, 2001. Of the necessity of knowledge of the natural pedo geochemical background content in the evaluation of the contamination of soils by traces elements. *Sci. Tot. Environ.* 264: 127-139.

**Baker DE; Senft JP**, 1995. Copper in Heavy metals in soils, Ed B J Alloway. pp 179-205. Blackie A&P, London.

**Balestrasse KB; Gallego SM; Benavides MP; Tomaro ML**, 2005. Polyamines and proline are affected by cadmium stress in nodules and roots of soybean plants. *Plant and Soil* 270 : 343-353.

**Banasova V; Horak O; Ciamporova M; Nadubinska M; Lichtscheidl I**, 2006. The vegetation of metalliferous and non-metalliferous grasslands in two former mine regions in Central Slovakia. *Biologia.* 61: 433-439.

**Banu MN; Hoque MA; Watanabe-Sugimoto M; Matsuoka K; Nakamura Y; Shimoishi Y; Murata Y**, 2008. Proline and glycinebetaine induce antioxidant defense gene expression and suppress cell death in cultured tobacco cells under salt stress. *J Plant Physiol*

**Basha SMM**, 1975. Beevers, L The development of proteolytic activity and protein degradation during the germination of *Pisum sativum* L., *Planta* 124, 77–87.

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

**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.

**Bes C ; Mench M ; Gaste H ; Tabarly J ;Aulen M ; Gawronski S**, 2008. La réponse au Cu chez *Amorpha fruticosa*, *Carex praecox*, *Sporobolus indicus* et *Xanthium strumarium*. Phytoremédiation des sols d'un site de traitement du bois contaminés par le cuivre. Thèse Doctorat, 225p.

**Bessoule JJ ; Mench M**, 2002. Sols et déchets – Biomarqueurs métaboliques d'effet et d'exposition des végétaux aux métaux traces : candidats lipidiques. Ademe, Angers

**Bewley, DJ** 1997. Seed germination and dormancy, *Plant Cell* 9, 1055–1066.

**Boojar MMA ; F Goodarzi**, 2007. The copper tolerance strategies and the role of antioxidative enzymes in three plant species grown on copper mine. *Chemosphere* 67, 2138-2147.

**Boon GT; Bouwman LA; Bloem J; Romkens P**, 1998. Effects of a copper-tolerant grass (*Agrostis capillaris*) on the ecosystem of a copper-contaminated arable soil. *Environ.Toxicol. Chem.*17, 1964-1971

**Bradford, KJ** 1995. Water relations in seed germination, in: J. Kigel, G. Galili (Eds.), Seed Development and Germination, Marcel Dekker, New York, pp. 351–395.

**Bravin MN**, 2008. Processus rhizosphériques déterminant la biodisponibilité du cuivre pour le blé dur cultivé en sols à antécédent viticole. Systèmes Intégrés en Biologie, Agronomie, Géosciences, Hydrosociences et Environnement. p28

**Brun LA; Le Corff J; Maillet J**, 2003. Effects of elevated soil copper on phenology, growth and reproduction of five ruderal plant species. Environ Pollut. 122: 361-368.

**Brun LA; Maillet J; Hinsinger P; Pépin M**, 2001. Evaluation of copper availability to plants in copper-contaminated vineyard soils.- Environmental Pollution, 111 : 293-302.

**Brunet J**, 2008. Adaptation aux métaux lourds d'une Fabacée (légumineuse) : Réponses phénologique et moléculaire au plomb du *Lathyrus sativus* L. Thèse de doctorat, Université Paris Est, p231.

**Burnol A ; Duro L ; Grive M**, 2006. Eléments traces métalliques. Guide méthodologique. Recommandations pour la modélisation des transferts des éléments traces métalliques dans les sols et les eaux souterraines. Rapport INERIS.

**Bussler B**, 1981. Physiological functions and utilization of copper. In: J.F. Loneragan, A.D. Robson and R.D. Graham eds., Copper in soils and plants, Proceedings of the Golden Jubilee International Symposium on « Copper in Soils and Plants », Murdoch University, Perth, Académie Press, Sydney, 213-234.

**Cetois A; Quesnoit M; Hinsinger P**, 2003. Soil copper mobility and bioavailability-a review. Pp 110. INRA -Agro M.

**Chatterjee J; Chatterjee C**, 2000. Phytotoxicity of cobalt, chromium and copper in cauliflower. Environmental Pollution 109, 69-74.

**Chen CB; Dickman MB**, 2005. Proline suppresses apoptosis in the fungal pathogen *Colletotrichum trifolii*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 102: 3459-3464

**Chen Y; Zhang M; Chen T; Zhang Y; An L**, 2006. The relationship between seasonal changes in anti-oxidative system and freezing tolerance in the leaves of evergreen woody plants of Sabina. South African Journal of Botany 72: 272-279

**Chugh LK; Sawhney SK**, 1999. Photosynthetic activities of *Pisum sativum* seedlings grown in presence of cadmium. Plant Physiol Biochem 37:297–303

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

**Cohen CK; Norvell WA; Kochian LV, 1997.** Induction of the root cell plasma membrane ferric reductase. An exclusive role for Fe and Cu. *Plant Physiology* 114, 1061-1069.

**Coïc Y ; Coppenet M, 1989.** Les Oligo-Éléments en Agriculture et Élevage: Incidence sur la Nutrition Humaine. INRA, Paris, 114 p.

**Cook CM; Kostidou A; Vardaka E; Lanaras T, 1997.** Effects of copper on the growth, photosynthesis and nutrient concentrations of Phaseolus plants. *Photosynthetica*. 34: 179-193.

**Costa G; Spitz E, 1997.** Influence of cadmium on soluble carbohydrate, free amino acids, protein content of in vitro cultured *Lupinus albus*. *Plant Sci*. 128 : 131-140.

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

**Cox RM TC; Hutchinson, 1980.** Multiple metal tolerances in the grass *Deschampsia cespitosa* (L.) Beauv. from the Sudbury smelting area. *New Phytologist* 84, 631-647.

**Cuyppers A, 2000.** Phytotoxic concentrations of copper and zinc induce antioxidative defence in *Phaseolus vulgaris*, cv. Limburgse vroege: a comparative study. *Limburgs universitair centrum*, Diepenbeek, Belgium.

**Dameron CT ;Howe PD, 1998.** Copper. *Environmental Health Criteria*, 200, World

**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.

**Dean RT; Fu S; Stocker R; Davies MJ, 1997.** Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochemical Journal* 324: 1-18

**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.

**Delas J, 1963.** La toxicité du cuivre dans les sols. *Agrochimica VII*: 257-288.

**Demirevska-Kepova KL; Simova-Stoilova Z; Stoyanova R; Holzer U ;Feller, 2004.** Biochemical changes in barley plants after excessive supply of copper and manganese. *Environmental and Experimental Botany* 52, 253-266

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

**Dos Santos WD; Ferrarese MDL; Finger A; Teixeira CAN; Ferrarese O, 2004.** Lignification and related enzymes in *Glycine max* root growth-inhibition by ferulic acid. *Journal of Chemical Ecology* 30, 1203-1212.

- 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.
- Dubey RS; Singh AK**, 1999. Salinity induces accumulation of soluble sugars and alters the activity of sugar metabolizing enzymes in rice plants. *Biol. Plant.* 42: 233-239.
- Duc G**, 1997. Faba bean (*Vicia faba* L.). *Field Crops Res.* 53:99-109.
- Dufey JE; Genon JG; Jaillard B; Calba H; Rufyikiri G; Delvaux B**, 2001. Cation exchange on plant roots involving aluminium: experimental data and modelling. *In Trace elements in the rhizosphere*, Eds G R Gobran, W W Wenzel and E Lombi. pp 227-252. CRC Press, Boca Raton.
- Dumestre; A Sauve; S McBride M; Baveye P; Berthelin J**, 1999. Copper speciation and microbial activity in long-term contaminated soils. *Arch. Environ. Con.* 36, 124-131.
- Ebbs SD; Lasat MM; Brady DJ; Cornish J; Gordon R; Kochian LV**, 1997. Phytoextraction of cadmium and zinc from a contaminated soil.- *J. Environ. Qual.*, 26 : 1424-1430.
- Elmsley J**, 2001. *Nature's Building Blocks. A A-Z guide to the elements.* Oxford University Press, Oxford, UK.
- Ernst WHO**, 1998. Effects of heavy metals in plants at the cellular and organismic level ecotoxicology, in : S. Gerrit, M. Bernd (Eds.), III. Bioaccumulation and Biological Effects of Chemicals, John Wiley & Sons and Spektrum Akademischer Verlag, pp. 587–620.
- 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.
- Fernandes JC; Henriques FS**, 1991. Biochemical, physiological and structural effects of excess copper in plants, *Bot. Rev.* 57 246–273.
- 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.
- Franchin CT; Fossati E; Pasquini G; Lingua S; Castiglione P; Torrigiani S; Biondi**, 2007. High concentrations of zinc and copper induce differential polyamine responses in micropropagated white poplar (*Populus alba*). *Physiologia Plantarum* 130, 77-90.
- Fuentes D; Disante KB; Valdecantos A; Cortina J; Vallejo VR**, 2007. Sensitivity of Mediterranean woody seedlings to copper, nickel and zinc. *Chemosphere* 66, 412-420.

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

**Gallego SM; Benavides M; Tomaro ML**, 2002. Involvement of an antioxidant defence system in the adaptive response to heavy metal ions in *Helianthus annuus* L. cells. Plant Growth Regulation 36: 267-273

**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 Agricultural and Food Chemistry 54: 8623-8630

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

**Graham RD**, 1981. Absorption of copper by roots. In: J.F. Loneragan, A.D. Robson and R.D. Graham eds. , Copper in Soils and Plants, Proceedings of the Golden Jubilee International Symposium on « Copper in Soils and Plants », Murdoch University, Perth, Académie Press, Sydney, 141-163.

**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.

**Gregory P J ; Hinsinger P** 1999. New approaches to studying chemical and physical changes in the rhizosphere: an overview. Plant and Soil 211, 1-9.

**Gregory P J ; Hinsinger P** 2006 .New approaches to studying chemical and physical changes in the rhizosphere: an overview. Plant and Soil 211, 1-9

**Guo XM; Niu DK; Liu YQ; Du TZ; Xiao SZ; Ye XH**, 2004. Vegetation restoration of different types of barren ecosystems in Jiangxi province. Pages 293-301 in S. P. M. Y.M. Luo, J. Japenga, F.J. Zhao, T. Edelman, B. Marschner, L. Newman and T. Vanek, editor. 2nd International Conference on Soil Pollution and Remediation, Nanjing, China.

**Hänsch R; Mendel RR**, 2009. Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl). Current Opinion in Plant Biology 12 : 259-266.

**Hinsinger P**, 2001. Bioavailability of trace elements as related to root-induced chemical changes in the rhizosphere. In Trace elements in the rhizosphere, Eds G R Gobran, W W Wenzel and E Lombi. pp 25-41. CRC Press, Boca Raton.

**Hinsinger P**, 2001. Bioavailability of trace elements as related to root-induced chemical changes in the rhizosphere. In Trace Elements in the Rhizosphere (G.R. Gobran, W.W. Wenzel & E. Lombi Eds.), CRC Press LCC, Boca Raton, USA, 25-41.

**Hinsinger P, Gobran G R; Gregory P J ; Wenzel W W** 2005. Rhizosphere geometry and heterogeneity arising from root-mediated physical and chemical processes. New Phytologist 168, 293-303.

**Hong ZL; Lakkineni K; Zhang ZM; Verma DPS, 2000.** Removal of feedback inhibition of Delta(1)-pyrroline-5-carboxylate synthetase results in increased proline accumulation and protection of plants from osmotic stress. *Plant Physiology* 122: 1129-1136

**Hutchinson TC; Symington; MS, 1997.** Persistence of metal stress in a forested ecosystem near Sudbury, 66 years after closure of the O'Donnell roast bed. *J. Geochem. Explor.* 58, 323-330.

**Inaba S ; Takenaka C, 2005.** Effects of dissolved organic matter on toxicity and bioavailability of copper for lettuce sprouts. *Environment International* 31, 603-608.

**ISO, 1993.** Soil quality - Determination of the effects of pollutants on soil flora - Part 1: Method for the measurement of inhibition of root growth. N°11269-1.

**ISO, 1995.** Soil quality - Determination of the effects of pollutants on soil flora - Part 2: effects of pollutants on the emergence and growth of higher plants. N°11269-2.

**ISO, 2006.** Soil quality - Guidance for the selection and application of methods for the assessment of bioavailability in soil and soil materials. ISO/DIS 17402 Geneva, Switzerland.

**Jana S; Choudhuri MA, 1984.** Synergistic effects of heavy metal pollutants on senescence in submerged aquatic plants. *Water, Air, and Soil Pollution* 21: 351-357

**Jaraus-Wehrheim B; Mocquot B; Mench M; 1996.** Uptake and partitioning of sludgeborne copper infield-grown maize (*Zea mays* L.).- *European Journal of Agronomy*, 5: 259-271.

**Kabata-Pendias A ; Pendias H, 1992.** Trace elements in soils and plant- 2<sup>nd</sup> Edition. Florida, CRC Press Inc. 365 pp.

**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.

**Kasim WA, 2005.** The Correlation between Physiological and Structural Alterations Induced by Copper and Cadmium Stress in Broad Beans (*Vicia faba* L.). *Egyptian Journal of Biology*, Vol. 7, pp 20-32

**Kastori R; Petrovic M; Petrovic N, 1992.** Effect of excess lead, cadmium, copper and zinc on water relations in sunflower. *J. Plant Nutr.*, 15 : 2427-2439.

**Katyal JC ; Randhawa NS, 1986.** Les oligo-éléments - Bulletin FAO: Engrais et Nutrition végétale. Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture, Rome, 88 p.

**Kholodova V; Volkov K; Abdeyeva A; Kuznetsov V, 2011.** Water status in *Mesembryanthemum crystallinum* under heavy metal stress. *Environmental and Experimental Botany*: 382-389

**Khurana N; Singh MV; Chatterjee C**, 2006. Copper stress alters physiology and deteriorates seed quality of rapeseed. *Journal of Plant Nutrition* 29, 93-101.

**Kinraide TB; Pedler JF; Parker DR**, 2004. Relative effectiveness of calcium and magnesium in the alleviation of rhizotoxicity in wheat induced by copper, zinc, aluminium, sodium and low pH. *Plant Soil* 259, 201-208.

**Koch ke**, 1996. Carbohydrates-modulated gene expression in plants. *Ann. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* ; 47: 509- 540.

**Kopittke PM; Asher CJ; Kopittke RA; Menzies; NW**, 2007a. Toxic effects of Pb on growth of cowpea (*Vigna unguiculata*). *Environmental Pollution* 150, 280-287.

**Kopittke PM; Blamey FPC; Menzies NW**, 2008. Toxicities of soluble Al, Cu, and La include ruptures to rhizodermal and root cortical cells of cowpea. *Plant and Soil* 303, 217-227.

**Kopittke PM; Colin JA; Kopittke RA; Menzies NW**, 2007. Toxic effects of Pb<sup>2+</sup> on growth of cowpea (*Vigna unguiculata*). *Environmental Pollution*, in press.

**Kopittke PM; JDP; Menzies NW, 2007b**. Toxic effects of low concentrations of Cu on nodulation of cowpea (*Vigna unguiculata*). *Environmental Pollution* 145, 309-315.

**Kopittke PM; Menzies NW**; 2006. Effect of Cu toxicity on growth of cowpea (*Vigna unguiculata*). *Plant and Soil* 279, 287-296.

**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.

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

**Krupa Z; Siedlecka A; Skorzynska-Polit E; Maksymiec W, 2002**. Heavy metal interactions with plant nutrients. In : *Physiology and Biochemistry of Metal Toxicity and Tolerance in Plants*, Prasad M.N.V. et Strzalka K. eds, Kluwer Academic Publishers, Netherlands, pp. 287-301.

**Kumpiene J; Ore S; Renella G; Mench M; Lagerkvist A; Maurice C**, 2006. Assessment of zerovalent iron for stabilization of chromium, copper, and arsenic in soil. *Environmental Pollution* 144, 62-69.

**Kuo S; Heiman PE; Baker A S**, 1983. Distribution and forms of Cu, Zn, Cd, Fe and Mn in soils near a copper smelter.- *Soil Science*, 135 : 101-109.

**Kurepa J; Smalle JA**, 2008. Structure, function and regulation of plant proteasomes. *Biochimie Cellular proteolysis* 90: 324-335

**Larcher W**, 2003. *Physiological Plant Ecology: Ecophysiology and Stress Physiology of Functional Groups*. 4 éd., Springer-Verlag, Berlin, 513 p.

**Legrand P; Turmel M-C; Sauvé S; Courchesne F**, 2005. Speciation and bioavailability of trace metals (Cd, Cu, Ni, Pb, Zn) in the rhizosphere of contaminated soils. *In Biogeochemistry of trace elements in the rhizosphere*, Eds P M Huang and G R Gobran. pp 261-299. Elsevier, Amsterdam.

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

**Lexmond Th M**, 1980. The effect of soil pH on copper toxicity to forage maize grown under field conditions.- *Netherlands Journal of Agricultural Science*, 28 : 164-184.

**Lexmond TM; Van der Vorm PDJ**, 1981. The effect of pH on copper toxicity to hydroponically grown maize. *Netherlands Journal of Agricultural Science* 29, 217-238.

**Li YM; Chaney R; Brewer E; Rosenberg R; Angle SJ; Baker AJM; Reeves RD; Nelkin J**, 2003. Development of technology for commercial phytoextraction of nickel: economic and technical considerations. *Plant Soil* 249:107-115

**Lichtenthaler H K**, 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.

**Lin CC; Chen LM; Liu ZH**, 2005. Rapid effect of copper on lignin biosynthesis in soybean roots. *Plant Science* 168, 855-861.

**Lindsay WL**, 1979. *Chemical equilibria in soils*. John Wiley and Sons. 449 p.

**Lou LQ; Shen ZG; Li XD**, 2004. The copper tolerance mechanisms of *Elsholtzia haichowensis*, a plant from copper-enriched soils. *Environmental and Experimental Botany* 51, 111-120.

**Loué A**, 1993. *Oligoéléments en agriculture*.- Ed. Nathan, 577pp.

**Ma LQ ; Rao GN**, 1997. Heavy metals in the environment-chemical fractionation of cadmium, copper, nickel, and zinc in contaminated soils. *J. Environ. Quai.* 26: 259 -264.

**Maenpaa KA; Kukkonen JVK; Lydy MJ**, 2002. Remediation of heavy metalcontaminated soils using phosphorus: Evaluation of bioavailability using an earthworm bioassay. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 43, 389-398.

**Mahmood S; Hussain A; Saeed Z; Athar M**, 2005 Germination and seedling growth of corn (*Zea mays* L.) under varying levels of copper and zinc. *Int J Environ Sci Technol.* 2: 269-274;

**Malan ML; farrant JM**, 1998. Effects of the metal pollutants cadmium and nickel on Soybean seed development. *Seed Sci Res.* 8: 445-453.

**Mallick N; Rai LC**, 2002. Physiological responses of non-vascular plants to heavy metals. In : *Physiology and Biochemistry of Metal Toxicity and Tolerance in Plants*, Prasad M.N.V. et Strzalka K. (eds), Kluwer Academic Publishers, Netherlands, pp. 111-147.

**Mansour MMF.** (1998) Protection of plasma membrane of onion epidermal cells by glycine betaine and proline against NaCl stress. *Plant Physiology and Biochemistry* 36: 767-772

**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.

**Marschner H**, 1995. Mineral nutrition of higher plants. Academic Press, London. 889 p.

**Martínez-Fernández D; David J; Walker REP; Flores P; Antonio del Río J**, 2011 Physiological responses of *Bituminaria bituminosa* to heavy metals. 4p.

**Mathieu C et Pieltan F**, 2003. Analyse chimique des sols- Méthodes choisies. Ed Tec &Doc, Lavoisier, Paris, pp.351-376.

**McBride MB**, 1981. Forms and distribution of copper in solid and solution phases of soil. P.25-45. In J.F. Loneragan et al. (éd.). *Copper in soils and plants*. Academic Press, Sydney, Australia.

**McCarthy I; Romero-Puertas MC; Palma JM; Sandalio LM; Corpas FJ; Gómez M; del Río LA**, 2001. Cadmium induces senescence symptoms in leaf peroxisomes of pea plants. *Plant, Cell and Environment* 24: 1065-1073

**McIntyre T**, 2003. Phytoremediation of heavy metals from soils. *Advance in Biochemical Engineering Biotechnology* 78: 97-123.

**McLaren RG ; Crawford DV**, 1973a. Studies on soil copper. I The fractionation of copper in soils. *J. Soil Sci.* 24: 172-181.

**McLaren RG ; Crawford DV**, 1973b. Studies on soil copper. II The specific adsorption of copper by soils. *J. Soil Sci.* 24: 443-452.

**Mench M; Coussin F; Buissiere S; Lagriffoul A; Mocquot B**, 1998. Validation et répétabilité d'un test de toxicité chronique sur végétal (PLANTOX) et d'un protocole de dilution associé, pour déterminer les paramètres de toxicité de matrices de références (sols et

déchets) contenant des éléments traces ; étude de son extension à un autre organisme, *Zea mays* L. INRA - ADEME.

**Mendoza-Cózatl DG; Loza-Tavera H; Hernandez-Navarro A; Moreno-Sanchez R, 2005.** Sulfur assimilation and glutathione metabolism under cadmium stress in yeast, protists and plants. *FEMS Microbiology Reviews* 29: 653-671.

**Mengel K; Kirkby EA, 2001.** Principles of plant nutrition. Kluwer academic publishers, Dordrecht. 849 p.

**Michaud AM; Bravin MN; Galleguillos M; Hinsinger P, 2007.** Copper uptake and phytotoxicity as assessed *in situ* for durum wheat (*Triticum turgidum durum* L.) cultivated in Cu-contaminated, former vineyard soils. *Plant and Soil* 298, 99-111.

**Michaud AM; Chappellaz C; Hinsinger P, 2008.** Copper phytotoxicity affects root elongation and iron nutrition in durum wheat (*Triticum turgidum durum* L.). *Plant and Soil* 310, 151-165.

**Mihoub A ; Chaoui A ; Ferjani EE, 2004.** Changements biochimiques induits par le cadmium et le cuivre au cours de la germination des graines de petit pois (*Pisum sativum* L.). *Comptes Rendus Biologies* 328, 33-41.

**Mihoub A ; Chaoui A ; Ferjani EE, 2005.** Changements biochimiques induits par le cadmium et le cuivre au cours de la germination des graines de petit pois (*Pisum sativum* L.). *Comptes Rendus Biologies* 328, 33-41.

**Miller W P; Mc Fee WW, 1983.** Distribution of cadmium, zinc, copper and lead in soils of industrial northwestern Indiana. *Journal of Environmental Quality*, 12 : 29-33.

**Miquel MG, 2001.** Les effets des métaux lourds sur l'environnement et la santé, rapport de l'office parlementaire des choix scientifiques (Sénat).

**Mitchell G A; Bingham F T ; Page A L, 1978.** Yield and metal composition of lettuce and wheat grown on soils amended with sewage sludge enriched with cadmium, copper, nickel and Zinc.- *Journal of Environmental Quality*, 7 : 165-171.

**Mohanty S; Das AB; Das P; Mohanty P, 2004.** Effect of a low dose of aluminium on mitotic and meiotic activity, 4C DNA content, and pollen sterility in rice, *Oryza sativa* L. cv. Lalat. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 59, 70-75.

**Moya JL; Ros R; Picazo I, 1993.** Influence of cadmium and nickel on growth, net photosynthesis and carbohydrate distribution in rice plants. *Photosynth. Res.* 36 : 75-80.

**Murray DR, 1979.** Peoples, M.B. Waters, S.P. Proteolysis in the axis of the germinating pea seed. I. Changes in protein degrading enzyme activities of the radicle and primary root, *Planta* 147, 111-116.

**Murray DR**, 1979. Proteolysis in the axis of the germinating pea seed. II. Changes in polypeptide composition, *Planta* 147 (1979) 117–121.

**Nieboer E; Richardson DHS**; 1980. The replacement of the nondescript term «heavy metal» by a biologically and chemically significant classification of metal ions. *Environ. Pollut.* 1: 3-26.

**Okuma E; Murakami Y; Shimoishi Y; Tada M; Murata Y**, 2004. Effects of exogenous application of proline and betaine on the growth of tobacco cultured cells under saline conditions. *Soil Science and Plant Nutrition* 50: 1301-1305

**Okuma E; Soeda K; Fukuda M; Tada M; Murata Y**, 2002. Negative correlation between the ratio of K<sup>+</sup> to Na<sup>+</sup> and proline accumulation in tobacco suspension cells. *Soil Science and Plant Nutrition* 48: 753-757

**Okuma E; Soeda K; Tada M; Murata Y**, 2000. Exogenous proline mitigates the inhibition of growth of *Nicotiana tabacum* cultured cells under saline conditions. *Soil Science and Plant Nutrition* 46: 257-263

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

**Panou-Filotheou H; Bosabadilis AM**, 2004. Root structural aspects associated with copper toxicity in oregano (*Origanum vulgare* L. *subsp. hirtum*). *Plant Science* 166, 1497-1504.

**Parker AJ**, 1981. Introduction: The chemistry of copper. p. 1-22. *In* J.F. Loneragan et al. (éd.). *Copper in soils and plants*. Academic Press, Sydney, Australia.

**Patsikka E; Kairavuo M; Sersen F; Aro EM; Tyystjarvi E**, 2002. Excess copper predisposes photosystem II to photoinhibition in vivo by outcompeting iron and causing decrease in leaf chlorophyll. *Plant Physiology* 129, 1359-1367.

**Pena LB; Pasquini LA; Tomaro ML; Gallego SM**, 2006. Proteolytic system in sunflower (*Helianthus annuus* L.) leaves under cadmium stress. *Plant Science* 171: 531-537

**Pilon-Smits E**, 2005. Phytoremediation. *Annual Review of Plant Biology* 56: 15-39

**Planquart P; Bonin G; Prone A; Massiani C**, 1999. Distribution, movement and plant availability of trace metals in soils amended with sewage sludge composts : application to low metal loadings.- *The Science of the Total Environment*, 241 : 161-179.

**Poschenrieder; CJ Bech M; Llugany A; Pace E; Fenes J; Barcelo**, 2001. Copper in plant species in a copper gradient in Catalonia (North East Spain) and their potential for phytoremediation. *Plant and Soil* 230, 247-256.

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

**Prasad MNV; Drej K; Skawinska A; Skawinska K**, 1998. Toxicity of cadmium and copper in *Chlamydomonas reinhardtii* wild-type (WT2137) and cell wall deficient mutant strain (CW15). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 60, 306-311.

**Prasad MNV; Malec P; Waloszek A; Bojko M; Strzalka K**, 2001. Physiological responses of *Lemna trisulca* L. (Duckweed) to cadmium and copper bioaccumulation. *Plant Sci.* 161, 881-889.

**Puig S; Andres-Colas N; Garcia-Molina A; Penarrubia L**, 2007. Copper and iron homeostasis in *Arabidopsis*: responses to metal deficiencies, interactions and biotechnological applications. *Plant Cell Environ.* 30, 271-290.

**Radetski CM; Ferrari B; Cotellet 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.

**Ramel F**, 2009. Implication des sucres solubles dans les réponses aux stress xénobiotique et oxydatif chez *Arabidopsis thaliana*. Thèse Doctorat de l'université de rennes. Thèse de doctorat, Université RENNES 1, p231.

**Ramos L ; Hernandez LM ; Gonzalez ; MJ**, 1994. Sequential fractionation of copper, lead, cadmium and zinc in soils from or near Donana National Park. *J. Environ. Quai.* 23: 50-57.

**Raskin I; Ensley BD; Salt DE**, 1997. Phytoremediation of metals: using plants to remove pollutants from the environment. *Current Opinion in Biotechnology* 8, 221-226.

**Ratnikov AN; Sviridenko DG; Zhigareva TL; GI Popova**, 2005. Effects of heavy metals and organic fertilisers on a biological activity of soddy-podzolic soil and yield of barley. *In* H.-K. Galazka, editor. Current developments in remediation of contaminated lands, Pulawy, Poland.

**Rawlings ND; Tolle DP; Barret AJ**, 2004. MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Research* 32: D160–D164

**Reinheckel T; Noack S; Lorenz S; Wiswedel I; Augustin W**, 1998. Comparison of protein oxidation and aldehyde formation during oxidative stress in isolated mitochondria. *Free Rad. Res.* 29, 297-305.

**Reuter DJ; Robinson JB**; 1997. Plant analysis: an interpretation manual.- CSIRO publishing, Australia, 572pp.

**Robert M ; Juste C**, 1999. Dynamiques des éléments traces de l'écosystème sol. Dans: Association ECRIN éd., Spéciation des Métaux dans le Sol, Les cahiers des clubs CRIN, Club CRIN Environnement et Ministère de l'Environnement, Paris. 15-37.

**Romero-Puertas MC; Palma JM; Gomez M; Del Rio LA; Sandalio LM**, 2002. Cadmium causes the oxidative modification of proteins in pea plants. *Plant, Cell & Environment* 25: 677-686

**Ryser P; Sauder R**, 2006. Effects of heavy-metal-contaminated soil on growth, phenology and biomass turnover of *Hieracium piloselloides*. *Environ. Pollut.* 140, 52-61.

**Salemaa M; Uotila T**, 2001. Seed bank composition and seedling survival in forest soil polluted with heavy metals. *Basic and Applied Ecology* 2, 251-263.

**Samarakoon AB; et Rauser WE**, 1979. Carbohydrate levels and phosphoassimilate export from leaves of *Phaseolus vulgaris* exposed to excess cobalt, nickel and zinc. *Plant Physiol.* 63: 1165-1169.

**Sancenon V; Puig S; Mateu-Andrés I; Dorcey E; Thiele DJ; Penarrubia L**, 2004. The *Arabidopsis* copper transporter COPT1 functions in root elongation and pollen development. *The Journal of Biological Chemistry* 279, 15348-15355.

**Sanders JR; McM Adams T; Christensen BT**, 1986b. Extractability and bioavailability of zinc, nickel, cadmium and copper in three Danish soils sampled 5 years after application of sewage sludge. *Journal of Science Food Agriculture*, 37, 1155-1164.

**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.

**Sanita Di Toppi L; Gabbrielli R**, 1999. Response to cadmium in higher plants. *Environmental and Experimental Botany* 41, 105-130.

**Sattelmacher B**, 2001. The apoplast and its significance for plant mineral nutrition. *New Phytologist* 149, 167- 192.

**Sauvé S; McBride M; Norvell WA; Hendershot, W** 1997. Copper solubility and speciation of *in situ* contaminated soils: Effects of copper level, pH and organic matter. *Water Air Soil Pollution* 100: 133-149.

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

**Schramel O; Michalke B ; Kettrup A**, 2000. Study of the copper distribution in contaminated soils of hop fields by single and sequential extraction procedures. *Sci. Total Environ.* 263: 11-22.

**Schulte EE; Kelling KA**, 1999. Soil land applied copper. Understanding Plant Nutrients n°A2527.

**Shainberg O; Rubin B; Rabinowitch HD; Tel-Or E**, 2001. Loading beans with sublethal levels of copper enhances conditioning to oxidative stress. *Journal of Plant Physiology* 158, 1415-1421.

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

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

**Sheldon AR; Menzies NW**, 2005. The effect of copper toxicity on the growth and root morphology of Rhodes grass (*Chloris gayana* Knuth.) in resin buffered solution culture. *Plant and Soil* 278, 341-349.

**Shields R; Burnett W**, 1960. Determination of protein bound carbohydrate in serum by a just modified anthrone method. *Anal. Chem.*, 32 : 885-886.

**Shringarpure R; Grune T; Mehlhase J; Davies KJA**, 2003. Ubiquitin conjugation is not required for the degradation of oxidized proteins by proteasome. *Journal of Biological Chemistry* 278: 311-318

**Shu WS; Ye ZH; Zhang ZQ; Lan CY; Wong MH**, 2005. Natural colonization of plants on five lead/zinc mine tailings in Southern China. *Restoration Ecology* 13, 49-60.

**Simmons JA; WS Currie; KN Eshleman; K Kuers; S Monteleone; TL Negley; BR Pohlad; CL Thomas**, 2008. Forest to reclaimed mine land use change leads to altered ecosystem structure and function. *Ecological Applications* 18, 104-118.

**Sims J T**; 1986. Soil pH effects on the distribution and plant availability of manganese, copper and zinc. *Soil Science Society of American Journal*, 50, 367-373.

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

**Thomé OW**, 1885. Flora von Deutschland, Österreich und der Schweiz Gera, Germany.

**Thornton I**, 1999. Bioavailability of trace elements in the food chain.- In : Wenzel W. W.,

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

**Uribe EG; Stark B**, 1982. Inhibition of photosynthetic energy conversion by cupric ion: Evidence for Cu<sup>2+</sup>- coupling factor 1 interaction. *Plant Physiology* 69, 1040-1045.

**Verbruggen N; Hermans C; Schat H**, 2009. Molecular mechanisms of metal hyperaccumulation in plants. *New Phytologist* 181: 759-776.

**Verma S; Dubey RS**, 2001. Effect of cadmium on soluble sugars and enzymes of their metabolism in rice. *Biol. Planta.* 44: 117-123.

**Vidic T ; Jogan N ; Drobne D ; Vihlar B**, 2006. Natural revegetation in the vicinity of the former lead smelter in Zerjav, Slovenia. *Environmental Science & Technology* 40, 4119-4125.

**Vinit-Dunand F; Epron D; Alaoui-Sosse B; Badot PM**; 2002. Effects of copper on growth and on photosynthesis of mature and expanding leaves in cucumber plants. *Plant Science* 163, 53-58.

**Vulkan R; Zhao F J; Barbosa-Jefferson V; Preston S; Paton G I; Tipping E; McGrath S**, 2000. Copper speciation and impacts on bacterial biosensors in the pore water of copper-contaminated soils. *Environmental Science & Technology* 34, 5115-5121.

**Whiteley GM; Williams S**, 1993. Effects of treatment of metalliferous mine spoil with lignite derived humic substances on the growth-responses of metal tolerant and nonmetal tolerant cultivars of *Agrostis capillaris* L. *Soil Technology* 6, 163-171.

**Wierzbicka M; Obidzinska J**, 1998. The effect of lead on seed imbibition and germination in different plant species. *Plant Science* 137(2): 155-171.

**Wong MH**, 2003. Ecological restoration of mine degraded soils, with emphasis on metal contaminated soils. *Chemosphere* 50, 775-780

**Woolhouse HW**, 1983. Toxicity and plant tolerance in response of plants to metals. Dans: *Encyclopedia of plant physiology, New Series*. Éditeurs: LANGE, G.L. vol. 12c. Springer-Verlag, New York. pp. 246-300.

**Xiong ZT; Peng YH**, 2001. Response of pollen germination and tube growth to cadmium with special reference to low concentration exposure. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 48, 51-55.

**Yang X; Peng HY; Tian SK**, 2005. Gamma-aminobutyric acid accumulation in *Elsholtzia splendens* in response to copper toxicity. *Journal of Zhejiang University Science* 6B, 96-99.

**Yu, S; He ZL; Huang CY, Chen GC; Calvert DV**, 2004. Copper fractionation and extractability in two contaminated variable charge soils. *Geoderma* 123: 163-175.

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

**ZHAO S; LIU Q; QI Y; DUO L**, 2010. Responses of root growth and protective enzymes to copper stress in turfgrass . *Acta biologica cracoviensia series botanica* 52/2: 7–11

**Zheng SJ; He YF; Arakawa Y; Masaoka Y; Tang C**, 2005. copper-deficiency-induced root reductase is different from the iron-deficiency-induced one in red clover (*Trifolium pratense* L.). Plant and Soil 273, 69-76.

**Zhi-Ting X; Ting W; Kun L; Zhi-Zhen; Jin-Hua; Yu Hu; Ming-Jing L**, 2007. Differential invertase activity and root growth between Cu-tolerant and non-tolerant populations in *Kummerowia stipulacea* under Cu stress and nutrient deficiency. Environmental and Experimental Botany.p27

**Zinati GM ; Li Y; Bryan HH**, 2001. Accumulation and fractionation of copper, iron, manganèse and zinc in calcareous soils amended with composts. J. Environ. Sci. Health B36: 229-243.

# Annexes

**Annexe n°1** : Composition de la solution nutritive.

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

**Annexe n°2** : Analyse de la variance des paramètres biologiques

- Longueur de la radicule.

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA
Dose de cuivre(F1)	2	1	2	13,239	0,00342
Génotype (F2)	1,12	2	0,56	3,707	0,05502
Var. inter F1*2	0,04	2	0,02	0,132	0,87717
Var. résiduelle 1	1,813	12	0,151		

- **PARAMETRE PHYSIOLOGIQUES**

- Teneur en eau relative (application 1)

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA
Dose de cuivre(F1)	50.179	2	25.089	0.457	0.64083
Génotype (F2)	81.76	1	81.76	1.491	0.2253
Var. inter F1*F2	82.625	2	41.312	0.753	0.47966
Var. résiduelle 1	2961.439	54	54.841		

- Teneur en eau relative (application 2)

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA
Dose de cuivre(F1)	740.921	2	370.461	8.394	0.00534
Génotype (F2)	9.768	1	9.768	0.221	0.65
Var. inter F1*F2	30.154	2	15.077	0.342	0.72094
Var. résiduelle 1	529.588	12	44.132		

- Potentiel osmotique (application 1)

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA
Dose de cuivre(F1)	98686.78	2	49343.39	2.232	0.14863
Génotype (F2)	48880.25	1	48880.25	2.211	0.15998
Var. inter F1*F2	181565.4	2	90782.72	4.107	0.05321
Var. résiduelle 1	265272.7	12	22106.05		

- Potentiel osmotique. (Application 2)

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA
Dose de cuivre(F1)	56380,33	2	28190,16	7,014	0,00965
Génotype (F2)	63249,39	1	63249,39	15,737	0,00192
Var. inter F1*F2	20522,13	2	10261,06	2,553	0,1179
Var. résiduelle 1	48230,66	12	4019,221		

- Teneur en chlorophylle a (application 1)

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA
Dose de cuivre(F1)	51.497	2	25.748	2.589	0.08255
Génotype (F2)	102.296	1	102.296	10.286	0.00238
Var. inter F1*2	174.157	2	87.078	8.756	0.00059
Var. résiduelle 1	537.048	54	9.945		

- Teneur en chlorophylle a (application 2)

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA
Dose de cuivre(F1)	169.979	2	84.989	8.906	0.00435
Génotype (F2)	20.136	1	20.136	2.11	0.16927
Var. inter F1*F2	5.36	2	2.68	0.281	0.76278
Var. résiduelle 1	114.513	12	9.543		

- Teneur en chlorophylle b (application 1)

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA
Dose de cuivre(F1)	0.485	2	0.243	0.039	0.96218
Génotype (F2)	1.495	1	1.495	0.238	0.6329
Var. inter F1*F2	14.592	2	7.296	1.162	0.32086
Var. résiduelle 1	338.919	54	6.276		

- Teneur en chlorophylle b (application 2)

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA
Dose de cuivre(F1)	12.295	2	6.148	4.068	0.04421
Génotype (F2)	0.172	1	0.172	0.114	0.73987
Var. inter F1*F2	2.19	2	1.095	0.725	0.50828
Var. résiduelle 1	18.134	12	1.511		

- Teneur en chlorophylle a+b (application 1)

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA
Dose de cuivre(F1)	60.12	2	30.06	6.166	0.004
Génotype (F2)	129.621	1	129.621	26.59	0.00001
Var. inter F1*F2	291.657	2	145.829	29.914	0
Var. résiduelle 1	263.242	54	4.875		

- Teneur en chlorophylle a+b (application 2)

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA
Dose de cuivre(F1)	276.305	2	138.153	7.653	0.00728
Génotype (F2)	24.23	1	24.23	1.342	0.26885
Var. inter F1*F2	13.897	2	6.949	0.385	0.69264
Var. résiduelle 1	216.612	12	18.051		

- Teneur en Caroténoïdes (application 1)

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA
Dose de cuivre(F1)	19.957	2	9.979	3.186	0.04805
Génotype (F2)	15.173	1	15.173	4.844	0.03036
Var. inter F1*F2	6.161	2	3.081	0.983	0.38245
Var. résiduelle 1	169.142	54	3.132		

- Caroténoïdes (application 2)

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA
Dose de cuivre(F1)	9.338	2	4.669	6.638	0.01146
Génotype (F2)	0.005	1	0.005	0.007	0.93262
Var. inter F1*F2	1.172	2	0.586	0.833	0.46135
Var. résiduelle 1	8.441	12	0.703		

- Protéines brutes (application 1)

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA
Dose de cuivre(F1)	417.078	2	208.539	488.301	0
Génotype (F2)	63.78	1	63.78	149.342	0
Var. inter F1*F2	8.244	2	4.122	9.652	0.00327
Var. résiduelle 1	5.125	12	0.427		

- Protéines brutes (application 2)

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA
Dose de cuivre(F1)	357.258	2	178.629	395.712	0
Génotype (F2)	239.653	1	239.653	530.897	0
Var. inter F1*F2	2.8	2	1.4	3.102	0.081
Var. résiduelle 1	5.417	12	0.451		

- Teneur en proline (application 1)

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA
Dose de cuivre(F1)	34339,36	2	17169,68	1,335	0,29985
Génotype (F2)	1043,297	1	1043,297	0,081	0,77666
Var. inter F1*2	9470,734	2	4735,367	0,368	0,70346
Var. résiduelle 1	154341	12	12861,75		

- Teneur en proline (application 2)

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA
Dose de cuivre(F1)	14730.02	2	7365.008	4.963	0.0266
Génotype (F2)	3024.699	1	3024.699	2.038	0.17629
Var. inter F1*2	3308.818	2	1654.409	1.115	0.36097
Var. résiduelle 1	17807.7	12	1483.975		

- Teneur en sucre soluble (application 1)

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA
Dose de cuivre(F1)	7516,646	2	3758,323	2,145	0,15849
Génotype (F2)	1106,732	1	1106,732	0,632	0,44725
Var. inter F1*2	59,439	2	29,72	0,017	0,9841
Var. résiduelle 1	21021,18	12	1751,765		

- Teneur en sucre soluble (application 2)

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA
Dose de cuivre(F1)	12484.97	2	6242.486	8.759	0.00461
Génotype (F2)	12708.74	1	12708.74	17.832	0.00124
Var. inter F1*2	28.275	2	14.138	0.02	0.98123
Var. résiduelle 1	8552.371	12	712.698		

- Poids sec de la partie racinaire. (application 1)

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA
Dose de cuivre(F1)	9.811	2	4.905	3.564	0.04325
Génotype (F2)	10.8	1	10.8	7.847	0.00961
Var. inter F1*F2	3.096	2	1.548	1.125	0.34222
Var. résiduelle 1	33.032	24	1.376		

- Poids sec de la partie racinaire (application 2)

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA
Dose de cuivre(F1)	63.725	2	31.862	41.016	0
Génotype (F2)	0.385	1	0.385	0.496	0.49457
Var. inter F1*F2	2.661	2	1.33	1.713	0.20029
Var. résiduelle 1	18.644	24	0.777		

- Poids sec de la partie aérienne. (Application 1)

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA
Dose de cuivre(F1)	44.579	2	22.289	1.774	0.18967
Génotype (F2)	61.061	1	61.061	4.859	0.03554
Var. inter F1*F2	16.994	2	8.497	0.676	0.52237
Var. résiduelle 1	301.584	24	12.566		

- Poids sec de la partie aérienne. (Application 2)

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA
Dose de cuivre(F1)	355.2	2	177.6	21.487	0.00001
Génotype (F2)	100.467	1	100.467	12.155	0.00198
Var. inter F1*F2	77.064	2	38.532	4.662	0.01921
Var. résiduelle 1	198.372	24	8.266		

- **Paramètres morphologiques**

- La surface foliaire.

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA
Dose de cuivre(F1)	518.893	2	259.446	1.576	0.21462
Génotype (F2)	49.593	1	49.593	0.301	0.59206
Var. inter F1*F2	1616.125	2	808.063	4.908	0.01097
Var. résiduelle 1	8890.244	54	164.634		

- Nombre de feuilles. (Application 1)

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA
Dose de cuivre(F1)	97.067	2	48.533	3.6	0.04209
Génotype (F2)	208.033	1	208.033	15.429	0.0007
Var. inter F1*F2	8.267	2	4.133	0.307	0.74265
Var. résiduelle 1	323.6	24	13.483		

- Nombre de feuilles. (Application 2)

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA
Dose de cuivre(F1)	305.867	2	152.933	15.659	0.00006
Génotype (F2)	246.533	1	246.533	25.242	0.00005
Var. inter F1*F2	29.867	2	14.933	1.529	0.23614
Var. résiduelle 1	234.4	24	9.767		

- Nombre de gousses (Application 1)

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA
Dose de cuivre(F1)	12.867	2	6.433	1.005	0.38267
Génotype (F2)	208.033	1	208.033	32.505	0.00001
Var. inter F1*F2	22.467	2	11.233	1.755	0.19283
Var. résiduelle 1	153.6	24	6.4		

- Nombre de gousses (Application 2)

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA
Dose de cuivre(F1)	12,867	2	6,433	1,005	0,38267
Génotype (F2)	208,033	1	208,033	32,505	0,00001
Var. inter F1*F2	22,467	2	11,233	1,755	0,19283
Var. résiduelle 1	153,6	24	6,4		

- Hauteur de tige. (Application 2)

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA
Dose de cuivre(F1)	2021.602	2	1010.801	3.638	0.04085
Génotype (F2)	7970.701	1	7970.701	28.69	0.00002
Var. inter F1*F2	279.198	2	139.599	0.502	0.6164
Var. résiduelle 1	6667.7	24	277.821		

- Hauteur de tige (Application 2).

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA
Dose de cuivre(F1)	3099.522	2	1549.761	20.113	0.00001
Génotype (F2)	8049.134	1	8049.134	104.46	0
Var. inter F1*F2	98.832	2	49.416	0.641	0.54002
Var. résiduelle 1	1849.308	24	77.054		

- Longueur racinaire (Application 1)

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA
Dose de cuivre(F1)	762.867	2	381.433	7.908	0.00239
Génotype (F2)	64.533	1	64.533	1.338	0.25794
Var. inter F1*F2	30.467	2	15.233	0.316	0.73614
Var. résiduelle 1	1157.6	24	48.233		

- Longueur racinaire (Application 2)

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA
Dose de cuivre(F1)	1886.264	2	943.132	36.891	0
Génotype (F2)	27.265	1	27.265	1.066	0.31317
Var. inter F1*F2	33.171	2	16.585	0.649	0.5362
Var. résiduelle 1	613.568	24	25.565		

- Volume racinaire (Application 1)

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA
Dose de cuivre(F1)	14885	2	7442.5	19.98	0.00001
Génotype (F2)	480	1	480	1.289	0.26699
Var. inter F1*F2	665	2	332.5	0.893	0.42544
Var. résiduelle 1	8940	24	372.5		

- Volume racinaire (Application 2)

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA
Dose de cuivre(F1)	19355	2	9677.499	55.832	0
Génotype (F2)	13.33	1	13.33	0.077	0.78016
Var. inter F1*F2	851.67	2	425.835	2.457	0.10525
Var. résiduelle 1	4160	24	173.333		

- **Paramètres anatomiques**

- Nombre des faisceaux cribro-vasculaire (Application 1)

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA
Dose de cuivre(F1)	2,167	2	1,083	1,3	0,34039
Génotype (F2)	1,333	1	1,333	1,6	0,25234
Var. inter F1*F2	1,167	2	0,583	0,7	0,53603
Var. résiduelle 1	5	6	0,833		

- Nombre des faisceaux cribro-vasculaire (Application 2)

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA
Dose de cuivre(F1)	0,167	2	0,083	0,028	0,97358
Génotype (F2)	1,333	1	1,333	0,444	0,53462
Var. inter F1*F2	2,167	2	1,083	0,361	0,71371
Var. résiduelle 1	18	6	3		

- Distance entre les faisceaux cribro-vasculaire (Application 1)

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA
Dose de cuivre(F1)	11424,14	2	5712,07	1,448	0,26055
Génotype (F2)	6666,297	1	6666,297	1,69	0,20771
Var. inter F1*F2	18025,38	2	9012,691	2,285	0,12884
Var. résiduelle 1	70984,76	18	3943,598		

- Distance entre les faisceaux cribro-vasculaire (Application 2)

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA
Dose de cuivre(F1)	6673,344	2	3336,672	0,372	0,69909
Génotype (F2)	112328,1	1	112328,1	12,515	0,0024
Var. inter F1*F2	25719,23	2	12859,62	1,433	0,26415
Var. résiduelle 1	161553,2	18	8975,18		

- Diamètre de méta-xylème (Application 1)

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA
Dose de cuivre(F1)	356,616	2	178,308	2,569	0,0868
Génotype (F2)	457,184	1	457,184	6,586	0,01339
Var. inter F1*F2	171,129	2	85,564	1,233	0,3019
Var. résiduelle 1	2915,423	42	69,415		

- Diamètre de méta-xylème (Application 2)

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA
Dose de cuivre(F1)	468,174	2	234,087	6,757	0,00298
Génotype (F2)	0,074	1	0,074	0,002	0,96211
Var. inter F1*F2	75,56	2	37,78	1,09	0,3464
Var. résiduelle 1	1455,078	42	34,645		

- Epaisseur des parois externe des cellules épidermiques (Application 1)

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA
Dose de cuivre(F1)	11,232	2	5,616	0,726	0,50739
Génotype (F2)	28,041	1	28,041	3,627	0,07838
Var. inter F1*F2	55,072	2	27,536	3,562	0,06022
Var. résiduelle 1	92,768	12	7,731		

- Epaisseur des parois externe des cellules épidermiques (Application 2)

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA
Dose de cuivre(F1)	9,879	2	4,939	0,661	0,53818
Génotype (F2)	13,942	1	13,942	1,866	0,19475
Var. inter F1*F2	48,89	2	24,445	3,271	0,07248
Var. résiduelle 1	89,669	12	7,472		

*Annexe n°3* : Photos des graines soumises aux différentes doses de cuivre (mesure de la longueur de la radicule).



En haut : le génotype Sidi Aïch, en bas : le génotype Super Aguadulce.

يعتبر النحاس من أهم المعادن الثقيلة السامة، حيث يسبب أضراراً كبيرة للنباتات. هذا العمل يقضي بإتباع سلوك نبات الفول (*Vicia faba* L.) تحت تأثير النحاس. مع العلم أن هذا النبات يستخدم كنموذج في دراسة البيئات السامة وذلك لتميزه بكتلة حيوية كبيرة وفترة نمو قصيرة. إن الهدف من عملنا هو دراسة تأثير النحاس المضاف على شكل كبريتات  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  وبتراكيزات مختلفة على السلوك المورفولوجي، الفسيولوجي والتشريحي وكذا على الآليات التي تشارك في عملية إنبات بذور النباتات الناتجة من صنف Super Aguadulce - Sidi Aïch. وقد عرضنا النباتات إلى إجهاد ناتج عن المعالجة بالنحاس بالتركيزات التالية 0، 100 و 200 ppm مع تطبيق هذا الضغط مرتين خلال دورة النمو للنبات.

أشارت النتائج أن هذه الضغوط أدت إلى اختلال في عملية الإنبات وفي الآليات المسؤولة على هذه العملية. لقد أدى تواجد النحاس أيضاً، إلى تقليل نشاط التمثيل الضوئي ومعالم إنتاج الكتلة الحيوية وقد رافقه كذلك انخفاض في نسبة البروتينات في البذور. أظهرت النتائج أيضاً تراكم السكريات الذائبة ومادة البرولين، معبرة بذلك عن آلية تنظيم الكيمون الداخلي أثناء الإجهاد المعدني. قد أشارت النتائج كذلك على أن تأثير الإجهاد النحاسي ونوع الصنف النباتي المدروس لهما مدلول كبير على مستوى السلوك التشريحي للنبات.

هذه النتائج تشير إلى أن وجود النحاس بتركيز عالية يغير الوظائف الطبيعية والتطور العادي للنباتات من خلال اضطرابات على المستوى المورفولوجي والفسيولوجي والبيوكيميائي والتشريحي.

**كلمات البحث:** النحاس، الصنف، الإجهاد، الفول، الصنف، الإجهاد، الفول، التأثيرات الفسيولوجية، التأثيرات المورفولوجية، التأثيرات التشريحية

## Abstract

Copper is one of the most toxic heavy metals, it causes considerable damage in plants. This work is to follow the behavior of the bean (*Vicia faba* L.) copper with stress of copper. This plant is used as a model in ecotoxicological studies due to its large amount of biomass and its short growing season.

The objective of our work is to study the influence of copper as sulfates  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  at doses of 0, 100 and 200 ppm, the morpho-physiological, anatomical and mechanisms behavior involved in the process of seed germination of plants from both varieties sidi Aich and super Aguadulce. The plant has been stressed at doses of copper of 0, 100 and 200 ppm. This stress was applied twice during the growing cycle of the plant.

The results indicate that seed germination is perturbed and the mechanisms controlling this process are changeable due to this stress. The presence of copper decreases the photosynthetic activity and production of biomass parameters accompanied by a reduction of the protein content in the grains of the culture. These results also show an accumulation of soluble sugars and proline, expressing a mechanism for regulating of the potential internal face of the action of metal stress. The effect of copper stress and type of the plant variety is significant on the anatomic parameter of the plant.

These results suggest that the presence of copper in high doses alters the normal functioning and development of plants by disturbances on the morphological, physiological, biochemical and anatomical behavior of the plant.

**KEYWORDS:** Copper, genotype, stress, *Vicia faba*, physiological behavior, morphological behavior, anatomical behavior, Sidi Aich, Super Aguadulce

## **RESUME**

Le cuivre est l'un des métaux lourds les plus toxiques, il cause des dégâts considérables au niveau des plantes. Ce travail consiste à suivre le comportement de la fève (*Vicia faba* L.) face au stress de cuivre. Cette plante est utilisée comme modèle dans les études écotoxicologiques grâce à sa biomasse importante et à son cycle végétatif court.

L'objectif de notre travail est d'étudier l'influence du cuivre sous forme de sulfates  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  à des doses de 0, 100 et 200 ppm, sur le comportement morpho-physiologique, anatomique et sur les mécanismes intervenant dans le processus de la germination des grains des plants issus de deux variétés sidi Aïch et super Aguadulce. La plante a été stressée à des doses de cuivre de 0, 100 et 200 ppm. Ce stress a été appliqué deux fois durant le cycle végétatif de la plante.

Les résultats trouvés révèlent que la germination des graines est perturbée et les mécanismes contrôlant ce processus s'avèrent très modifiés suite à ce stress. La présence du cuivre diminue l'activité photosynthétique et la production des paramètres de la biomasse accompagnée d'une réduction de la teneur en protéines au niveau des grains de la culture. Ces résultats montrent également une accumulation des sucres solubles et de la proline, exprimant un mécanisme de régulation du potentiel interne face à l'action du stress métallique. L'effet du stress de cuivre et la nature du génotype testé est significatif sur le comportement anatomique de la plante.

Ces résultats suggèrent que la présence du cuivre en fortes doses modifie le fonctionnement et le développement normal des plantes par des perturbations sur le plant morphologique, physiologique, biochimiques et anatomique.

**MOTS CLES :** Cuivre, génotype, stress, *Vicia faba*, *Sidi Aïch*, *Super Aguadulce*, paramètres morphologiques, paramètre physiologiques, paramètre anatomiques.