N° Ordre...../FS/UMBB/2020

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE M'HAMED BOUGARA-BOUMERDES

Faculté des sciences

Thèse de Doctorat

Présentée par :

Mme BENHABILES Epouse AIT EL HOCINE Krenfla

En vue de l'obtention du diplôme de **DOCTORAT** en sciences en **:**
Filière : Sciences biologiques
Option : Ecologie et environnement

Sujet

Evaluation de la toxicité du cadmium sur deux fabaceae (*Phaseolus vulgaris et Vicia faba*) : Etude des paramètres morphologiques, physiologiques, biochimiques, et anatomiques

Devant le jury composé de:

Mr RIBA A.	Professeur A à l'UMB Boumerdès	Président
Mr AMGHAR F.	Maitre de Conférences A à l'UMB Boumerdès	Directeur de thèse
Mr DJEBBAR R.	Professeur à l'USTHB Alger	Examinateur
Mr HOUHAMDI M.	Professeur à l'université de Guelma	Examinateur
Mr BARA M.	Maitre de Conférences A à l'université de Guelma	Examinateur
Mme AIT KAKI S.	Maitre de Conférences A à l'UMB Boumerdès	Examinatrice

Année universitaire : 2020/2021

REMERCIEMENTS

Par ces quelques lignes, je tiens à remercier toutes les personnes qui ont participé de prés ou de loin au bon déroulement de cette thèse, en espérant n'avoir oublier personne…

Je tiens à remercier spécialement mon directeur de thèse Mr AMGHAR Fateh. Je vous remercie d'avoir cru en mes capacités, d'avoir bien assuré la direction et l'encadrement de mes travaux de thèse en me fournissant d'excellentes conditions logistiques. Je garderai dans mon cœur votre générosité, votre compréhension et votre efficacité. J'ai beaucoup apprécié de travailler à vos côtés tant sur le plan scientifique que sur le plan humain. Pour tout ce que vous m'avez donné, je vous remercie très sincèrement.

Mes sincères remerciements et ma gratitude vont aussi au Pr RIBA Ammar pour avoir accepte de juger ce travail et d'en présider le jury de soutenance. Que vous soyez assuré de mon entière reconnaissance.

Mes plus vifs remerciements à Madame AIT KAKI Sabrina de l'Université de Boumerdes, pour l'immense privilège qu'elle me fait en acceptant d'examiner ce travail.

Ma plus profonde gratitude au Professeur HOUHAMDI Moussa de l'Université de Guelma, d'avoir bien voulu participer à ce jury.

Mes plus vifs remerciements au Professeur DJEBAR Reda de l'USTHB de Beb Ezzour, pour l'attention qu'il portera à mon travail.

Je suis reconnaissante à Monsieur BARA Mouslim de l'Université de Guelma, d'avoir bien voulu participer à ce jury.. Je lui adresse mes sentiments les plus respectueux.

Au cours des travaux effectués, j'ai eu recours à plusieurs reprises aux services de Mr BELLOUT Yacine , maitre de conférence B de l'université de Boumerdes,

qui n'a jamais cessé de m'aider et de me fournir les éléments nécessaires à la réalisation de ce travail. Qu'il veuille trouver ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

J'exprime toute ma sympathie à ceux qui, à divers titres, m'ont aidé à réaliser ce travail, en particulier :

Mme DIAF Loundja ingénieur de laboratoire d'écologie et environnement pour avoir mis à ma disposition le matériel nécessaire pour mon expérimentation

Mme Zerrouki F. Directrice de l'Institut de Technologie Moyen Agricole d'Alger (ITMA d'Alger) de nous avoir accueillir dans son établissement.

Je voudrai adresser ma reconnaissance aux enseignants de la spécialité écologie et environnement pour leurs qualités humaines et leurs encouragements, en particulier Mr LATRECHE Khaled pour nos innombrables et inoubliables conversations sur les polyphénols toujours plus intéressantes, et Mr HARITI M'hamed, avec mes meilleurs souhaits pour la suite de leurs carrières.

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

A mes deux petits princes Islem et Oussama qui sont les plus chers à mes yeux.

Merci à ma famille et à mes amis qui m'ont beaucoup encouragé lorsque j'en ai eu besoin.

Résumé

Parmi les principaux polluants générés par les activités humaines, les éléments traces métalliques ; posent des problèmes particulièrement préoccupants pour l'environnement et la santé publique citons le Chrome, le Plomb, et le Cadmium. Le cadmium (Cd) est l'un des éléments les plus importants en raison de sa grande mobilité et de sa toxicité envers les plantes. Notre travail vise à évaluer l'effet du cadmium sur les aspects biométriques, biochimiques et physiologiques, les changements anatomiques et la teneur en composés phénoliques de deux plantes *Phaseolus vulgaris* L. et *Vicia faba L*. Les plantules sont exposés à des concentrations croissantes de Cd : 0,25; 0,5 et 1 $g.l^{-1}$ pendant 21 jours. Les résultats obtenus montrent que le cadmium diminue considérablement le pourcentage de germination des graines, l'allongement des radicaux embryonnaires, le poids sec de la plante, la longueur de la tige / racine et le nombre de feuilles et de racines latérales. Parallèlement, on observe une diminution de la teneur en chlorophylle et en protéines avec tous les traitements pour les deux plantes; cependant, la teneur en sucre et en proline ont augmenté de manière significative avec la concentration de 1 $g.l^{-1}$ de Cd. La teneur en polyphénols totaux a augmenté d'environ 43% et 32% dans la partie aérienne et souterraine respectivement chez *phaseolus vulgaris* , et de 43 % et 39% chez *Vicia faba.* Les flavonoïdes, les flavonols, les tanins hydrolysables et les tanins condensés ont montré une augmentation significative avec la concentration la plus élevée de cadmium. Le cadmium a également modifié l'anatomie des racines et des tiges des plantes; une diminution du nombre et de la taille des vaisseaux du xylème et un retard dans la différenciation du xylème ont été observés.

Mots clés: Cadmium, *Phaseolus vulgaris* L., *Vicia faba* L., croissance, changements histologiques, composés phénoliques

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION 1

I. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE.....4

I.1. Généralités sur les éléments traces métalliques.....4

I.2. Le Cadmium 4
I.2.1. Origines du cadmium dans le sol.....4
1.2.1.1. Origine naturelle 4
1.2.1.2. Origines anthropiques 5
1.2.1.2.1. Rejets d'origine industrielle 5
1.2.1.2.2. Les pratiques agricoles.....5
1.2.1.3. Toxicité du cadmium chez les mammifères et santé humaine 8

I.3. Cadmium et plantes 9
I.3.1. Phytodisponibilité du cadmium 9
I.3.1.1. Notion de phytodisponibilité.....9
I.3.1.2. Distribution du cadmium au niveau du sol 9
I.3.1.3. Facteurs influençant la phytodisponibilité du cadmium.....10
I.3.1.3.1 Influence du pH.....11
I.3.1.3.2. Influence de la matière organique et de la capacité d'échange cationique.....11
I.3.1.3.3. Salinité 11
I.3.1.3.4. Température du sol et humidité.....11

I.3.2. Phytotoxicité du cadmium.....12
I.3.2.1. Effet du cadmium sur la croissance.....13
I.3.2.2. Effet du cadmium sur la photosynthèse.....13
I.3.2.3. Effets sur les processus métaboliques 14
I.3.2.4. Effet sur la nodulation 14
I.3.2.5. Induction d'un stress oxydatif 15
I.3.2.5.1. Le système antioxydant.....15
I.3.2.5.2. Induction de synthèse des composés phénoliques.....16
I.3.2.6. Induction d'une génotoxicité par le cadmium 17

I.3.2.7. Effets du cadmium sur l'absorption et l'assimilation d'éléments minéraux 18
I.3.2.8. Effet du cadmium sur l'absorption et le transport de l'eau.....19
I.3.2.9. Changements anatomiques majeurs induits par le cadmium et anomalies chez les plantes.....19

I.3.3. Stratégies des plantes vis-à-vis le cadmium.....22
I.3.3.1. La chélation et la séquestration du cadmium.....22
I.3.3.1.1. Les phytochélatines.....22
I.3.3.1.2. Les métallothionéines.....23
I.3.3.1.3. Autres chélateurs.....24
I.3.3.1.4. Séquestration dans la vacuole via les transporteurs tonoplastiques.....24
I.3.3.2. Autres mécanises.....25

I.3.4. Absorption, translocation et accumulation du cadmium.....25
I.3.4.1. Absorption du cadmium.....25
I.3.4.2. Translocation.....27
I.3.4.3. Accumulation.....28

I.4. Généralité sur les espèces étudiées.....29
I.4.1. La Fève (*Vicia faba*.L).....29
I.4.1.1. Classification phylogénique APG III.....29
I.4.1.2. Origine et répartition géographique.....30
I.4.1.3. Description.....30
I.4.1.4. Cycle végétatif.....31
I.4.1.5. Exigences climatiques et édaphiques.....32
I.4.1.6. Importance de la culture de la Fève.....33
I.4.1.7 Production de la fève en Algérie.....33

I.4.2. Le haricot (*Phaseolus vulgaris.L*).....33
I.4.2.1. Origine et répartition géographique.....33
I.4.2.2. Classification.....34
I.4.2.3. Description.....34
I.4.2. 4. Cycle végétatif.....35
I.4.2. 5. Exigences climatiques et édaphiques.....36
I.4.2. 6. Importance de la culture du haricot.....36

I.4.2. 7. Production du haricot en Algérie.....36

II. APPROCHE METHODOLOGIQUE.....37
II.1. Choix du matériel végétal.....37
II.2. Condition de culture et échantillonnage.....37
II.3. Essai de germination et d'élongation des radicules.....38
II.4. Etude des paramètres morphologiques et statut hydrique.....39
II.4.1. Détermination de l'indice de tolérance.....39
II.4.2. Détermination de la teneur relative en eau (TRE).....40
II.5. Etude des paramètres biochimiques et physiologiques.....40
II.5.1. Détermination des pigments photosynthétiques.....40
II.5.2. Détermination des sucres solubles totaux.....41
II.5.3. Détermination de la teneur totale en protéines.....41
II.5.4. Détermination du contenu en proline.....42
II.6. Détermination des teneurs en composés phénoliques.....42
II.6.1. Traitement et conservation des échantillons.....42
II.6.2. Préparation des extraits bruts (composés phénoliques).....43
II.6.3. Dosage des composés phénoliques.....43
II.6.3.1. Polyphénols totaux.....43
II.6.3.2. Flavonoïdes.....44
II.6.3.3. Flavonols.....44
II.6.3.4. Tanins condensés.....45
II.6.3.5. Tanins hydrolysables.....45
II.7. Etude anatomique.....45
II.8. analyses statistiques.....46

III. RESULTATS ET DISCUSSION.....47
III.1. Effet du Cd sur la germination et l'élongation de la radicule de *Phaseolus vulgaris L.* et *Vicia faba L.*.....47

III.2. Effet du Cd sur la croissance des plantules de *Phaseolus vulgaris* L. et *Vicia faba* L.....49
III.2.1. Effet sur la hauteur de la tige et la longueur de la racine primaire.....51
III.2.2.Effet sur le nombre de feuilles et de racines secondaires.....52
III.2.3. Effet sur le poids de la matière végétale sèche.....53

III.2.4. L'indice de tolérance 54
III.2.5. Effet sur la teneur relative en eau (TRE) 55

III.3. Effet du Cd sur les paramètres biochimiques et physiologiques des plantules 58
III.3.1. Effet sur les pigments photosynthétiques 58
III.3.1.1. Teneur en chlorophylles totales 58
III.3.1.2. Teneur en caroténoïdes.....59
III.3.2. Effet sur la teneur en sucres solubles des feuilles 60
III.3.3. Effet sur la teneur en protéine 61
III .3. 4. Effet sur la teneur en proline libre.....62

III.4. Effet du Cd sur la teneur en composés phénoliques 67
III.4.1. Effet du Cd sur la teneur en polyphénols totaux.....67
III.4.2. Effet du Cd sur la teneur en flavonoïdes 68
III.4.3. Effet du Cd sur la teneur en flavonols 69
III.4.4. Effet du Cd sur la teneur en tanins hydrolysables.....71
III.4.5. Effet du Cd sur la teneur en tanins condensés 72

III.5. Effet du Cd sur l'anatomie des plantules de *Phaseolus vulgaris* L. et *Vicia faba* L. 76
III.5.1.Anatomie des tiges 76
III.5.2. Anatomie des racines.....79

IV. CONCLUSION…… 87

V. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES ……..…… .. 89

Liste des abréviations et acronymes

ABC: ATP-Binding Cassette

ADN : Acide désoxy ribo nucléique

$AlCl_3$: Chlorure d'aluminium

APG : Angiosperm Phylogeny Group

As : Arsenic

ASMIDAL : Entreprise nationale des engrais

ATH : Anthocyanines

ATP : Adénosine triphosphate

BSA : Serum albumine bovins

Ca : Calcium

CAD : Alcool cinnamylique déshydrogénase

CAT : Catalase

CAX: Calcium exchanger

Cd : Cadmium

$CdCl_2$: Chlorures de cadmium

CDKs : Protéines-kinases-cycline dépendantes

CEC : Capacité d'échange cationique

Chl: Chlorophylle

CO_2: Dioxyde de carbone

Cu : Cuivre

Cyst : Cystéine

EAG : équivalent acide gallique

EAT : équivalent d'acide tannique

EC : équivalent de catéchine

ERO : Espèces réactives de l'oxygène

ETM : Eléments traces métalliques

Fe : Fer

GK : Glutamate kinase

Glut : Glutamate

GSH : forme réduite du glutathion

Hcl : Acide chlorhydrique

Hg : Mercure

HMA: Heavy Metal ATPase

ITGC : Institut Technique des Grandes Cultures- Alger

K : Potassium

L'ion superoxyde : O^{-}_{2}

Le peroxyde d'hydrogène : H_2O_2

Les radicaux hydroxyles : $OH^{\bullet}$

Mg : Magnésium

$MgCl_2$: chlorure de magnésium

Mn : Manganèse

MS : Matière sèche

MT : métallothionéines

MVF : Matière végétale fraîche

MVS : Matière végétale sèche

NaCl: Chlorures de sodium

Ni : Nikel

NRAMP: Natural Resistance Associated

OAT : Ornithine aminotransférase

PAL : Phénylalanine ammoniac-Liaza

PCR: Polymerase Chain Reaction = Réaction

PCs : Phytochélatines

PDH : Proline déshydrogénase

ppm : Partie par million

PPO : Polyphénol oxydase

PSI: Photosystème I

PSII: Photosystème II

ROS : Reactive Oxygen Species

SKDH : Shikimate déshydrogénase

TRE : Teneur relative en eau

Tris HCL : Tris hydrochloride

ZIP: ZRT-IRT-like Proteins

Zn : Zinc

Liste des figures

- Figure I.1 : Schéma récapitulatif des principaux compartiments du sol et processus physico-chimiques et biologiques impliqués dans le devenir du Cd dans les sols …… 10
- Figure I.2 : Production des espèces réactives de l'oxygène (ROS) par les métaux lourds … ……..…15
- Figure I.3 : Mécanismes d'action antioxydante des composés phénoliques ……17
- Figure I.4 : Régulation de la biosynthèse des phytochélatines (PCs) et du glutathion (GSH) chez les plantes …….……23
- Figure I.5 : Mécanismes moléculaires de la cellule végétale en réponse au Cd ……..…....26
- Figure I.6 : Représentation schématique des mécanismes possibles de transport, de désintoxication et de dépôt de métaux lourds de différents organes subcellulaires dans les cellules racinaires des plantes…… 28
- Figure I.7 : L'espèce *Vicia faba* L…….…….31
- Figure I.8 : Cycle de développement de la fève ……..… 32
- Figure I.9: L'espèce *Phaseolus vulgaris* L……....34
- Figure I.10 : Cycle de développement de la plante de *Phaseolus vulgaris*……35
- Figure II.1 : Schéma expérimental de test de germination ……38
- Figure II.2 : Schéma expérimental des étapes de préparation des extraits bruts des plantes étudiées ……..43
- Figure II.3 : Schéma de localisation des coupes au niveau des racines(A) et des tiges (B)….....46
- Figure III.1 : Effet du Cd sur (A) la cinétique de germination (B) l'élongation de la radicule des graines de haricot commun (*Phaseolus vulgaris* L)…….47
- Figure III.2 : Effet du Cd sur (A) la cinétique de germination (B) et (C) l'élongation de la radicule des graines de la fève (*Vicia faba*)……48
- Figure III.3 : Morphologie de la fève (*Vicia faba*, L)……50
- Figure III.4 : Morphologie de haricot (*Phaseolus vulgaris*. L)……..50
- Figure III.5 : Effet du Cd sur la hauteur des pousses et la longueur de la racine primaire de haricot commun (*Phaseolus vulgaris* L). ……...51
- Figure III.6 : Effet du Cd sur la hauteur de la tige et la longueur de la racine primaire de la fève (*Vicia faba*)…….52

- Figure III.7 : Effet du Cd sur le nombre de feuilles et de racines secondaires de haricot commun (*Phaseolus vulgaris* L)…….52
- Figure III.8 : Effet du Cd sur le nombre de feuilles et de racines secondaires de la fève (*Vicia faba* L)……..53
- Figure III.9: Effet du Cd sur le poids de la matière végétale sèche de haricot commun (*Phaseolus vulgaris* L)……53
- Figure III.10: Effet du Cd sur le poids de la matière végétale sèche de la fève (*Vicia faba* L)……..54
- Figure III.11 : Effet du Cd sur la teneur relative en eau de *Phaseolus vulgaris* L.……55
- Figure III.12 : Effet du Cd sur la teneur relative en eau de *Vicia faba* L……..56
- Figure III.13 : Effet du Cd sur la teneur en chlorophylles totales de haricot commun *(Phaseolus vulgaris* L)……58
- Figure III.14: Effet du Cd sur la teneur en chlorophylles totales de la fève (*Vicia faba* L) ……..59
- Figure III.15 : Effet du Cd sur la teneur en caroténoïdes de haricot commun (*Phaseolus vulgaris* L)……..59
- Figure III.16 : Effet du Cd sur la teneur en caroténoïdes de la fève (*Vicia faba* L)……..60
- Figure III.17: Effet du Cd sur la teneur en sucres solubles de haricot commun (*Phaseolus vulgaris* L)……..61
- Figure.III.18 : Effet du Cd sur la teneur en sucres solubles de la fève (*Vicia faba* L)……..61
- Figure.III.19 : Effet du Cd sur la teneur en proteines de haricot commun (*Phaseolus vulgaris* L)…….62
- Figure III.20 : Effet du Cd sur la teneur en protéines de la fève (*Vicia faba* L)……62
- FigureIII.21: Effet du Cd sur la teneur en proline de haricot commun (*Phaseolus vulgaris* L)…… .63
- Figure III.22: Effet du Cd sur la teneur en proline de la fève (*Vicia faba* L). ……..63
- Figure III.23 : Effet du Cd sur la teneur en polyphénols totaux de haricot commun (*Phaseolus vulgaris* L)……67
- Figure III.24: Effet du Cd sur la teneur en polyphénols totaux de la fève (*Vicia faba* L)….68
- Figure III.25 : Effet du Cd sur la teneur en flavonoïdes de haricot commun (*Phaseolus vulgaris* L)……..68
- FigureIII.26: Effet du Cd sur la teneur en flavonoïdes de la fève (*Vicia faba* L)…….69

- Figure III.27 : Effet du Cd sur la teneur en flavonols de haricot commun (*P. vulgaris* L)……...70
- Figure III.28 : Effet du Cd sur la teneur en flavonols de la fève (*Vicia faba* L)……70
- Figure III.29 : Effet du Cd sur la teneur en tanins hydrolysables de haricot commun (*Phaseolus vulgaris* L)……71
- Figure III.30: Effet du Cd sur la teneur en tanins hydrolysables de la fève (*Vicia faba* L)……..71
- Figure III.31: Effet du Cd sur la teneur en tanins condensés de haricot commun (*Phaseolus vulgaris* L). ……..…..72
- Figure 32: Effet du Cd sur la teneur en tanins condensés de la fève (*Vicia faba* L). …… .73
- Figure III.33: Coupes transversales de tiges de haricot commun des plantes témoins (A, E) et traitées au Cd: 0,25 g.l-1 (B, F); 0,5 g.l-1 (C, G); 1 g.l-1 (D, H) observées au microscope photonique. ……77
- Figure III.34 : Coupes transversales de tiges de la fève des plantes témoins (A, E) et traitées au Cd: 0,25 g.l-1 (B, F); 0,5 g.l-1 (C, G); 1 g.l-1 (D, H) observées au microscope photonique. ……79
- Figure III.35: Coupes transversales de racines de haricot commun des plantes témoins (A, E) et traitées au Cd: 0,25 g.l-1 (B, F); 0,5 g.l-1 (C, G); 1 g.l-1 (D, H) observées au microscope photonique. …….81
- Figure III.36 : Coupes transversales de racines de la fève des plantes témoins (A, E,I) et traitées au Cd: 0,25 g.l-1 (B, F, J); 0,5 g.l-1 (C, G, K); 1 g.l-1 (D, H, L) observées au microscope photonique……...83
- Figure III.37 : Schéma simplifié de la mise en place et du fonctionnement du cambium……85

Liste des tableaux

- Tableau I.1 : Teneur en cadmium dans des phosphates naturels sédimentaires……..…6
- Tableau I.2: Production et utilisation des engrais phosphatés en Algérie (FAOSTAT, 2017)…….…..7
- Tableau I.3 : Teneur en cadmium dans les principales sources de pollution des sols agricoles……..……7
- Tableau III.1: Valeurs de l'indice de tolérance des plantules de haricot commun et de la fève en fonction des concentrations du Cd…….……55

INTRODUCTION

INTRODUCTION

La pollution par les éléments traces métalliques (ETM) est devenue un problème d'importance majeur pour notre environnement, la présence de ces contaminants, à des concentrations supérieures aux charges naturelles, est un problème de plus en plus préoccupant. Contrairement à d'autres polluants, les ETM ne se dégradent pas et s'accumulent discrètement, pour finir par atteindre des seuils toxiques. Cette accumulation dans la biosphère perturbe le développement des végétaux, de la microflore et de la microfaune du sol.

Parmi les éléments traces métalliques qui affectent le sol et l'eau, le cadmium (Cd) est l'un des polluants métalliques les plus importants en raison de sa grande mobilité dans le sol, les plantes et les systèmes aquatiques (Manquián-Cerda *et al*., 2016).

Les agro-écosystèmes modernes reçoivent continuellement des quantités croissantes de cadmium (Cd) provenant de plusieurs activités domestiques et industrielles, ainsi que l'application agricole d'engrais phosphatés, de boues d'épuration et d'eau d'irrigation contaminées par cet élément; menant à une contamination du sol au Cd et à une absorption accrue de Cd par les plantes cultivées dans ces milieux (McLaughlin *et al*., 2006; Escudey *et al*., 2007). Le cadmium peut être trouvé dans les sols, atteignant des niveaux d'environ 1 $mg.kg^{-1}$ pour la plupart des sols de surface (Kabata-Pendias, 2000). Il est relativement facilement disponible pour être absorbé par les plantes car il se trouve principalement dans la solution du sol ou lié à des systèmes en phase solide (Verbruggen *et al*., 2009). L'accumulation de Cd dans les plantes présente un risque toxique pour l'homme, car les plantes cultivées sont le point d'entrée dans la chaîne alimentaire (Mensch et Baize, 2004).

Chez les plantes, l'exposition au cadmium provoque des symptômes de phytotoxicité sur le plan morphologique, physiologique et biochimique. En effet selon Gratao *et al.* (2009) la réduction de la biomasse ainsi que l'inhibition de l'élongation des racines a été observée chez plusieurs espèces. Le Cd entraîne également la réduction de la photosynthèse, la respiration et la transpiration (Seregin et Ivanov, 2001; He *et al*., 2017; Yazdi *et al*., 2019), la germination des graines (Chugh *et al*., 1995; Fattahi *et al*., 2019) et interfère avec l'absorption, le transport et la distribution des éléments minéraux essentiels et non essentiels, en particulier dans la forme de Cd^{2+} (He *et al*., 2017). La toxicité du Cd déclenche une hyper-accumulation d'espèces réactives de l'oxygène, entraînant finalement un stress oxydatif chez les plantes

(Cuypers *et al*., 2011; Anjum *et al*., 2015; Gupta *et al*., 2017). Les molécules antioxydantes produites par les plantes en réponse à l'absorption de Cd sont considérées comme un mécanisme de défense contre le stress métallique. Dans ce contexte, de nombreuses études ont montré les propriétés de piégeage des radicaux par les polyphénols (Michalak, 2010; Cruces *et al*., 2015; Manquián-Cerda *et al*., 2016). Il a été observé que les plantes exposées au stress métallique exsudaient des niveaux élevés de composés phénoliques (Posmyk *et al*., 2009; Mongkhonsin *et al*., 2016; Manquián-Cerda *et al*., 2018).

Les effets néfastes du Cd dans les sols comprennent également des modifications anatomiques telles que la variation de l'organisation des tissus racinaires, le développement de barrières apoplastiques (Vaculík *et al*., 2012), et les modifications structurelles du système vasculaire des plantes (Barcelo *et al*., 1988).

Le haricot commun (*Phaseolus vulgaris* L.) et la fève (*Vicia faba L.*) sont parmi les légumineuses à grains les plus importantes au monde; ils constituent une source de nourriture précieuse pour les humains du monde entier et représente une consommation et une importance économique plus élevées. Ces plantes sont potentiellement exposées au Cd en raison de l'utilisation d'amendements de fongicides et d'engrais en agriculture à travers le monde.

Cette étude est assignée comme objectif l'évaluation de l'effet de Cd sur : (i) les paramètres morphologiques et physiologiques, (ii) l'accumulation de polyphénols dans les plantules de haricot commun et de la fève, et (iii) sur la structure des racines et des tiges des deux plantes afin de dresser une image la plus fiable des troubles structurels induits par le Cd dans les vaisseaux. Cela devrait contribuer à cerner les réponses du haricot commun et de la fève au stress au Cd.
Au cour de notre expérimentation, nous avons testé plusieurs éléments métalliques dont les résultats n'étaient pas probants comparativement au Cd, ceci nous a encouragé à explorer la piste du Cd vu l'importance des effets toxiques qu'il a exercés sur les deux plantes. De plus il constitue le principal élément lié aux activités agricoles

Le présent manuscrit s'articule autour de trois parties. La première partie est une synthèse bibliographique où sont exposées les données relatives à la description des deux plantes étudiées, des éléments traces métalliques et particulièrement de Cd, de la phytotoxicité du

cadmium et la réponse des plantes au cadmium, ainsi que l'absorption et l'accumulation du cadmium. La seconde partie, expose la démarche méthodologique, qui décrit les différents protocoles expérimentaux utilisés pour les études morphologique, biochimique, physiologique et anatomique ainsi que la détermination des teneurs en polyphénols.

La troisième partie est consacrée à l'interprétation et à la discussion des résultats obtenus.

Nous terminons par une conclusion générale et des perspectives.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1. Généralités sur les éléments traces métalliques

Les éléments traces métalliques sont généralement définis comme des métaux lourds, c'est-à-dire des éléments métalliques dont la masse volumique est supèriere à 5 g/cm3. Cependant, la classification en métaux lourds est souvent discutée car certains métaux toxiques ne sont pas particulièrement « lourds » (par exemple le zinc), tandis que certains éléments toxiques ne sont pas des métaux (c'est le cas de l'arsenic qui est un métalloïde). Ce terme générique désigne donc indistinctement des métaux et métalloïdes réputés toxiques. Pour ces différentes raisons, l'appellation « éléments traces métalliques » -ETM- ou par extension « éléments traces » est préférable à celle de métaux lourds. Ceux-ci sont présents le plus souvent dans l'environnement sous forme de traces. Les plus toxiques d'entre eux sont le cadmium, l'arsenic, le plomb et le mercure. Alors que de nombreuses molécules organiques peuvent être dégradées, les ETM ne le peuvent pas et leur concentration augmente régulièrement dans les sols et les eaux. Certains éléments métalliques sont essentiels aux organismes vivants à de faibles concentrations ; mais ils agissent à de fortes concentrations comme un facteur de stress qui entraîne une modification de la réaction physiologique.

Dans le sol, les ETM sont d'origine naturelle en raison de leur présence dans les roches mères, mais aussi ils peuvent être extraits de gisements ou déplacés d'un sol à l'autre par des actions anthropiques et proviennent alors d'activités agricoles, industrielles, et domestiques.

L'exposition excessive aux ETM peut conduire à des effets très néfastes sur la santé humaine. Comme les végétaux sont à la base de la chaîne alimentaire, ils contribuent à l'imprégnation de l'homme par ces ETM, d'où l'intérêt d'étudier et de contrôler l'accumulation des ETM dans les végétaux (Kabata-Pendias, 2000).

I.2. Le Cadmium

Le cadmium est un métal d'un blanc argenté, brillant mais qui se ternit ; il est malléable et ductile, et sa pression de vapeur est assez élevée. Il se manifeste presque toujours à l'état divalent ; chimiquement, il ressemble beaucoup au zinc et le remplace isomorphiquement dans presque tous ses minerais (Cotton et Wilkinson, 1972).

I.2.1. Origines du cadmium dans le sol

1.2.1.1. Origine naturelle

Le cadmium est un métal relativement rare présent dans l'environnement principalement en association avec le zinc, le plomb et le cuivre. Au cours des temps géologiques, cet élément a

suivi un cycle qui a conduit à une distribution hétérogène de sa concentration à la surface du globe (Brignon et Malherbe, 2005). La moyenne des concentrations en cadmium sur la terre est estimée entre 0,1 et 2 ppm et la plupart du temps il est inférieur à 1 ppm (Kabata-Pendias *et al*., 2001). Des niveaux beaucoup plus élevés peuvent s'accumuler dans les roches sédimentaires, et les phosphates marins et les phosphorites semblent contenir des niveaux pouvant atteindre 500 ppm (Cook et Morrow 1995 , OMS 1992).

L'altération et l'érosion de la roche mère va libérer une quantité importante de cadmium qui sera transportée par les eaux continentales. L'activité volcanique et les feux de forêts sont une source conséquente de libération du cadmium dans l'atmosphère. Il a ainsi été estimé que les apports naturels de cadmium étaient d'environ 800 à 1000 tonnes par an dans l'environnement (OMS 1992 , OCDE 1994).

1.2.1.2. Origines anthropiques

1.2.1.2.1. Rejets d'origine industrielle

Il s'agit des retombées atmosphériques provenant de l'activité industrielle et du trafic urbain, ainsi que du rejet des déchets industriels. Le cadmium contenu dans les produits en fin de vie ou de celui existant dans des effluents liquides issus des usines contribuent également à la pollution des sols et des eaux de surface et souterraines (He *et al*., 2005).

Le cadmium est principalement utilisé dans la production de batteries d'accumulateurs (en particulier des accumulateurs rechargeables au nickel-cadmium, ou accumulateurs Ni-Cd , dans la fabrication des pigments pour peintures et des matières plastiques , des produits en céramique, en verre et en émail, et des couleurs fines (jaune et rouge). Les sels de cadmium servent quant à eux de stabilisants dans le polychlorure de vinyle. Ils sont employés dans la production de revêtements qui protègent le matériel électronique et les produits en acier et en aluminium de la corrosion. Le cadmium est également utilisé dans une moindre mesure pour la fabrication d'alliages, de piles photovoltaïques et d'autres semi-conducteurs (Korte, 1983 ; Merian, 1984, Brignon et Malherbe, 2005, INRS 2013).

1.2.1.2.2. Les pratiques agricoles

Le cadmium est présent de façon plus ou moins importante dans quatre principales activités agricoles qui sont présentées ci-dessous par ordre décroissant selon leurs apports en cadmium sur les sols agricoles :

Les fertilisants minéraux phosphatés : Les fertilisants phosphatés peuvent présenter des teneurs en cadmium très importantes. Ils proviennent de l'exploitation de gisements naturels de phosphate de calcium qui se trouvent principalement aux USA, en Chine, au

Maroc, en Russie, en Tunisie et au Moyen-Orient. Selon le gisement, le phosphate naturel contient plus ou moins de cadmium ; ce dernier s'y trouve comme une impureté que les procédés classiques de fabrication de l'engrais ne permettent pas d'éliminer du produit final. Le tableau I.1 montre les résultats d'une analyse chimique des teneurs en cadmium dans certains échantillons de phosphates naturels sédimentaires (Van Kauwenbergh, 1997).

Tableau I.1 *: Teneur en cadmium dans des phosphates naturels sédimentaires* (*Van Kauwenbergh, 1997)*

Pays	Dépot	Cadmium (mg/Kg)
Algérie	Djebel Onk	13
Burkina Faso	Kodjari	< 2
Chine	Kaiyang	< 2
Etats unis	Caroline du nord	33
Inde	Mussoorie	8
Jordanie	El Hassa	4
Mali	Tilemsi	8
Maroc	Khouribga	3
Pérou	Sechura	11
Tanzanie	Minjingu	1
Sénégal	Taiba	87
Togo	Hahotoe	48
Tunisie	Gafsa	34
Venezuela	Riecito	4

En Algérie, le cadmium est présent dans les phosphates naturels qui contiennent 13 mg/Kg de phosphates naturels sédimentaires (Van Kauwenbergh, 1997).

Selon ASMIDAL (2004), l'Algérie utilise peu d'engrais comparativement à d'autres pays africains tel le Maroc par exemple, l'utilisation reste stabilisée autour de 100000 tonnes d'éléments fertilisants alors que la moyenne mondiale est de 850000 tonnes par an. Le tableau I.2 présente les quantités d'engrais phosphatés utilisée par an en Algérie.

Déjection animales : L'alimentation de certains animaux est souvent complétée en phosphore. Ce rajout peut apporter du cadmium qui est naturellement présent sous la forme d'impuretés dans les matières premières (phosphates) (SOGREAH, 2007).

Tableau I.2: *Production et utilisation des engrais phosphatés en Algérie (FAOSTAT, 2017)*

Année	Production (tonne)	Utilisation à des fins agricoles (tonne)
2008	11580	20760
2009	17400	48800
2010	22800	32800
2011	25000	36500
2012	31200	57500
2013	27800	71300
2014	31900	78000
2015	28200	63200
2016	32400	58800
2017	32400	58800

Épandage de boues, composts et autres produits : Ces produits proviennent de boues résiduaires urbaines, de composts d'origine résiduaire et de déchets d'industries. Ils sont valorisés par épandage pour leurs rôles fertilisants ou d'amendement. Ce type d'épandage reste faible mais les teneurs en Eléments Traces Métalliques (ETM), et notamment en cadmium, sont relativement élevées (SOGREAH, 2007).

Tableau I.3 *: Teneur en cadmium dans les principales sources de pollution des sols agricoles* [(a)]

Source de pollution	$mg.Kg^{-1}$/ $mg.L^{-1}$/$ng.L^{-1}$$\mu g.L^{-1}$ de produit [(b)]
Fertilisant :	
Fertilisant complet	23-29
Mono Superphosphate	16 - 26
Superphosphate	13-34
Roches phosphatées	7.2-47
Double Superphosphate	<0,6 - 12
Triple Superphosphate	0,8 - 7
Mono ammonium-phosphate	1,8 – 8,1
Di ammonium-phosphate	4,3 – 6,6
Boues d'épuration	5 - 3,32
Engrais organiques	0,1 -11
Eaux usées d'irrigation	0,05 – 0,35
Dépôts atmosphériques :	
Dépôts secs	0,03 – 8
Dépôts humide	0,01 - 52

[(a)] Données adaptées de Kidd *et al*. (2007), Connan *et al*. (2013), Nookabkaew *et al*. (2016), et Kumarpandit *et al*. (2017).

[(b)]Unité du contenu en Cd : $mg.Kg^{-1}$ à l'exception des eaux usées d'irrigation, dépôts secs, et dépôts humides en $mg.L^{-1}$/$ng.L^{-1}$$\mu g.L^{-1}$ respectivement.

Amendement calcique et magnésien : Les amendements calciques et magnésiens sont destinés principalement à maintenir ou à élever le pH du sol et à en améliorer les propriétés chimiques. Les amendements minéraux basiques peuvent contenir des ETM et notamment du Cadmium (SOGREAH, 2007).

Les pesticides : Les produits chimiques utilisés en agriculture, tel que les fongicides, les insecticides, les herbicides peuvent contenir plusieurs métaux toxiques comme Cu, Cd, Zn et Pb et peuvent donc contribuer à la contamination des terres agricoles (He *et al*., 2005). Néanmoins, durant ces dernières années, conscients du risque avéré de ces produits chimiques, plusieurs gouvernements ont émis des réglementations limitant la présence de métaux lourds dans ces produits. Le tableau I.3 résume les teneurs en cadmium dans les principales sources de pollution des sols agricoles.

1.2.1.3. Toxicité du cadmium chez les mammifères et santé humaine

L'exposition au Cd peut entraîner un déséquilibre du Zn, du Mg et du Cu dans le corps et les urines des mammifères (Bulat *et al*., 2009). Une exposition à des concentrations élevées de Cd est souvent corrélée à divers problèmes de santé tels que l'insuffisance rénale, les troubles osseux, les troubles neurologiques, l'anosmie, les problèmes du système reproductif masculin et même le cancer (De Queiroz et Waissmann, 2006; Sulkowski *et al*., 2000).

Dans les professions associées au Cd, les travailleurs (par exemple, les mineurs, les fonderies, les soudeurs et les récupérateurs de batteries) ont plus de risque de développer un cancer de la prostate. Dans une étude, une fonderie d'une entreprise de fabrication de bijoux avait non seulement un taux élevé de Cd dans le sang dépassant les limites normales, mais également un essoufflement, des douleurs thoraciques et de l'anxiété (Wittman et Hu, 2002). Bien que les hommes et les femmes soient également sensibles aux effets néphrotoxiques du Cd, les femmes et les enfants sont plus vulnérables à l'exposition au Cd. Cette sensibilité est due à une diminution du stockage du fer et à une régulation des canaux en fer, qui à son tour augmente les concentrations de Cd car le Cd et le Fe utilisent des mécanismes d'absorption similaires (Chaumont *et al*., 2011).

Il semble également que l'exposition au cadmium a un impact sur la neurogenèse adulte, ce qui entraîne une diminution du nombre de cellules et une apoptose dans les cellules. Une grande attention a été accordée à la néphro-toxicité du Cd. Les travailleurs exposés au Cd peuvent souffrir de lithiase urinaire, également connue sous le nom de calculs rénaux, et à mesure que les effets progressent, des lésions glomérulaires et une insuffisance rénale peuvent survenir. Dans certains cas, les problèmes rénaux entraîneront une urémie ou la mort en

raison de lésions tubulaires rénales qui peuvent être indiquées par uneprotéinurie (Chaumont *et al*., 2011).

L'exposition au Cd affecte la santé humaine au niveau cellulaire et est souvent en corrélation avec le stress oxydatif et les dommages à l'ADN. Les fibroblastes humains (F1, F3 et F10) traités avec le $CdCl_2$ ont présenté un arrêt G2. L'arrêt du cycle cellulaire est un indicateur des dommages à l'ADN. Le Cd cellulaire influence de nombreuses protéines et leurs fonctions dans la cellule, et ainsi il peut inhiber la synthèse d'ADN et causer des dommages à l'ADN d'une manière qui dépend de la dose et du temps. En remplaçant Zn, le Cd peut provoquer des erreurs dans la réparation de l'ADN entraînant l'accumulation de lésions d'ADN qui augmentent le risque de cancer (Cao *et al*., 2007).

Le Cd à une concentration de 0,5 µM peut réduire la capacité de réparation des lésions d'ADN de 75% (Dally et Hartwig, 1997). Des changements temporels dans l'ADN dus aux radicaux OH^- produits par une exposition aiguë au Cd ont été trouvés dans des cellules hépatiques de rat. Des mutations ont également été trouvées dans l'hypoxanthine guanine phosphoribosyl transférase (HPRT), un excellent biomarqueur pour détecter tout dommage à l'ADN (Jianhua *et al*., 2006).

I.3. Cadmium et plantes

I.3.1. Phytodisponibilité du cadmium

Les plantes peuvent absorber le cadmium présent dans le sol par l'intermédiaire de leurs racines. Une partie de ce métal, présent dans les retombées atmosphériques ou dans les amendements agricoles (impuretés), peut également pénétrer dans leurs feuilles à travers les stomates. Cependant, en dehors de zones proches d'installations générant la production de grandes quantités de cadmium dans l'atmosphère, la plus grande partie du cadmium absorbée par les plantes l'est par absorption racinaire.

I.3.1.1. Notion de phytodisponibilité

La notion de phytodisponibilité découle directement de la notion de biodisponibilité, définie comme « l'aptitude d'un élément à être transféré d'un compartiment du sol vers un organisme vivant (bactérie, végétal, animal, homme) » (Baize, 1997). Ainsi, est biodisponible pour une plante (phytodisponible), la fraction d'un élément susceptible d'être absorbée par les racines.

I.3.1.2. Distribution du cadmium au niveau du sol

La solution du sol est le compartiment du sol où les ions sont moins énergiquement retenus, elle constitue le réservoir principal d'alimentation pour les plantes. Elle peut être définie

comme la phase liquide aqueuse d'un sol et ses solutés en équilibre avec la phase solide et gazeuse. Elle joue un rôle important dans les réactions physico-chimiques ou le processus contrôlant la dynamique des métaux dans les sols ainsi que leur spéciation, c'est-à-dire leur forme chimique. Il s'agit du milieu à partir duquel les plantes vont absorber leurs nutriments et libérer leurs exsudats.

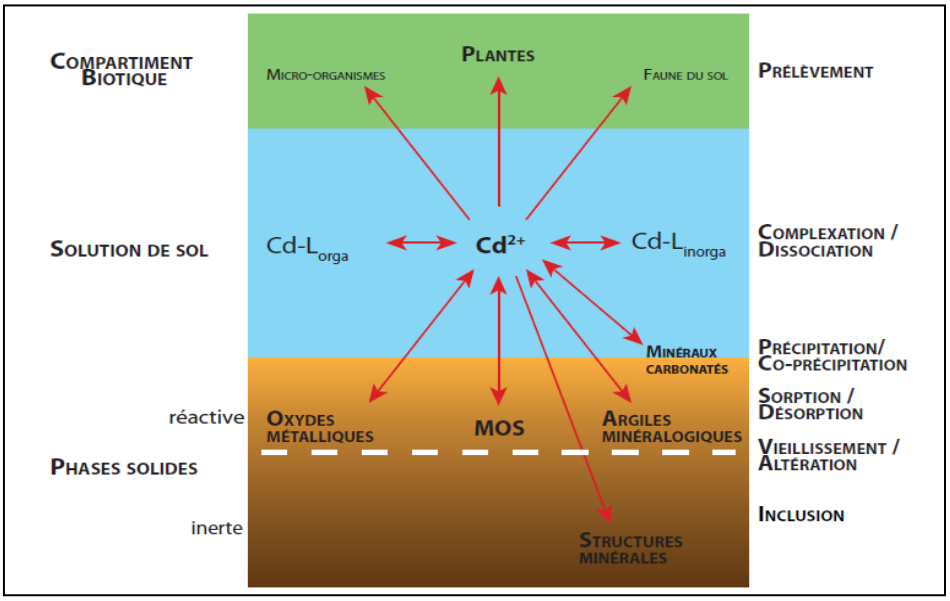


Figure I.1 : *Schéma récapitulatif des principaux compartiments du sol et processus physico-chimiques et biologiques impliqués dans le devenir du Cd dans les sols. D'apres Kabata-Pendias et Pendias (2001).*

Dans le sol, le cadmium va se retrouver adsorbé sur la matière organique et les minéraux tels que les argiles et les oxydes métalliques, ou précipité si les conditions physico-chimiques le permettent. Également il peut être transportés vers les eaux sous terraines ou les eaux de surface par lessivage (Fig.I.1).

Le comportement du cadmium dans la solution du sol (disponibilité au transport ou immobilisation) et aux interfaces solution/solide et solution/plante dépend d'un grand nombre de paramètres biogéochimiques liés à la nature du sol (teneur en argile, pH, capacité d'échange cationique…), au contexte microbiologique, et aux formes chimiques du métal présentes dans la solution du sol ou associées à la phase solide (Kabata-Pendias et Pendias, 2001).

I.3.1.3. Facteurs influençant la phytodisponibilité du cadmium

Divers facteurs influent sur la forme chimique du Cd dans les sols et donc sur sa phytodisponibilité. Ils sont liés principalement au sol lui-même et à la plante considérée.

I.3.1.3.1 Influence du pH

Le pH joue un rôle très important dans la mobilité des métaux. Un pH acide entraîne la mise en solution des sels métalliques (Lions, 2004). En effet à faible pH, les protons H^+ qui sont en concentration élevée dans la solution du sol vont se fixer sur les colloïdes à la place des ions métalliques ce qui augmente la concentration des ions Cd^{2+} libres accessibles pour l'absorption racinaire. Plusieurs chercheurs ont pu montrer que les faibles valeurs de pH favorisent l'absorption et l'accumulation de Cd dans les tissus végétaux (Yanai *et al*., 2006).

I.3.1.3.2. Influence de la matière organique et de la capacité d'échange cationique

Certains auteurs considèrent l'influence de la matière organique (MO) et celle de la capacité des sols à échanger des cations (CEC) comme négligeables devant l'influence du pH (Chlopecka *et al*., 1996). D'autres, comme Sanchez-Martin et Sanchez-Camazano (1993), ont montré l'influence de la CEC et du pool des ions Ca^{2+} et Mg^{2+} sur l'adsorption et la mobilité du Cd. Sauvé *et al*. (2003) ont montré que la rétention du Cd par le sol était 30 fois plus élevée dans un sol riche en matière organique que dans un sol minéral. Il est ainsi admis qu'un sol riche en colloïdes organiques diminue la biodisponibilité du cadmium. De plus La quantité maximale de Cd adsorbée dans les sols a été corrélée avec le contenu en matières organiques et la CEC (Levi-Minzi *et al*., 1976), montrant que les ions Cd^{2+} étaient retenus sur la phase solide par des phénomènes d'échange ionique et de complexation.

I.3.1.3.3. Salinité

La salinité des sols augmente fréquemment la phytodisponibilité du Cd (Li *et al*., 1984), En présence de NaCl, le cadmium est absorbé sous forme ionique (Cd^{2+}) ou sous forme d'un complexe ($CdCln_{2-n}$) (Lopez-Chuken et Young, 2005). En effet, les ions chlorures (Cl^-) forment des complexes stables avec les ions Cd^{2+}. Ce processus de complexation semble augmenter la mobilité des ions Cd^{2+} dans le sol ainsi que leur biodisponibilité (Lopez-Chuken et Young, 2005). Une salinité élevée entraîne des concentrations élevées de Cd dans les tubercules de pomme de terre (McLaughlin *et al*., 1994).

I.3.1.3.4. Température du sol et humidité

Entre 10 et 30°C, la température n'a qu'un effet direct négligeable sur la mobilité des métaux (Serpaud *et al.*, 1994). Mais, en présence de matière organique, elle peut avoir un rôle indirect, par exemple en augmentant sa dégradation, ce qui peut produire des substances acides et complexantes (Lions, 2004). Elle peut aussi jouer sur l'activité bactérienne. L'action des micro-organismes peut aller dans le sens de la solubilisation (production d'acide et de

composés complexants etc.) ou de l'insolubilisation (formation de sulfures métalliques insolubles, bioaccumulation et biosorption par les micro-organismes) des métaux lourds. Lorsque la température du sol est basse, la vitesse des réactions chimiques en général est ralentie. Haghiri (1974) montre que l'augmentation de la température favorise le prélèvement du cadmium par les plantes.

L'absorption de Cd par les plantes ne dépend pas uniquement des quantités de Cd dans le sol mais aussi surtout la forme sous laquelle ce Cd a été incorporé (voire par la suite transformé) dans ce soL, ou encore de la présence d'autres éléments comme Zn et Ca au voisinage des racines qui entrent en compétition avec le Cd pour des sites d'absorption ou des transporteurs transmembranaires.

De l'autre coté les conditions rhizosphériques (acidification, exsudats, microflore) sont susceptibles de modifier la mobilité du Cd. Les racines exercent une forte influence sur leur environnement dans le sens où elles produisent des composés organiques et inorganiques qui sont relâchés dans le sol, il s'agit des exsudats racinaires, Relâchés au niveau de zones racinaires spécifiques, les exsudats diffusibles (acides organiques et aminés) peuvent augmenter la mobilité du Cd. Au contraire et à cause de leur nature pectique, les mucilages sont capables de lier, et par conséquent d'immobiliser, les ions aluminium et d'autres éléments en trace dans une mesure qui dépend de l'élément (Pb^{2+}>Cu^{2+}»Cd^{2+}>Zn^{2+}) (Morel *et al.*, 1986*)*.

Les micro-organismes présents dans les sols peuvent intervenir de façon directe via des processus physicochimiques de biosorption, possibles à la fois sur la biomasse morte et vivante et des processus de bioaccumulation du Cd par la biomasse vivante. Ces deux processus tendent à diminuer la concentration retrouvée en solution. Les micro-organismes peuvent également avoir une influence indirecte sur la solubilisation du Cd par la production de ligands anioniques capables de complexer le Cd en solution, par l'excrétion de protons augmentant la compétition pour les phases de sorption et pour les ligands complexant ou d'autres exsudats organiques complexant le Cd en solution (Viala, 2018).

I.3.2. Phytotoxicité du cadmium

Le cadmium est un élément non nécessaire pour les plantes et il est hautement toxique. Sa toxicité est considérée de 2 à 20 fois plus élevée que celle des autres métaux lourds (Das *et al*., 1997). Cependant la sensibilité des plantes à l'égard du cadmium varie suivant les espèces et même les cultivars d'une même espèce (Lindberg et Greger, 2002). La toxicité du cadmium est directement liée aux capacités élevées de translocation des racines vers le reste de la plante

(Das *et al*., 1997). A l'heure actuelle, les bases moléculaires des perturbations par les ETM sont encore mal connues, mais on admet généralement qu'elles résultent d'un stress oxydatif, dû à la production d'espèces réactives de l'oxygène ou « Réactive Oxygen Species » (ROS).

I.3.2.1. Effet du cadmium sur la croissance

La toxicité du cadmium chez les plantes s'observe par l'apparition de retard dans le développement des jeunes pousses, et par une réduction de la croissance des parties aériennes et des racines (Zorrig *et al*., 2010). Ainsi, il produit une réduction de la biomasse des différents organes chez les plants. Ces effets peuvent être liés, entre autre à l'inhibition de la photosynthèse, de la respiration, de l'absorption d'eau et de nutriments par le Cd (Dias *et al*., 2013; Singh *et al*., 2016), ou à la perturbation de l'équilibre de certaines hormones de croissance, notamment l'auxine (Hasenstein *et al*., 1988). La réduction de l'élongation racinaire peut être causée par une inhibition de la division cellulaire et de la synthèse des polysaccharides pariétaux (Punz et Sieghart, 1993).

L'exposition à long terme au cadmium produit au niveau des feuilles, l'apparition du phénomène de chlorose. La chlorose est une conséquence de la perturbation du métabolisme foliaire du fer et du zinc. Ainsi, la présence du cadmium dans le milieu de culture conduit à la diminution de l'absorption du fer et à la modification du rapport fer/zinc dans la feuille (Cosio *et al*., 2005).

I.3.2.2. Effet du cadmium sur la photosynthèse

L'efficacité photochimique, la teneur en chlorophylle et l'intensité photosynthétique sont considérées comme des indicateurs sensibles de l'état de croissance des plantes soumises à un stress par le Cd (Chen *et al*., 2008). Plusieurs études ont montré que le Cd est un inhibiteur efficace de la photosynthèse (He *et al*., 2017). Le cadmium, en effet, inhibe fortement la synthèse des chlorophylles et leur liaison stable aux protéines, endommageant ainsi l'appareil photosynthétique, en particulier les photosystèmes I (PSI) et II (PSII) (K¨upper *et al*., 2007), et inhibant certaines enzymes du cycle de Calvin (Van Assche et Clijsters, 1990). En effet la diminution de la teneur en chlorophylle peut être attribuée soit à une réduction de sa synthèse (Goncalves *et al*., 2009), soit à sa dégradation enzymatique accrue (Somashekaraiah *et al*., 1992), ou indirectement à une déficience en micronutriments dans le milieu.

Le cadmium peut se lier de manière compétitive aux sites de liaison du Ca essentiels dans PSII pendant la photoactivation du système de séparation de l'eau (Faller *et al*., 2005), et inhiber directement le dégagement d'oxygène (Pagliano *et al*., 2006). Chen *et al*., (2008) ont montré que le Cd interfère avec la réplication des chloroplastes et affecte leur genèse.

Le stress oxydatif induit par le Cd et ; la génération de ROS endommagent l'appareil photosynthétique perturbant ainsi l'intégrité structurale des photosystèmes I et II et entraînant une diminution du rendement photosynthétique (Siedlecka et Krupa, 1996).

D'autre part le Cd peut inhiber l'activité de Fe (III) réductase dans les racines entraînant ainsi une carence en Fe (II), qui inhibe à nouveau le taux global de la photosynthèse (Alkantara *et al*., 1994)

I.3.2.3. Effets sur les processus métaboliques

La cytotoxicité du Cd affecte l'activité de diverses enzymes clés impliquées dans différentes voies métaboliques et joue ainsi un rôle pivot dans la régulation de la croissance et du développement des plantes. Le NR (nitrate réductase) agit comme l'enzyme clé dans la voie d'assimilation des nitrates et joue un rôle important dans la régulation de la croissance et du développement des plantes (Solomonson et Barber, 1990). Il a été constaté qu'un niveau élevé de Cd dans le sol inhibe l'activité NR et donc l'assimilation des nitrates chez diverses espèces végétales, notamment le maïs (Hernandez *et al*., 1996), le pois (Burzynski, 1988), le haricot et la tomate (Quariti *et al*., 1997) et le poichiche (Hasan *et al*., 2007)

Une inhibition de l'activité de l'anhydrase carbonique responsable de la solubilisation efficace du CO_2 a été rapportée chez plusieurs espèces végétales exposées au Cd (Siedlecka et Krupa, 1996), tandis que l'accumulation de proline s'est révélée être fortement induite dans les plantes soumises à un stress par le Cd (Younis *et al*., 2018a), entraînant ainsi des changements dans l'environnement intracellulaire.

I.3.2.4. Effet sur la nodulation

En général, les sols contaminés au Cd montrent une diminution considérable de la population de bactéries fixatrices d'azote et une inhibition de la formation des nodules racinaires. Il a été démontré que la présence de Cd dans le sol inhibe le processus de nodulation et l'activité de la nitrogénase chez plusieurs espèces végétales, notamment *Glycine max*, *Pisum sativum* (Dhingra et Priefer, 2006), *Phaseolus vulgaris* (Dewdy et Ham, 1997).

La contamination du sol par le Cd provoque une diminution simultanée de la teneur en léghémoglobine et de l'activité de la nitrogénase (Comba *et al*., 1998), ainsi qu'une sénescence des nodules racinaires dans le soja suite à un stress oxydatif provoqué par l'élément (Balestrasse *et al*., 2001).

I.3.2.5. Induction d'un stress oxydatif

Le Cd induit fréquemment un stress oxydatif dans les plantes via la génération de ROS (Reactive Oxygen Species) (Fig. I.2) capables d'endommager les structures cellulaires (Szőllősi *et al.*, 2009), de provoquer la peroxydation des lipides membranaires conduisant à une altération des fonctions des membranes (Gratao *et al.*, 2005), ou encore d'oxyder les groupes thiols des protéines, affectant ainsi l'activité de nombreuses enzymes (Dietz , 2005). Les plus connues de ces formes réactives sont l'ion superoxyde ($O^{\bullet}_2$), le peroxyde d'hydrogene (H_2O_2), le radical hydroxyl ($OH^{\bullet}$) et l'oxygène singulet ($^1/_2\ O_2$).

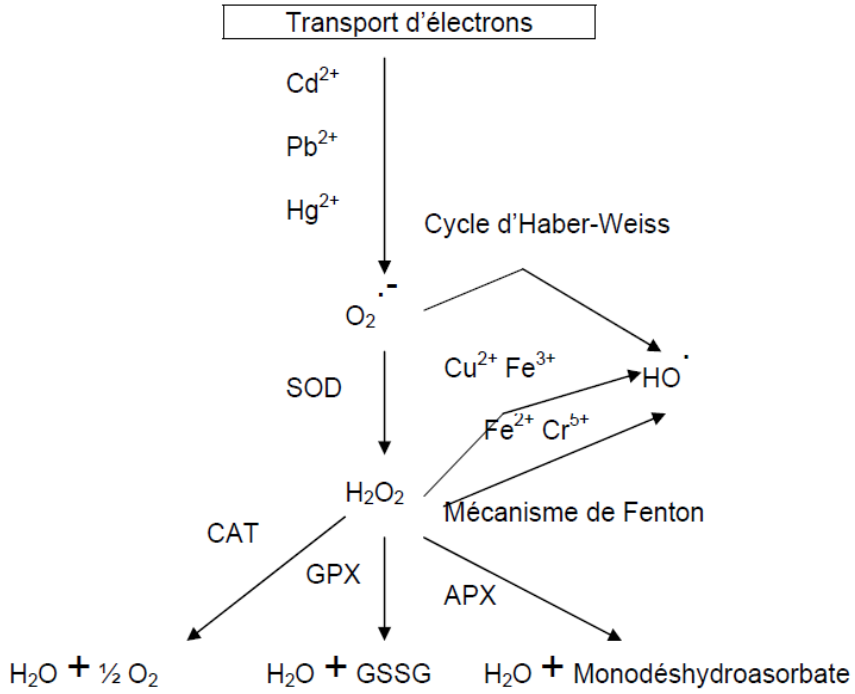


Figure I.2: *Production des espèces réactives de l'oxygène (ROS) par les métaux lourds (d'après Benavides et al., 2005).*

I.3.2.5.1. Le système antioxydant

Les cellules végétales ont développé deux mécanismes de défense antioxydants majeurs contre les dommages oxydatifs. Un de ces mécanismes est associé à l'activation de diverses enzymes antioxydantes, comme la superoxyde dismutase, la catalase (CAT), l'ascorbate peroxydase (APX) et la glutathion réductase (GR). Ces enzymes participent à l'inactivation directe des radicaux libres réactifs.

L'autre mécanisme implique la synthèse et l'accumulation de composés antioxydants non enzymatiques, tels que les composés phénoliques particulièrement les phénylpropanoïdes (flavonoïdes, tanins et lignine), le GSH, les caroténoïdes, la vitamine E, l'ascorbate et la proline, qui jouent un rôle clé dans la détoxification des ROS induits par les métaux lourds et

leur élimination subséquente par piégeage pour atténuer leur toxicité (Sharma *et al*., 2012; Štolfa *et al*., 2015).

La participation de molécules antioxydantes en tant que réponse de la plante à l'absorption de Cd peut être un mécanisme de défense contre le stress causé par le métal. À cet égard, de nombreuses études ont montré les propriétés de piégeage des radicaux par les composés phénoliques, principalement en raison de leur capacité à donner des électrons. Il est donc important de définir ces paramètres comme biomarqueurs impliqué dans la réponse au stress pour fournir un diagnostique plus réaliste de l'impact de la pollution sur les organismes vivants (Manquián-Cerda et al. 2016).

Cependant le Cd peut avoir une action délétère sur ces antioxydants non enzymatiques par leur inactivation (Cho et Seo, 2005). Par exemple la liaison du Cd avec le GSH, produit un épuisement du gluthation réduit et l'empêche ainsi d'assurer sa fonction d'élimination des ROS (Clemens, 2006).

I.3.2.5.2. Induction de synthèse des composés phénoliques

Les composés phénoliques sont des produits du métabolisme secondaire produits par les végétaux. On peut distinguer les différentes classes :

• Les acides phénoliques (acides hydroxybenzoïques, acides hydroxycinnamiques),

• Les flavonoïdes qui représentent la classe la plus abondante et la plus étudiée, ils comportent de nombreux sous-types comme les flavones, les flavanones, les isoflavones, les anthocyanidines, et les flavonols ;ces dernières possédent un très fort pouvoir antioxydant en raison de leur structure chimique favorable au piégeage des radicaux libres (Liu *et al.*, 2012).

• Les tanins et les lignines

• et plus rares, les coumarines et les stilbènes (Harborne, 2000).

Il a été observé que les plantes exposées à un stress métallique produisaient des niveaux élevés de composés phénoliques (Tolrà *et al.*, 2005; Kováčik *et al.*, 2008, 2010; Mongkhonsin *et al.*, 2016). Ils sont généralement les molécules les plus puissantes dans la lutte contre le stress oxydant car ils sont de bons capteurs de radicaux hydroxyles et peroxyles permettant ainsi d'inhiber les chaînes de peroxydation lipidique. Leur capacité antioxydante réside dans leur faculté à « terminer » les chaines radicalaires par des mécanismes de transfert d'électrons et de protons, et à chélater les ions des métaux de transition les empêchant ainsi d'intervenir dans les réactions de Fenton pouvant générer de fortes concentrations de radicaux hydroxyls et de catalyser la peroxydation lipidique (Fig.I.3) (Leopoldini *et al.*, 2011). De façon générale, l'activité biologique des flavonoïdes est fortement dépendante de la nature et

de la position des substituants, en particulier du nombre de groupements hydroxyles. Cependant, les informations actuellement disponibles sur les effets potentiels du Cd sur les niveaux et les profils des composés phénoliques et son rôle dans la détoxification des ROS, ainsi que sur l'impact des métaux lourds, sont mal connues (Manquián-Cerda *et al.* 2016).

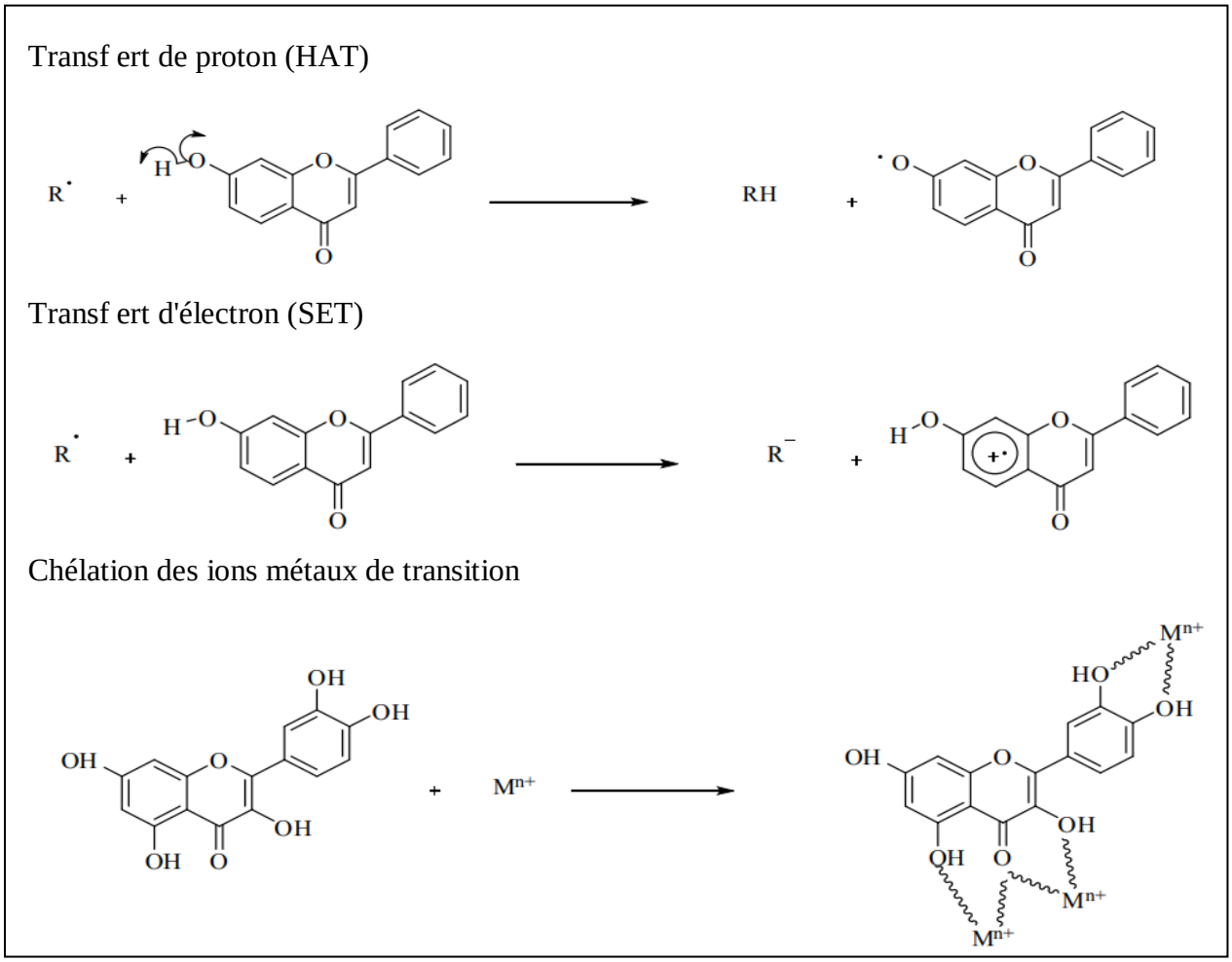


***Figure I.3** : Mécanismes d'action antioxydante des composés phénoliques (Leopoldini et al., 2011)*

I.3.2.6. Induction d'une génotoxicité par le cadmium

Diverses études ont démontré un lien clair entre le stress oxydatif induit par les métaux lourds et la génotoxicité via les dommages à l'ADN induits par les ROS et l'instabilité du génome. Les ROS, générés dans les cellules végétales après une exposition à un stress abiotique comme les métaux lourds, agissent comme un agent clé des dommages à l'ADN, de la mutagénèse et de l'instabilité du génome, provoquant une détérioration de la croissance et du développement des plantes et une perte de productivité des cultures. Les dommages oxydatifs à l'ADN provoquent souvent des ruptures simples et doubles et entraînent des anomalies structurelles dans les chromosomes (Zucca *et al.*, 2013; Mourato *et al.*, 2012).

I.3.2.7. Effets du cadmium sur l'absorption et l'assimilation d'éléments minéraux

Le cadmium affecte sérieusement l'état nutritionnel des feuilles et des racines par l'altération de l'absorption et de la distribution des éléments minéraux indispensables pour le fonctionnement de la plante (Benavides *et al*., 2005). En effet, le cadmium induit une accumulation de composés phénoliques insolubles, comme la lignine dans les vaisseaux de xylème réduisant ainsi le transport ascendant de l'eau et des éléments nutritifs (Chaoui et El Ferjani, 2004).

Plusieurs études ont montré que le cadmium réduit l'approvisionnement en calcium des plantes, en effet le cadmium empreinte les canaux du Ca pour traverser la membrane plasmique dans les cellules de garde (Perfus-Barbeoch *et al*., 2002) et les cellules racinaires (White, 2000) conduisant à une compétition avec le Ca pour ces canaux et réduisant ainsi son absorption par la plante. Le cadmium interagit avec le métabolisme du Ca, ce qui entraîne une perturbation du signal. Ainsi, la présence de Cd dans les cellules de garde entraîne une fermeture stomatique (Perfus-Barbeoch *et al*., 2002), la diminution du taux de transpiration provoquant l'inhibition de la croissance ainsi que la translocation de Cu et Mn (Sipos *et al*., 2013).

Le cadmium affecte également l'accumulation du zinc chez les plantes. En effet, une augmentation des teneurs en zinc chez les plantes en présence du cadmium a été décrite chez différentes espèces végétales, telles que la laitue (Zorrig *et al*., 2010). Cette augmentation pourrait correspondre à une stratégie de protection développée par la plante. Elle pourrait être expliquée aussi par une induction directe ou indirecte de l'expression des systèmes de transport de zinc par le cadmium (Zorrig *et al*., 2010). Par contre, d'autres travaux décrivent une forte compétition entre le cadmium et le zinc (Sadana et Bijay, 1989). Cette compétition se traduit par une diminution de l'influx en $Cd2^{+}$ en présence de Zn^{2+} (Costa et Morel, 1994).

Selon Alcantara *et al* (1994), l'absorption et l'accumulation de Cd provoquent une carence en Fe (II) dans les racines ; car le Cd inhibe la Fe (III) réductase. Solti *et al*. (2011) ont également observé un dépôt de Fe dans les racines de *Populus alba*, ce qui a limité le transport de Fe vers les pousses, lorsque les plantes ont été exposées à de fortes concentrations externes de Cd.

La toxicité du cadmium peut également altérer l'absorption et le transport de nitrate des racines vers les feuilles menant à une réduction de l'assimilation nitrique (DalCorso *et al*., 2008). Savvas *et al*. (2012) ont signalé que le Cd facilitait le dépôt de Cu et de Fe dans les racines du concombre (*Cucumis sativus* L.) et reduit leur translocation aux parties aériennes des plantes, tout en ayant peu d'effet sur l'absorption de Ca, Mg et K par *Cucumis sativus* L.

Une interaction négative entre Cd et Mn a été largement signalé dans les plantes soumises à un stress par le Cd (Wang *et al*., 2007). En revanche, Ramos *et al*. (2002) ont montré qu'une augmentation de l'absorption de Mn a été observée chez *L. sativa* exposée au Cd.

I.3.2.8. Effet du cadmium sur l'absorption et le transport de l'eau

Le cadmium dans le sol pourrait induire un stress hydrique chez les plantes en diminuant la conductance stomatique, le taux de transpiration et la teneur relative en eau des feuilles (Dominguez *et al*., 2011). Ceci est du aux dommages physiologiques induits par la diminution de l'espace intracellulaire et de la quantité de chloroplastes, ainsi qu'à une hypertrophie cellulaire (Sandalio *et al*., 2001). Le cadmium affecte également la perméabilité de la membrane plasmique, entraînant une réduction de la teneur en eau des plantes (Fernandez *et al*., 2013). Polle *et al*. (2013) ont rapporté que les feuilles de *P. euphratica* présentaient une perte d'eau et un flétrissement sous l'effet du Cd. Une diminution de l'imbibition d'eau a également été signalée pour les graines de sorgho (*Sorghum bicolor* (L.)) (Kuriakose et Prasad, 2008) et *P. sativum* L. (Siddiqui *et al*., 2009) exposées au Cd. Plus récemment, Sun *et al*. (2013) ont montré que les cellules de *P. euphratica* traitées au Cd présentaient un net rétrécissement du cytoplasme, indiquant une perturbation de l'équilibre hydrique. De plus, le Cd peut réduire la surface d'absorption d'eau en inhibant la croissance des poils racinaires (Gouia *et al*., 2003).

I.3.2.9. Changements anatomiques majeurs induits par le cadmium et anomalies chez les plantes

La connaissance et l'étude des structures anatomiques et leurs modifications chez les végétaux suite à leur exposition aux métaux lourds sont importantes puisque ils interviennent dans l'absorption des ions métalliques. Des études sur les monocotylédones et les dicotylédones ont montré l'accumulation de différentes quantités de Cd à partir du sol (Chang *et al*., 2014), suggérant que des couches cellulaires internes morphologiquement différentes du cortex - endoderme racinaire jouent un rôle important dans le transport des solutions du sol transportant les métaux lourds à l'intérieur du système végétal. La formation accélérée d'endoderme et d'exoderme de périderme hypodermique, la lignification de la paroi cellulaire et la formation de chélates de Cd sont connues pour se produire en présence de métaux lourds (Lux *et al*., 2011). L'épaississement du sclérenchyme, ainsi que le péricycle, en présence de métaux lourds signalés dans *Brachiaria decumbens* peut être lié à l'absorption de métaux dans les parois cellulaires comme voie alternative pour empêcher leur translocation vers les tissus photosynthétiques (Gomes *et al*., 2011). De même, les racines de *Salix viminalis* cultivées

dans un sol riche en Cd avaient des parois cellulaires épaissies avec une plus grande concentration de métaux à l'intérieur, par rapport à d'autres tissus (Vollenweider *et al*., 2006). Chez les monocotylédones, ce sont les bandes de Caspary qui retiennent les métaux lourds (Gomes *et al*., 2011). Les racines où la croissance secondaire est absente dans l'endoderme sont encore différenciées et caractérisées par des bandes de Caspary épaissies et lignifiées, et une subérisation suivie d'un épaississement irrégulier de la paroi cellulaire endodermique. Les monocotylédones, en grande partie, et quelques dicotylédones présentent les épaississements irréguliers de la paroi cellulaire de l'endoderme (Evert, 2006). La plupart des grandes cultures sont des monocotylédones, portant des endodermes différenciés, et il est donc très probable qu'elles jouent un rôle important dans la prévention d'une libre pénétration des polluants à travers l'apoplaste; par conséquent, des informations sur les différences de fonctionnement du système racinaire et la capacité d'accumulation de métaux lourds parmi les espèces végétales peuvent être obtenues en acquérant des connaissances scientifiques sur la modification de la structure des racines.

Dans une étude menée par Daud *et al*. (2013) sur deux cultivars de coton transgéniques (BR001, GK30) et leur lignée parentale (Coker 312), des dépôts de Cd ont été observés. L'augmentation des niveaux de Cd a entraîné une accumulation d'amidon dans les cellules de la mésophylle foliaire sous forme de granules d'amidon. Dans des conditions normales, les cellules de mésophylle entières ont montré une cellule propre et mince avec un noyau bien formé et un certain nombre de corps lipidiques. Les chloroplastes étaient de forme elliptique, possédant des thylakoïdes correctement disposés avec peu de granules d'amidon. Dans les cellules traitées au Cd, il y a eu une augmentation du nombre de lipides et de nucléoles. Les chloroplastes étaient déformés, avec peu de thylakoïdes gonflés et perturbés, alors qu'il y avait une augmentation du nombre de granules d'amidon et de plastoglobules. Les granules ont été observés dans les régions vacuolaires et cytosoliques, ainsi que fixés aux parois cellulaires des cellules de mésophylle foliaire traitées au Cd, ce qui a montré que le Cd était principalement accumulé dans les parties mortes, ainsi que dans le cytosol, de la cellule.

Une concentration de 10 µM de Cd exogène a entraîné la condensation des lamelles granuleuses et stromales des chloroplastes, et une perte de connexion entre les lamelles avec de petits globules osmiophiles a été observée chez Miscanthus (Guo *et al*., 2016). De même, les changements ultrastructuraux graves induits par le cadmium dans les cellules méristématiques des racines et mésophylles foliaires de *S. alfredii*, qui étaient le principal site de dommages induits par le Cd, étaient les chloroplastes qui ont conduit à la formation de lamelles déséquilibrées, entraînant une sénescence précoce des feuilles (Jin *et al*., 2008).

Le stress au cadmium a augmenté le diamètre des racines, en raison de l'augmentation de la taille des cellules du parenchyme et de l'élargissement des tissus corticaux, qui ont un rôle fonctionnel dans l'augmentation de la résistance des plantes aux écoulements radiaux d'eau et de solutés (Maksimovic *et al*., 2007).

La coloration histochimique du Cd^{2+} a révélé des granules de Cd^{2+} dans les tissus racinaires, qui se limitaient principalement aux cellules du parenchyme, aux vacuoles et aux noyaux, soutenant l'hypothèse qu'une accumulation localisée pourrait être une stratégie possible pour la réponse de défense dans les plants de riz (Singh et Shah, 2014).

Les structures anatomiques des racines de quatre lignées de riz (lignées de maintien Yixiang B et E2B, restaurateur 2+ lignées R892 et Mianhui725), cultivées sous différentes concentrations de Cd, ont été observées, et la résistance des racines aux ions Cd^{+2} a été évaluée. Pour les quatre lignées de riz, la desquamation de rhizoderme et de nouvelles racines ont été observées sous de faibles concentrations de Cd. Alors que sous des concentrations élevées de Cd, la croissance des racines était inhibée dans les lignées de maintien, et les racines secondaires ne pouvaient pas se développer ou se former, et quelques taches noires sont apparues dans le cortex et le péricycle. Dans cette étude, des changements importants dans la racine du riz ont été notés dans le rhizopiderme et le cortex. Il a été montré une desquamation dans le rhizoderme et des dommages dans l'exoderme. Les changements relativement faibles sont apparus dans le cylindre vasculaire et les vaisceaux de xylème. De plus, il y avait des taches noires dans le cortex et le péricycle, présentant des taches profondes dans le péricycle et épaississant la paroi cellulaire après le traitement par le Cd.

Le traitement au cadmium a accéléré la maturation des racines chez *P. vittata*, induisant des changements morphogéniques qui peuvent être liés à des stratégies adaptatives. Ces changements impliquent l'augmentation de la taille du méristème apical racinaire, le développement de poils racinaires et la différenciation plus précoce des éléments du xylème et des lamelles de subérine. Mais *P. vittata* semble incapable de survivre plus longtemps à une concentration très élevée de cadmium (par exemple, 100 µM), car, dans ces conditions, les changements morpho-anatomiques et cytologiques extrêmes observés au niveau des racines limitent *et al*tèrent inévitablement la fonction racine (Balestri *et al*., 2014).

Après son absorption avec les solutions externes, le cadmium s'est accumulé dans l'apoplaste et n'est pas entré facilement dans les cellules intactes. Ainsi, le Cd absorbé se concentre principalement dans l'apoplaste des cellules périblèmes, et la distribution du métal suit le schéma caractéristique des composés chargés positivement d'origine diverse, incapables de traverser facilement le plasmalemme (Seregin *et al*., 2004). Des altérations structurelles

produites par le Cd ont été détectées dans les plantules de *Z. mays* et *H. vulgare*. Un effet négatif du Cd dans les vacuoles a été observé. Le Cd a provoqué une baisse du contenu vacuolaire, non seulement dans les cellules des feuilles de *Z. mays*, mais aussi dans les cellules racinaires de *H. vulgare*, probablement en raison de l'inhibition causée par le Cd dans l'absorption d'eau. Les cellules racinaires de *H. vulgare* présentaient une déformation de la paroi cellulaire avec une capacité de rétention élevée de Cd.

I.3.3. Stratégies des plantes vis-à-vis le cadmium

Les mécanismes conduisant à la tolérance au Cd peuvent être divisés en deux groupes : les stratégies d'exclusion qui consistent à éviter l'absorption du Cd, présent à concentrations élevées dans le sol et les stratégies de tolérance. Les stratégies d'exclusion sont tout à fait limité chez les plantes supérieures ; cependant des expériences menées sur *Thlaspi arvense* ont montré que l'écotype Jena était beaucoup plus efficace pour exclure le Cd des racines et des pousses (Martin *et al*., 2012). En outre le génotype d'*Holcus lanatus* a montré une vitesse réduite d'absorption d'arsenic (Hall, 2002). Les plantes présentant des mécanismes de tolérance sont capables d'accumuler, de stocker et d'immobiliser le métal le plus souvent par des processus de chélation et de séquestration rapportés dans la figure I.5 (Leita *et al*., 1996).

I.3.3.1. La chélation et la séquestration du cadmium

La présence intracellulaire de ligands organiques, qui assurent une complexation et donc la détoxication de nombreux ions métalliques constitue à l'heure actuelle un aspect fondamental de la résistance aux métaux lourds.

Après l'entrée dans le cytosol, le cadmium, qui présente une forte affinité pour les thiolates, est en grande partie chélaté par le glutathion ou par des peptides dérivés du glutathion : les phytochélatines mais aussi par des acides organiques comme le citrate et l'oxalate (Clemens, 2006), ou encore par les métallotionéines (Guo *et al*., 2008).

I.3.3.1.1. Les phytochélatines

Les phytochélatines sont synthétisées en réponse à l'exposition à différents ions métalliques essentiellement le Cd^{2+} (Clemens, 2006). Les phytochélatines sont de petits peptides riches en sulfures (γ-Glut-Cyst) n-X (n=2-11), qui présentent une forte affinité pour les métaux divalents dont le Cd. La nature de l'acide aminé (X) varie en fonctions des végétaux et détermine les isoformes des phytochélatines (Jumarie *et al*., 2001; Stolt *et al*., 2003); Ils sont synthétisés à partir du glutathion par la phytochélatine synthase (PS) (Zhu *et al*., 1999) (Fig.

I.4) ; Les PCs sont synthétisées pour former des complexes PCs-Cd appelés complexes de bas poids moléculaire (Low Molecular Weight (LMW) .

Ceux-ci sont transportés dans la vacuole par deux transporteurs de type ABC. Une fois dans la vacuole, ils s'agrègent les uns aux autres par des ponts sulfures pour former des complexes de poid moléculaire élevé (High Molecular Weight (HMW) (Clemens, 2006). Le pH vacuolaire provoquerait alors la dissociation du complexe, et les ions seraient pris en charge par les acides organiques présents, tels que le malate, le citrate ou encore l'oxalate (Sanita di Toppi and Gabbriella, 1999).

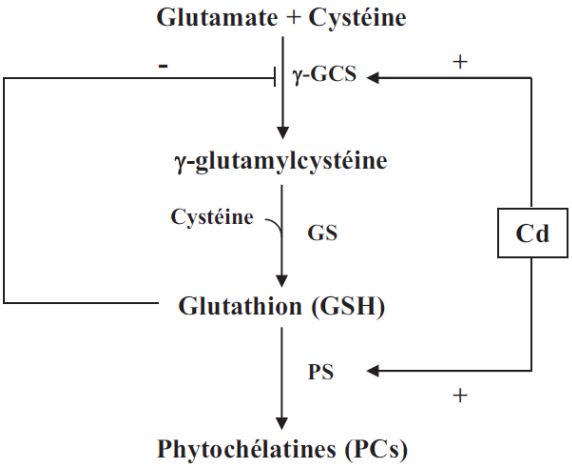


Figure I.4: *Régulation de la biosynthèse des phytochélatines (PCs) et du glutathion (GSH) chez les plantes. (Zhu et al., 1999).*

I.3.3.1.2. Les métallothionéines

Sont un groupe de protéines de bas poids moléculaire (6.5 kDa et 60 à 75 acides aminés) dérivés métalliques d'une protéine riche en soufre nommée thionéïne, elles sont localisées dans le cytoplasme des cellules. Elles ont une teneur élevée en cystéine et peuvent former des liaisons avec des ions métalliques tels que le Zn, Cu, Ca, Hg grâce aux groupements SH des Cystéines. Selon les études actuellement disponibles, la plupart des MT présentent deux domaines globulaires distincts, dépourvus de structure secondaire et reliés entre eux par une courte séquence de transition ; chaque domaine est responsable de la fixation de plusieurs cations métalliques divalents ou monovalents. Des expériences de sensibilité au Cd ont été réalisées sur des lignées mutantes d'*Arabidopsis thaliana* cad 1-3 (lignées déficientes en PCs) pour lesquelles les gènes codant pour les MTs ont été mutés ou non. Les résultats ont montré que l'absence de MTs, augmentait la sensibilité au Cd (Guo *et al*., 2008). Ceci met bien en évidence l'importance des MTs dans la détoxication du Cd via ses propriétés de chélation.

Néanmoins, l'implication des métallothionéine dans la réponse aux métaux lourds est encore débattu, (Cobbett *et al*., 2002). Récursivement les métallothionéines peuvent fonctionner

comme antioxydants (Dietz *et al*., 1999) et probablement intervenir dans la réparation de la membrane plasmique (Salt *et al*., 1998). Ces protéines s'accumulent également en réponse à d'autres stress (chocs thermiques par ex.) ou sous l'effet de facteurs telles que des hormones et des cytokines.

I.3.3.1.3. Autres chélateurs

D'autres chélateurs peuvent être impliqués dans la séquestration du Cd^{2+} au niveau cellulaire : il s'agit des acides carboxyliques, des acides organiques et les acides amines comme l'histidine et la proline. Ils peuvent avoir un rôle important dans la tolérance des plantes aux métaux et dans la détoxification de ces éléments (Sharma et Detz, 2006).

Parmi les acides organiques impliqués dans la tolérance aux métaux on trouve les acides dicarboxyliques (acides fumarique, malique, oxalique) ou les acides tricarboxyliques (comme l'acide citrique). Leur synthèse est souvent stimulée en présence de métaux lourds, ce qui laisse penser qu'elles assurent le transport xylémien des ions métalliques depuis les racines vers les parties aériennes de la plante (Ma *et al*., 1997, Harrington *et al*., 1996).

Les acides aminés libres, comme la proline, l'histidine et la cystéine, s'accumulent lors d'un stress métallique et pourraient être eux aussi impliqués dans la chélation de divers métaux lourds, notamment du zinc et du nickel (Briat et Lebrun, 1999 ; Bert, 2000). Plusieurs auteurs ont rapporté une augmentation considérable du taux de proline chez les plantes après un traitement au Cd (Vezza *et al*., 2018; Younis *et al*., 2018a). Ainsi l'accumulation et la tolérance au nickel dans le genre Alyssum semblent principalement dues à une synthèse accrue d'histidine (Krämer *et al*., 1996).

La nicotianamine (dérivé de la méthionine et resultant de l'oligomérisation de trois S-adénosyl méthionines) est une autre molécule capable de fixer les métaux de transition tel que le cuivre ou bien le fer (Curie *et al*., 2009).

I.3.3.1.4. Séquestration dans la vacuole via les transporteurs tonoplastiques

Un deuxième mécanisme de séquestration vacuolaire de cadmium reposant sur l'activite de transporteurs de Cd a été mis en évidence, ainsi des études menées chez *Oryza sativa* et *Arabidopsis thaliana* ont montré que AtHMA3 un transporteur de métaux lourds joue vraisemblablement un rôle important dans la séquestration vacuolaire du cadmium (Morel *et al*., 2009; Ueno *et al*., 2010). AtHMA3 est une pompe ATPase localisé uniquement au niveau de la membrane vacuolaire et sa surexpression augmente la tolérance au Cd (Morel *et al*., 2009). HMA3 apparait donc comme un transporteur impliqué dans la détoxication du Cd (Figure I.5).

Ainsi on a pu démontré trois autres transporteurs tonoplastiques impliqués dans la séquestration du Cd, ayant une activité antiport Ca^{2+}/H^{+} ou Mg^{2+}/H^{+} : CAX2 (Cation eXchanger 2), CAX4 (Cation exchanger 4) et MHX (Magnesium H^{+} exchanger) (Berezin *et al*., 2008), localisés au niveau de la racine, augmentent également la tolérance au Cd et ne transloquent pas celui-ci vers les parties aériennes (Fig.I.5).

I.3.3.2. Autres mécanises

D'autres mécanismes agissant contre les effets néfastes des métaux lourds peuvent être mis-en œuvre chez les plantes en général comme l'accumulation dans les feuilles âgées, juste avant leur abscission diminuerait ainsi les concentrations métalliques dans la plante (Dahmani-Muller, 1999), l'évitement ou la réduction de l'absorption (Meharg et Macnair 1992), L'induction des protéines de choc thermique (Hsp) déjà réputées pour leur implication dans le stress lié à un choc thermique, ou encore la fixation des métaux dans le compartiment apoplasmique (Hall, 2002).

Pour le Cd l'immobilisation par les composés pariétaux : sites pectiques et groupes histidyls pourrait être considérée comme une stratégie de tolérance au cadmium (Leita *et al*., 1996), le stockage préférentiel dans les trichomes des feuilles qui a été mis en évidence chez *B. juncea* et le tabac (Choi *et al*., 2001), et la biosynthèse d'éthylène qui est un messager stimulant la lignification seront également responsables de la tolérance au Cd. L'éthylène est capable de limiter les flux de métaux dans les systèmes vasculaires et accélérant la réponse anti-oxydante par induction de l'activité ascorbate peroxydase (Sanita di Toppi and Gabbrielli, 1999).

I.3.4. Absorption, translocation et accumulation du cadmium

I.3.4.1. Absorption du cadmium

Les taux d'absorption du cadmium varient énormément en fonction de l'espèce considérée, de la physiologie de la plante ; comme la surface racinaire, le taux d'exsudation racinaire et la transpiration. (Podazza *et al*., 2012)., de la concentration du cadmium biodisponible dans le sol et de nombreux facteurs bio-physico-chimiques du sol (tels que le pH du sol, la teneur en matière organique,…etc) qui jouent un rôle dominant dans les mécanismes d'absorption racinaires (Sauvé *et al*., 2000).

Au niveau des racines, le continuum apoplastique (c'est à dire le continuum extra-cellulaire formé par les parois cellulosiques et les espaces vides entre les cellules) de l'épiderme et du cortex est facilement perméable aux solutés ; Le transport des éléments métalliques à travers la paroi cellulaire se fait passivement par les pores du réseau de la cellulose, de l'hémicellulose et des glycoprotéines (Briat et Lebrun, 1999). Cependant la paroi cellulaire de

l'endoderme agit comme une barrière pour la diffusion apoplastique. Les solutés doivent alors passer dans le symplasme racinaire (c'est-à-dire le continuum intracellulaire formé par les cellules végétales liées entre elles par les plasmodesmes) avant qu'ils ne puissent entrer dans le xylème ; A ce niveau la le transport peut devenir actif autorisant cette fois un transfert contre le gradient de concentration, tel que le zinc et le cuivre qui sont absorbés activement par une protéine de transport sélective, nécessitant de l'énergie (Kabata- Pendias et Pendias, 2001).

L'entrée du Cd dans la cellule végétale et donc l'absorption et la translocation du Cd se fait de façon non-spécifique via différents transporteurs de métaux (Fig.I.5) (particulièrement les transporteurs de Zn^{2+}, Fe^{2+} et Ca^{2+}) mais probablement aussi par les canaux à calcium (Clemens, 2006). En effet, l'absorption du cadmium semble être en compétition avec des éléments tels que K, Ca, Mg, Fe, Mn, Cu, Zn, Ni pour les mêmes transporteurs transmembranaires (Benavides *et al*., 2005 ; Clemens, 2006). A titre d'exemple, l'absorption du cadmium par les végétaux diminue avec l'augmentation de la concentration en calcium dans le sol à cause d'une compétition entre ces deux cations.

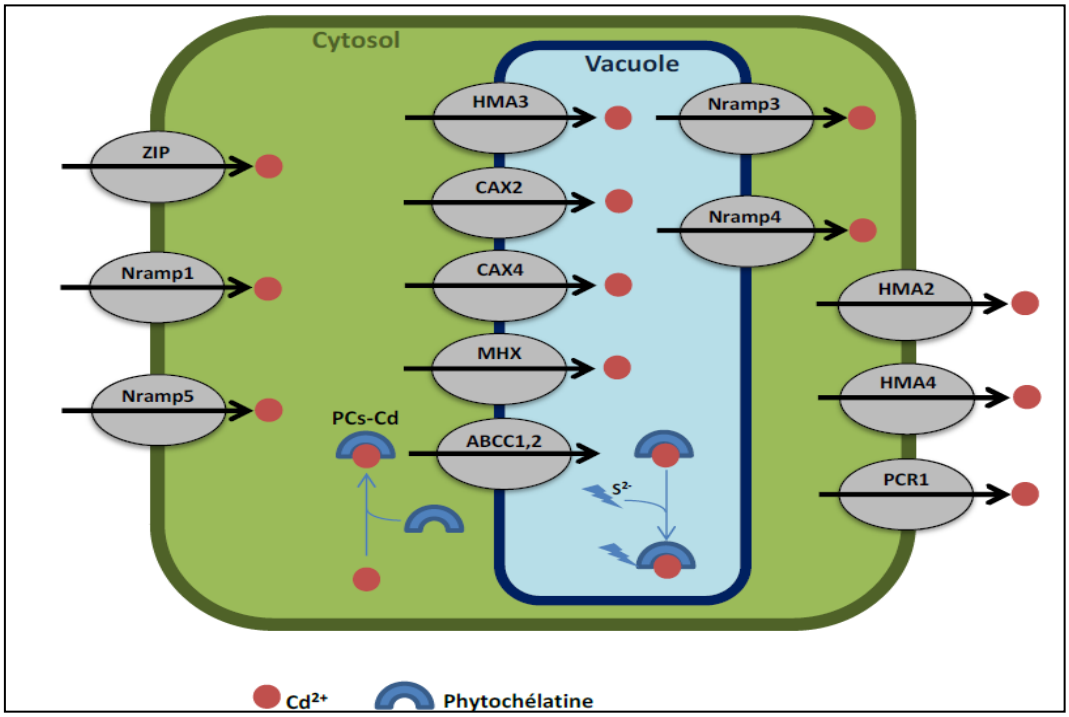


Figure I.5 : *Mécanismes moléculaires de la cellule végétale en réponse au Cd (*Lin *et al*. 2012).

Le Cd entre dans la cellule végétale via les transporteurs ZIP, Nramp1 et Nramp5. Le Cd sous forme libre peut être transloqué dans la vacuole via HMA3, CAX2, CAX4 et MHX puis remobilisé via Nramp3 et Nramp4. Le Cd peut également être chélaté dans le cytosol par des phytochélatines pour former des complexes PCs-Cd qui sont ensuite transloqués dans la

vacuole via les transporteurs ABCC1 et ABCC2, ces complexes serons stabilisés par la suite. Le Cd^{2+} libre dans le cytosol peut être transporté en dehors de la cellule par HMA2 et HMA4 afin d'être transloqué vers les partie aérienne.

Le transporteur PCR1 peut également exporter le Cd^{2+} en dehors de la cellule afin d'en réduire la teneur (Lin *et al*. 2012).

Les ions cadmium sont majoritairement retenus dans les racines et seules, de petites quantités sont transportées vers les parties aériennes (Cataldo *et al*., 1983).

Le facteur de transfert racinaire du cadmium aux végétaux est compris entre 0,1 et 10 (Alloway, 1990) et généralement supérieur à celui de la plupart des métaux traces. En outre, il existe une importante variabilité de ce paramètre entre les différents types de plantes : il a été observé que les légumes feuilles (salades, épinards), les légumes racines (carotte, radis) ou les tubercules (pomme de terre) ont un taux de transfert 3 à 5 fois supérieur à celui des céréales (Jackson et Alloway, 1992). La répartition du cadmium dans la plante est hétérogène et l'organe cible privilégié est la feuille.

I.3.4.2. Translocation

La translocation du Cd^{2+} libre ou chélaté vers les parties aériennes des plantes se fait par le xylème (Kranner and Colville, 2011) et est très probablement stimulée par la transpiration (Liao *et al*. 2006). Après avoir pénétré le cylindre central, les métaux se déplacent vers les parties aériennes des plantes via le flux d'eau du système vasculaire (Krzeslowska *et al*. 2010), où l'eau s'évapore et le métal s'accumule.

La charge de xylème joue un rôle important dans l'accumulation de Cd dans les parties aériennes des plantes. Un faible transfert de Cd dans la sève du xylème dans les racines a été associée à un transport subséquent faible de Cd vers les parties aériennes (Verbruggen *et al*., 2009).

À l'intérieur du xylème, des métaux tels que le Pb et le Cd peuvent se lier aux acides aminés et former des complexes (Rascio et Navari-Izzo 2011). En plus des protéines transporteur de métaux lourds naturellement présentes dans les membranes cellulaires, plusieurs études ont signalé une translocation accrue des métaux lourds de la racine aux pousses en présence de ligands organiques (Shahid *et al*. 2012, 2014). Les ligands organiques naturels et synthétiques, tels que l'acide éthylène diamine tétra-acétique (EDTA), le disuccinate d'éthylène diamine (EDDS), l'acide nitrilo triacétique (NTA), les substances humiques (HS) et les acides organiques de bas poids moléculaire (LMWOA) augmente l'absorption et la translocation des métaux lourds (Saifullah *et al*.2009; Sabir *et al*.2014; Sabir *et al*.2015).

La figure I.6 résume les mécanismes d'absorption et de translocation du Cd chez les plantes :

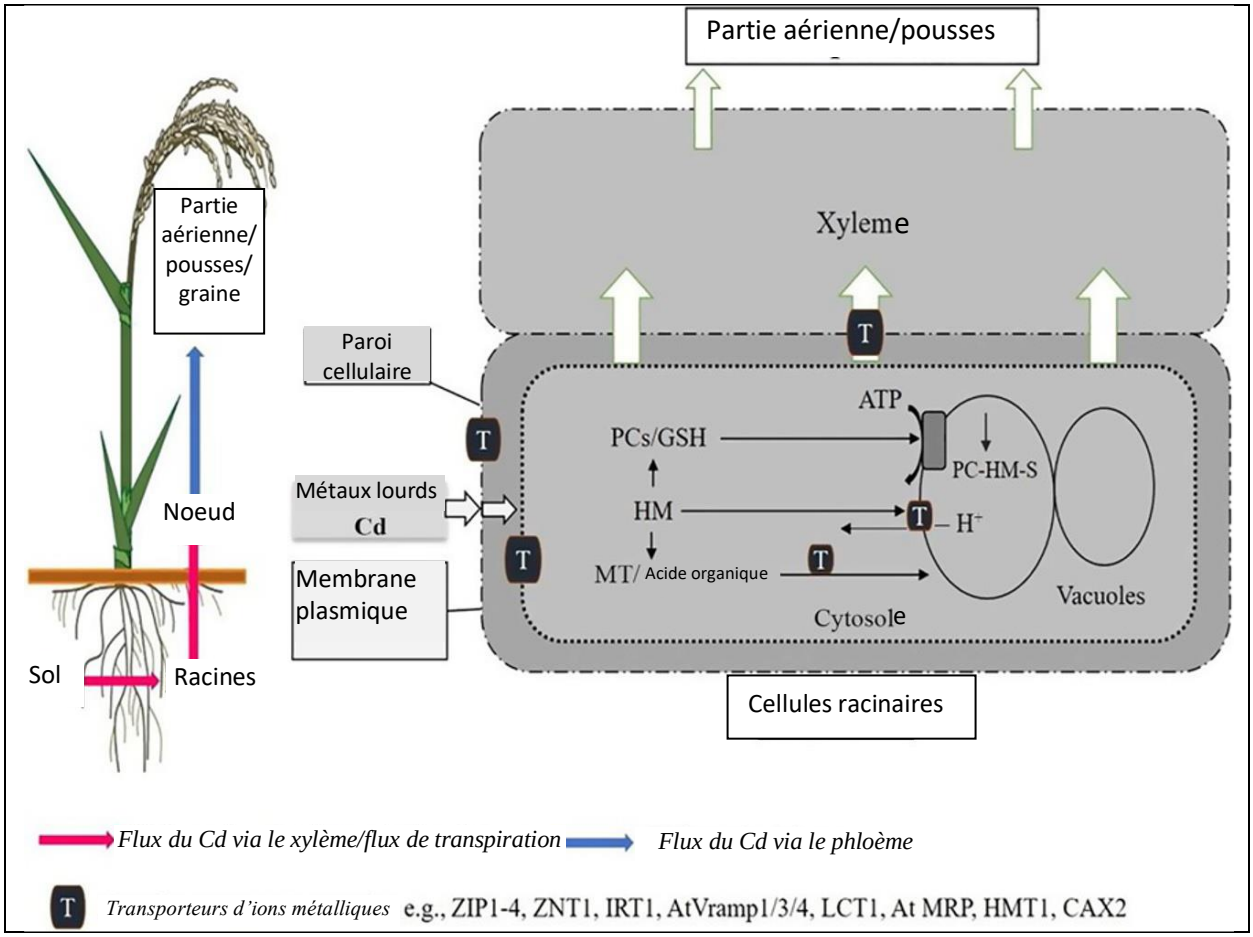


Figure I.6: *Représentation schématique des mécanismes possibles de transport, de désintoxication et de dépôt de métaux lourds de différents organes subcellulaires dans les cellules racinaires des plantes. (Kavita et al., 2019)*

I.3.4.3. Accumulation

L'accumulation subcellulaire du Cd dans les plantes diffère considérablement, non seulement entre les espèces végétales, mais aussi entre les cultivars et les génotypes de la même espèce (Xin *et al*., 2013), et les mécanismes de détoxication et de tolérance du Cd chez les plantes.

Mclaughlin *et al*. (2011) ont classé en ordre croissant l'accumulation du Cd du sol vers les espèces végétales telles que : les haricots verts, les betteraves, les radis, les pois, les carottes, le brocoli < pommes de terre, tomates, courgettes et maïs sucré < oignons, poireaux, panais, < navets < chou, chou frisé < laitue et épinards. Cependant Ros en *et al*. (2012) ont signalé une accumulation considérable de Cd dans les feuilles de tabac. On rapporte également que le Cd s'accumule dans les grains de moutarde indienne (Qureshi *et al*., 2010) et dans les plantes tubéreuses comme les pommes de terre (Baghour *et al*., 2001). La relation entre les

différentes espèces végétales et l'accumulation, la compartimentation et la détoxification des métaux fait toujours l'objet d'études approfondies.

Pour la plupart des plantes, le Cd a tendance à s'accumuler dans les racines, seule une petite partie étant transférée aux parties aériennes (Ahmad *et al*., 2011). Généralement, la teneur en Cd des plantes diminue par ordre de : racines> tiges> feuilles> fruits> graines (Benavides *et al*., 2005). Certaines espèces peuvent séquestrer de fortes concentrations de Cd dans leurs racines avec une translocation réduite vers les pousses, ou remobiliser le Cd des feuilles aux racines à travers le phloème (Mendoza-Co´ zatl *et al*., 2011). Celles-ci sont appelées plantes à faible accumulation de Cd. Zhou *et al*. (2015) ont signalé une accumulation de 60 à 90% de la teneur en Cd dans les racines de 32 cultivars de riz hybride (*O. sativa*). La concentration de Cd dans les racines des plantes peut être dix fois plus élevée que dans les pousses (Wang *et al*., 2009), ce qui suggère que les racines servent de barrière efficace à la translocation du Cd. L'efficacité des parois cellulaires racinaires dans le piégeage du Cd est attribuée au nombre de groupes fonctionnels disponibles (par exemple, hydroxyle, carboxyle) qui sont capables de former des complexes avec des métaux traces (Nishizono *et al*., 1987). L'accumulation du cadmium dans les racines des plantes varie selon le type de plante et la concentration de la rhizosphère. De même, le Cd est principalement concentré dans les cellules apicales des racines des plantes à faible concentration de Cd dans le sol ou dans la région subapicale proximale (Seregin *et al*., 2004). Au niveau cellulaire, le cadmium s'accumule principalement dans les noyaux et les vacuoles, et à moindre coup dans les plastes et le cytoplasme des cellules racinaires. (Liu *et al*., 2007).

L'accumulation du cadmium dans les fruits reste controversée. Pour Moral *et al* (1994), bien que le cadmium soit facilement transporté vers les parties aériennes des plants de tomate, aucune détection de Cd n'était faite dans les fruits. A l'opposé, Hart *et al*. (1998) émet l'hypothèse d'une accumulation de cadmium dans les fruits.

I.4. Généralité sur les espèces étudiées

I.4.1. La Fève (*Vicia faba*.L)

I.4.1.1. Classification phylogénique APG III

Regne: Archéplastides

Clade: angiospermse

Clade: Dicotylédones vraies

Clade: Noyau des Dicotylédones vraies

Clade: rosidées

Clade : fabidées

Ordre : Fabales

Famille : Fabacées

Sous-famille: Faboidées

Genre : vicia

Espèce : *vicia faba* L

I.4.1.2. Origine et répartition géographique

La fève (Vicia faba) est une espèce connue seulement comme plante cultivée, Son centre d'origine et de domestication se trouve probablement en Asie occidentale, d'où elle s'est diffusée en Europe, en Afrique et en Asie centrale. L'Ethiopie et l'Afghanistan sont considérés comme des centres secondaires de diversité. La domestication de la fève a eu lieu entre 7000 et 4000 avant J.-C., et au 3e millénaire avant J.-C. elle était largement répartie en Méditerranée. De nos jours, la fève se cultive largement dans les régions tempérées et subtropicales, ainsi qu'en altitude sous les tropiques. En Afrique tropicale, c'est surtout dans la partie orientale qu'on la trouve, en particulier au Soudan et en Ethiopie (Brink, 2006).

I.4.1.3. Description

La Fève est une plante herbacée annuelle haute de 50 centimètres à plus d'un mètre. Le terme désigne aussi bien la plante que son fruit. Contrairement à la plupart des vesces, la Fève est une plante dressée pourvue de tiges robustes de section carrée ne nécessitant pas de support pour se maintenir.

Ses feuilles sont épaisses, composées, aux folioles ovales vert- grisâtre, paripennées ne disposent pas de vrilles. Elles sont disposées de façon alterne. Les folioles qui les composent sont très courtement pétiolées et présentent un contour entier et une nervation pennée .

Ses tiges sont dressées, quadrangulaires, assez robustes et ramifiées.

La fleur hermaphrodites est typiquement celle des Papilionacées, à 5 pétales, dont le supérieur forme un étendard. La fleur blanche présente une grosse macule noire centrale. Les fleurs sont disposées en petits groupes à l'aisselle des feuilles. Les fruits sont des gousses de grande taille. Parfois de 15 à 20 cm de long et 2 cm d'épaisseur. Elles sont vertes, A maturité, le tégument devient brun et dur et la graine sert alors à la semence. Elles contiennent 2 à 8 fèves. Les fèves sèches sont des grosses graines plates de 2 à 3 cm de long, recouvertes d'un épiderme coriace.

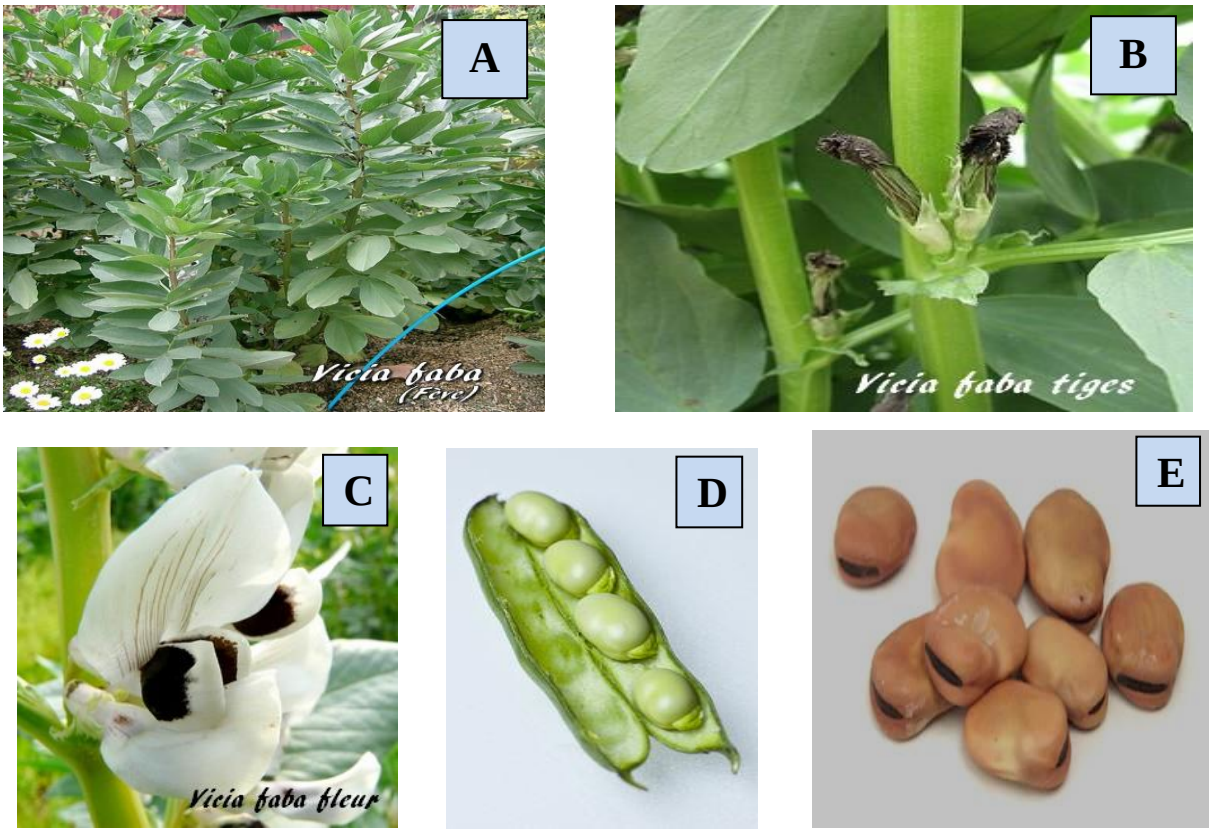


Figure I.7 *: l'espèce Vicia faba(A) pante complète, (B) la tige, (C)la fleur, (D) le fruit, (E) les graines.*

La racine, à dominante pivotante, s'enfonce profondément dans le sol jusqu'à atteindre une longueur similaire à celle des tiges. Comme c'est le cas de nombreuses autres *Fabaceae*, elles présentent des nodules, très nombreuses dans les 30 premiers cm du sol, qui leur confère la propriété de fixer l'azote de l'air. Bien que la plante elle-même en consomme jusqu'à 80 %, les 20 % restants améliorent la fertilité de la terre, de sorte que cette culture est utilisée dans des systèmes de rotation pour renforcer les sols épuisés (Fig I.7) (Chaux et Foury, 1994).

I.4.1.4. Cycle végétatif

La fève est une plante annuelle, la graine constitue le matériel habituel de semis son cycle complet de la graine à la graine est environ 5 mois (Chaux et Foury, 1994). Le développement de la fève est caractérisé par cinq stades principaux : germination et levée, développent végétatif, développement reproductif, sénescence de la gousse et sénescence de la tige (Fig.I.8).

La germination s'observe entre 4 et 7 jours après le semis. La floraison commence par l'induction florale et l'initiation des organes reproducteurs. La date de floraison varie en fonction du type de cultivar, de la température et de la photopériode. Elle est généralement située entre 28 et 42 jours après le semis.

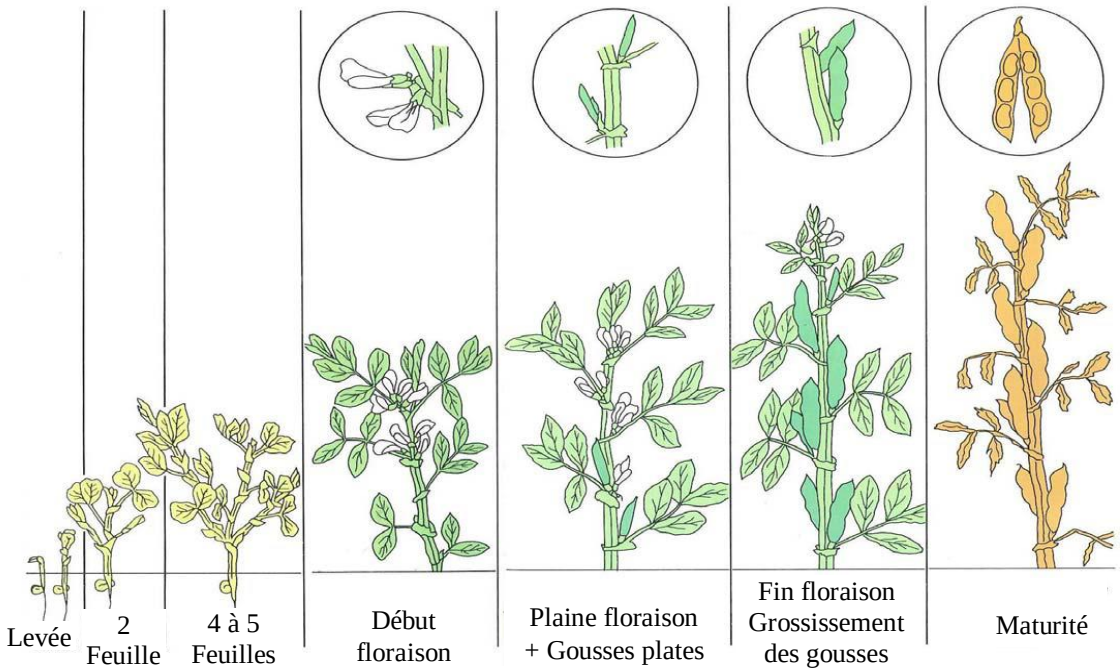


***Figure I.8**: Cycle de développement de la fève (Simonneau et al., 2012)*

La floraison de la fève dure quarante jours, les fleures paraissent successivement le long de la tige, les gousses se forment d'abord au pied de la plante. Lorsque la floraison est terminée, les froments grossissent, et ordinairement ils sont murs après quarante jours.

I.4.1.5. Exigences climatiques et édaphiques

La température optimale pour la croissance de la Fève se situe entre 15-25°C (Matthews et Marcellos, 2003), mais supporte les faibles gelées ne dépassant pas –3°C. Elle ne supporte pas les fortes chaleurs ; qui lui sont néfastes (arrêt de croissance, chlorose) et peuvent même anéantir complètement sa végétation (Chaux et Foury, 1994). D'après Laumonier (1979), la fève se comporte comme une plante de jour long qui se traduit par une exigence importante en luminosité.

D'après Peron (2006), cette culture est peu exigeante sur le plan édaphique, cependant, elle préfère les sols sablo-argileux, et un pH neutre à légèrement alcalin (7-8,3).

L'espèce est très sensible à la sécheresse, elle a besoin de l'eau durant tout son cycle végétatif et en particulier à partir de la floraison. Les phases de floraison et développement des gousses présentent une sensibilité élevée vis-à-vis d'un stress hydrique, raison pour laquelle il faut intervenir par arrosage ou irrigation en cas de faibles précipitations (Chaux et Foury, 1994).

I.4.1.6. Importance de la culture de la Fève

En Ethiopie, dans les pays méditerranéens, au Proche-Orient et en Chine, les graines mûres et sèches sont un aliment très répandu, et dans de nombreux pays, ce sont les graines vertes que l'on consomme, cuites à l'eau ou crues, comme légume. Selon Gordon (2004), cette légumineuse a une teneur en protéine élevée de l'ordre de 300 g/kg et est une excellente source de fibres solubles et insolubles, de glucides complexes, de vitamines (B9 et C) et de minéraux (en particulière le potassium, le phosphore, le calcium, le magnésium, le cuivre, le fer et le zinc).

Les graines mûres et les parties végétatives de la fève servent de concentré, de foin ou d'ensilage pour les animaux domestiques. En Ethiopie, la paille s'emploie comme combustible pour faire la cuisine. En Chine, graines et parties végétatives possèdent toutes sortes d'applications médicinales.

Sur le plan agronomique, la Fève améliore la structure du sol (Hamadache, 2003), La tige et les feuilles s'utilisent comme engrais vert (khaldi *et al*., 2002), et elle est introduite en rotation avec les céréales ou elle joue un role non negligeable dans l'enrichissement des sols en azote (Rachef *et al*., 2005).

I.4.1.7 Production de la fève en Algérie

L'étude de l'évolution de la superficie récoltée en fève en Algérie durant 10 ans montre une progression constante jusqu'à 2015 puis une baisse en 2016 ; suivie d'une augmentation de 5000 ha en 2017 (Annexe V, Tab.2). La superficie actuelle tend à se stabiliser autour de 40000 ha (FAOSTAT, 2017).

Les niveaux de production de la fève restent faibles. En effet ils sont actuellement situés autour de 46000 tonnes pour une superficie de 40000 ha. La production et le rendement de la fève montrés dans le tableau I.4 sont influencés par le climat et les contraintes biotiques telles que les adventices et les maladies fongiques (ITGC, 1996). Les niveaux actuels de productivité se situent autour de 11000 hg/ha.

I.4.2. Le haricot (*Phaseolus vulgaris.L*)

I.4.2.1. Origine et répartition géographique

Le haricot commun est originaire d'Amérique centrale et d'Amérique du Sud. Des écotypes à petites graines et à port grimpant se trouvent à l'état sauvage au nord de l'Argentine et en Amérique centrale. Le haricot commun a été domestiqué indépendamment en Amérique centrale (Mexique et Guatemala) et dans les Andes d'Amérique du Sud (principalement le Pérou). Le haricot commun a été transporté vers d'autres continents depuis le XVIe siècle

(Van Schoonhoven, A., Voysest, O., 1991), Des marchands portugais ont introduit le haricot commun en Afrique à partir du XVIe siècle (Messiaen, C.-M.,Seif, A.A., 2004). De nos jours, il a une importance mondiale, en particulier en Amérique du Nord et du Sud, en Europe et en Afrique Sa culture est usitée et for t répandue dans tous les pays du globe où il existe une période de trois à quatre mois sans gelées.

I.4.2.2. Classification

Le genre *Phaseolus* se classe dans la sous-tribu des *Phaseolinae*, tribu des *Phaseoleae*, famille des *Fabaceae* et ordre des Fabales. Selon l'APG (2003) on attribue au haricot la classification phylognétique suivante :

Sous Embrenchement : Angiospermes.

Clade: Eudicots.

Clade: Rosidées.

Clade : Fabidées.

Clade: Fabale.

Clade: Fabacae.

Genre : *Phaseolus*.

Espèce : *Phaseolus vulgaris L*.

I.4.2.3. Description

P.vulgaris est une plante herbacée annuelle avec un système racinaire pivotant caractérisé par de nombreuses ramifications latérales adventives, le plus souvent localisées en surface. La germination est épigée (les cotylédons émergent au-dessus du sol). Les feuilles primaires de la plante sont simples, opposées, pétiolées, stipulées et souvent stipelles (Baudoin *et al*, 2001).

Figure I.9: *L'espèce Phaseolus vulgaris L.(A) le fruit, (B) la tige, (C) la fleur, (D) les deux premières feuilles*

Les feuilles adultes sont alternes, 3-foliolées ; avec un pétiole atteignant (15 à 30) cm de long, distinctement épaissi à la base, à 3 nervures partant de la base. Les fruits sont des gousses déhiscentes, de forme et de longueur variable. En particulier leur section peut être cylindrique, ovale ou aplatie.

Les fleurs sont groupées en grappes déterminées (racèmes) de 4 à 10 fleurs, naissant à l'aisselle des feuilles. Ce sont des fleurs hermaphrodites, zygomorphes. Les graines sont réniformes, arrondie à ovale plus ou moins allongées ; à section circulaire ou plus ou moins aplatie. Le tégument peut être noir, blanc ou revêtu de différentes nuances de jaune, brun, rouge ou rose, il peut être unicolore diversement marbré ou panaché (Fig.I.9) (Chaux et Foury, 1994).

I.4.2. 4. Cycle végétatif

Le cycle végétatif complet du haricot est en moyenne de 75 à 80 jours pour le haricot vert, 90 à 100 jours pour le haricot demi-sec et de 120 à 130 jours pour le haricot sec.

D'après Lecomote (1997) le cycle végétatif du haricot comprend les phases suivantes : La phase de germination s'effectue en 4 à 8 jours suivant la température, la phase de croissance caractérisée par l'apparition des feuilles trifoliolées (5 à 6 jours après la levée) ; au bout d'un mois, le pied du haricot possède une dizaine de feuilles trifoliolées.

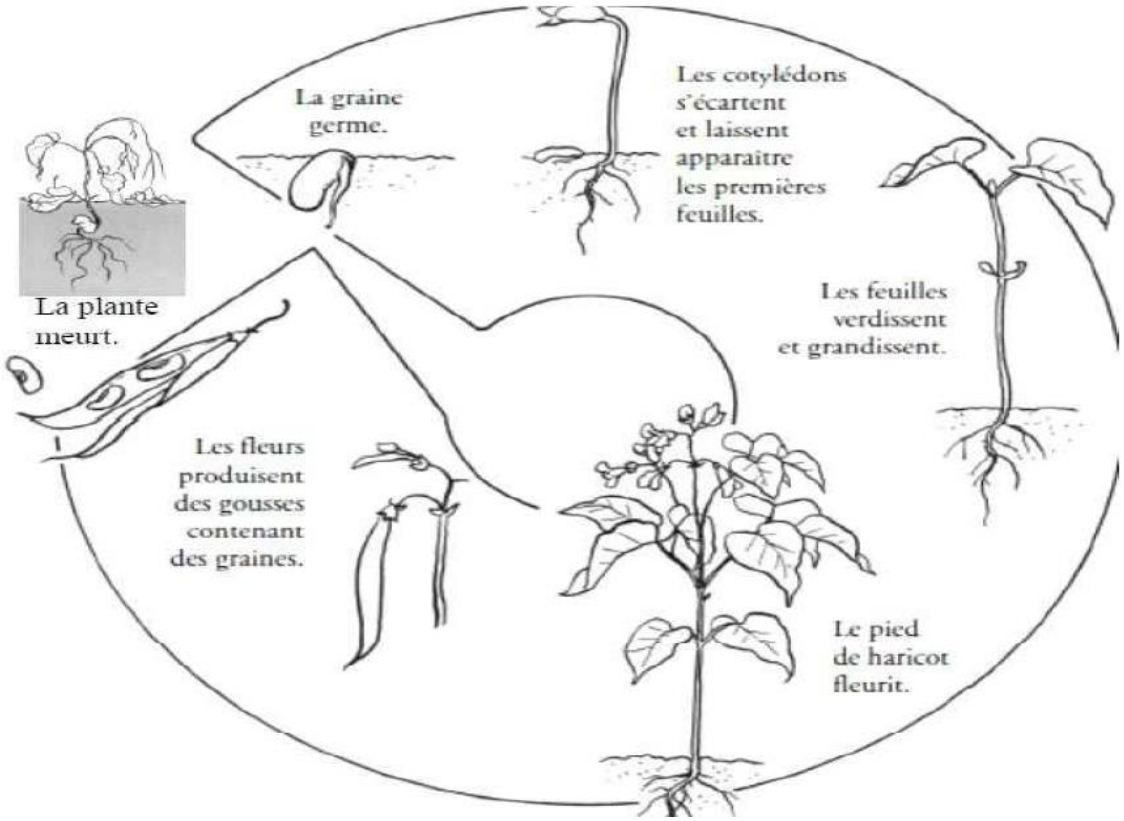


Figure I.10: *Cycle de développement de la plante de Phaseolus vulgaris (Diaw, 2002)*

La phase de floraison débute 3 semaines à 1 mois environ après le semis. Elle dure 1mois à 1 mois et demi suivant les conditions climatiques. (Fig I.10).

La jeune gousse met une douzaine de jours environ pour atteindre sa taille définitive. La phase de maturation ; une fois la taille définitive atteinte, les graines se forment en 15 à 20 jours. 20 à 30 jours après les gousses s'ouvrent d'elles- mêmes, les graines étant mûres.

I.4.2. 5. Exigences climatiques et édaphiques

La température optimale de croissance de la plante est de 25°C, le zéro végétatif (température en dessous de laquelle la croissance de la plante s'arrête) est de 11°C. La germination commence à partir de 12°C. Le haricot demande un sol se réchauffant vite, à bonne structure et riche en humus, pH de 5.5 à 6. Les sols les mieux indiqués sont ceux à caractère argileux-silicieux (Hubert, 1978).

I.4.2. 6. Importance de la culture du haricot

Le haricot commun est l'espèce la plus consommée dans le genre Phaseolus. Il constitue un aliment de base pour certaines populations de pays en développement, notamment en Amérique latine et en Afrique orientale. Selon Lomboly (2001) pour 100g d'haricot frais cru on trouve 1,8g de protéines, 7,1 g de glucides et 1,8 g de fibres alimentaires, ainsi que des sels minéraux. Les haricots contiennent très peu de lipides soit 0,1 g de lipides pour 100 g d'haricot. Les fanes récupérées après la récolte des graines peuvent servir de fourrage pour l'alimentation du bétail. (Michel P. et Claude F. 2003).

Sur le plan agronomique, le haricot est considérés comme un engrais vert grâce à son apport en azote au sol par un processus appelé fixation symbiotique de l'azote, d'où son utilisation en rotation des cultures (Canado *et al.*, 2003).

I.4.2. 7. Production du haricot en Algérie

La culture de haricot a connu une augmentation remarquable des superficies destinées à sa culture ainsi que sa production allant de 40121 tonnes en 2008 à 98003 tonnes en 2017 (Annexe V, Tab.1). Cette variation est accompagnée par un accroissement des rendements de 46533 hg/ha en 2008 à 85712 hg/ha en 2017 (FAOSTAT, 2017).

La zone de production se trouve dans le littoral et le sublittoral : Alger, Jijel, Blida, Tlemcen, Tizi ouzou, Bejaia, Oran, Mostaganem. (ITCMI 2010).

APPROCHE METHODOLOGIQUE

II. APPROCHE METHODOLOGIQUE

Pour atteindre l'objectif fixé par cette thèse à savoir ; l'évaluation de la toxicité du Cd sur deux dicotylédones de la famille des Fabaceae (*Phaseolus vulgaris L.* et *Vicia faba L.*) nous avons adopté la démarche suivante :

II.1. Choix du matériel végétal

Deux légumineuses, la fève (*Vicia faba L.*) et le haricot commun (*Phaseolus vulgaris L.*) ont été retenu pour cette étude. Ce choix est motivé par:

- Leur utilisation au laboratoire comme plantes modèles pour des études de toxicologie de différents polluants.
- Leur croissance vigoureuse
- Leur biomasse importante
- Leur sensibilité aux métaux (Barcello *et al*., 1988 ; Pourrut, 2008 ; Younis *et al*., 2018 a,b).

Selon les statistiques 2017 fournies par le ministère de l'agriculture et du développement rural (MADR), les superficies consacrées à la culture de haricot ont connu une augmentation de l'ordre de 25% entre 2008 et 2017. La production annuelle est de 98003 tonnes estimé sur la base d'un rendement moyen de 85712 hg/ha (FAOSTAT, 2017) .Tandis que, la production totale de la fève était d'environ 46856 pour la campagne agricole 2017. La production de ces légumineuses est localisée sur la partie littorale et sublittorale de l'Algérie : Alger, Jijel, Blida, Tlemcen, Tizi ouzou, Bejaia, Oran, Mostaganem. (ITCMI 2010).

II.2. Condition de culture et échantillonnage

Les graines des deux espèces étudiées ont été sélectionnées selon leurs morphologies, tailles (poids) et leurs états sanitaires à l'aide d'une loupe. Celles qui ne présentent pas de maladie visible sont utilisées selon un poids compris entre 0,4 à 0,5 g intervalle qui représente environ 80 % de la totalité des graines. Les graines sont ensuite désinfectées en surface à l'aide d'hypochlorite de sodium à 0,1 % (NaclO) pendant 10 min pour éliminer toute contamination fongique, rincé et trempé dans de l'eau distillée à température ambiante pendant 12 h. La germination est réalisée dans des boites en plastique scellés avec du papier filtre humidifié à 25 °C dans l'obscurité pendant 3 jours avec un taux d'humidité de 100 %. 800 semis relativement uniformes de *P.vulgaris* et 600 semis uniformes de *V. faba* ont été sélectionnés et transplantés dans des pots contenant du terreau avec une luminosité de (16 h de jour / 8 h de nuit), à une température moyenne de (25 °C le jour /20 °C la nuit) et une humidité relative moyenne de 75 %, arrosé selon la capacité au champ, calculée en grammes d'eau par gramme

de sol et, jusqu'à la fin de l'expérience pendant 21 jours. Les traitements suivants ont été envisagés : (i) 0,25 $g.l^{-1}$ de Cd, (ii) 0,5 $g.l^{-1}$ de Cd, (iii) 1 $g.l^{-1}$ de Cd. Le Cd a été fourni sous forme de solution de chlorure de cadmium ($CdCl_2$). Pour le témoin, le Cd a été omis. Les plantules subissent par la suite une batterie d'analyses morphologiques, physiologiques et biochimiques.

II.3. Essai de germination et d'élongation des radicules

Ce test sert à vérifier l'effet du cadmium sur la germination des graines. Pour déterminer la température idéale de germination, les graines des deux plantes étudiées ont été stérilisées et mises à germer sur papier imbibé d'eau dans des boîtes de Pétri à différentes température (15°C, 20°C, 25°C, 30°C et 35°C). Il ressort de cette expérience que la température idéale de germination pour les graines des deux espèces retenues pour cette étude est de 25°C, une température déjà retenue par Pourrut, (2008) ; Bellout *et al.* (2016) ; Taïbi *et al.* (2016).

Après sélection et désinfection, les graines ont été placées dans des boîtes contenant du papier filtre humidifié avec de la solution de cadmium à différentes concentrations de 0,25$g.l^{-1}$, 0,5$g.l^{-1}$, 1$g.l^{-1}$ et le témoin humidifié avec de l'eau distillée (Fig II.1). Dans chaque boîte, 50 graines ont été mises à une température de 25 °C dans l'obscurité. Les graines ont été arrosées au besoin par de l'eau distillée pendant 7 jours.

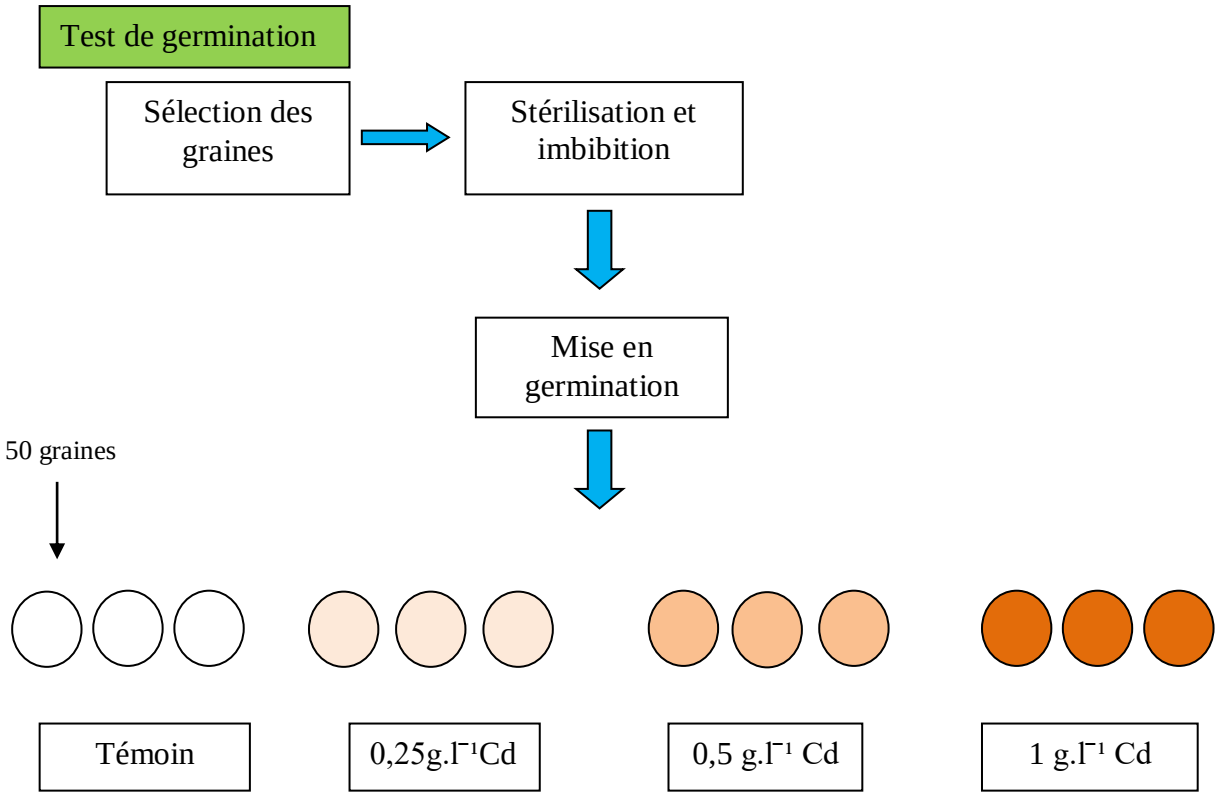


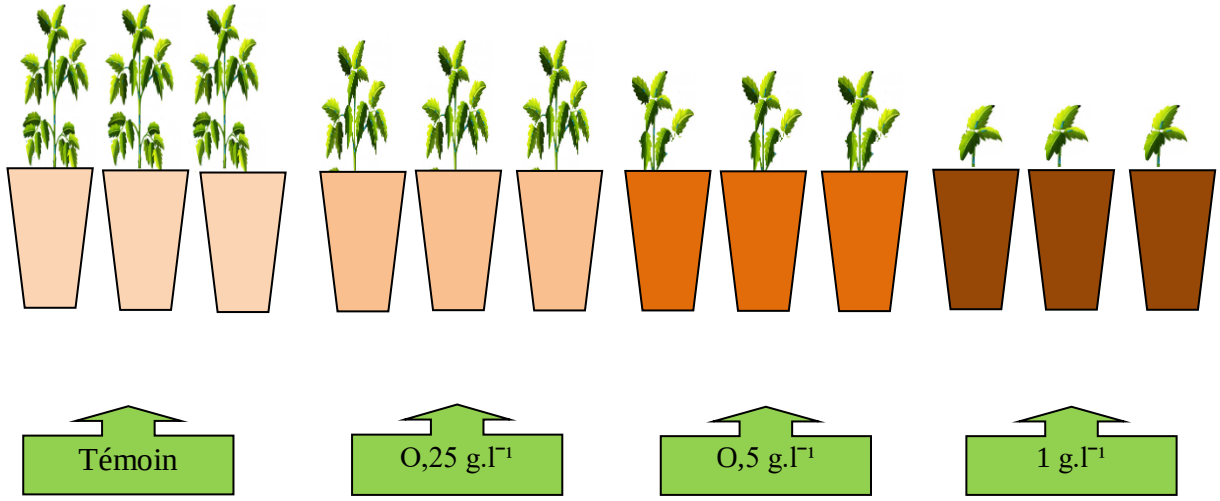
Figure II.1. *Schéma expérimental du test de germination*

Pour calculer le taux de germination, nous avons compté le nombre de graines germées par boîte tous les jours jusqu'au septième jour, sachant que la germination est positive lorsque sa radicule atteint cinque millimètres de longueur. Après le septième jour de germination, la longueur des racines des graines germées a été mesurée en cm. Pour obtenir le pourcentage de germination, nous avons utilisé la formule :

G(%)= (nombre de graines germées / nombre total de graines) x 100

II.4. Etude des paramètres morphologiques et statut hydrique

Après récolte, les plantules sont rincées abondement avec l'eau distillée, et les racines sont nettoyées à l'aide de pinceaux pour éliminer les traces du terreau. Les différents paramètres étudiés sont : la hauteur des tiges et la longueur des racines primaires (mesurées en cm); et le nombre de feuilles et de racines secondaires. Ensuite, la partie racinaire est séparée de la partie aérienne et séchée à une température de 80 °C pendant 48 h puis pesée jusqu'à l'obtention d'un poids constant pour la détermination de la matière sèche (MS).



II.4.1. Détermination de l'indice de tolérance

L'indice de tolérance (IT) est le rapport entre le poids de la matière sèche des plantules cultivés en présence de Cd et le poids de la matière sèche des plantules témoins. Des valeurs d'IT inférieures à 01 suggèrent que les plantes sont stressées en raison de la pollution par les métaux, les valeurs IT égales à 01 n'indiquent aucune différence par rapport aux témoins. Alors que les valeurs IT supérieures à 01 indiquent que la plante est un hyper accumulateur (Audet et Charest, 2007).

II.4.2. Détermination de la teneur relative en eau (TRE)

La teneur relative en eau (TRE) est déterminée selon la méthodede Slatyer, (1967).

Le poids des disques foliaires de 1 cm de diamètre immédiatement coupés et pesés à l'état frais correspond au poids de la matière végétale fraiche (PF). Ces disques sont placés dans des tubes à essai contenant de l'eau distillée et maintenus à l'obscurité à 4°C pendant 24 heures, puis sont récupérés et essuyées délicatement avec un papier buvard et pesées à nouveau pour déterminer le poids en pleine turgescence (PT). Ils sont ensuite placés dans l'étuve à 81°C pendant 48 heures, pour obtenir le poids de matière végétale sèche (PS). Le poids est exprimé en milligrammes (mg). L'opération est effectuée pour trois individus de chaque traitement (témoin et essais). La RWC est calculée selon :

$$\text{T.R.E. (\%)} = \frac{\text{PMVF - PMVS}}{\text{PT - PMVS}} \times 100$$

PMVF : poids de la matière végétale fraîche (mg).

PMVS : poids de la matière végétale sèche (mg).

PT : poids en plein turgescence (mg).

II.5. Etude des paramètres biochimiques et physiologiques

II.5.1. Détermination des pigments photosynthétiques

Le dosage des pigments photosynthétiques (chlorophylle a et b, caroténoïdes), est basé sur la méthode de Lichtenthaller (1987), réalisé par méthode colorimétrique.

Les pigments photosynthétiques ont été extrait avec de l'acétone à 80 % sur des feuilles pleinement développées, 10 mg de MVF ont été prélevé et broyé à sec auquelles nous avons rajouté par la suite 2 ml d'acétone à 80%. Le broyat obtenu est centrifugé à 3000 tr/mn pendant 10 mn. Le surnagent qui contient les pigments est récupéré, les densités optiques, sont lues au spectrophotomètre après son étalonnage avec un blanc de 2 ml d'acétone à 80%, aux longueurs d'ondes suivantes $\lambda a = 647$ nm et $\lambda b = 663$ nm pour les chlorophylles a et b, $\lambda c = 470$ nm pour les caroténoïdes.

Les teneurs en pigments photosynthétiques ont été calculées selon Lichtenthaler (1987) :

Chl a (µg/ml) = 12,25 . DO λb - 2, 79 . λa

Chl b (µg/ml) = 21,5 . λa - 5, 1 . λb

Chl a + Chl b (µg/ml) = 7,15 . λb + 18,71 . λa

Caroténoïdes (µg/ml) = {(1000× λc) – [(1,82 × Chl a) + (85,02 × Chl b)]}/198

Les teneurs en pigments foliaires sont exprimées en $mg.g^{-1}$ de MVF.

II.5.2. Détermination des sucres solubles totaux

II.5.2. 1. Principe

La méthode du dosage des sucres solubles est basée sur la technique de Dische (1962). Les oses, en présence de l'acide sulfurique et à chaud, produisent des dérivés du furfural qui réagissent à chaud avec l'anthrone pour donner un composé bleu-vert.

II.5.2. 2. Extraction

Pour la détermination des sucres solubles, 50 mg de MVF (feuilles) sont bouillies dans 1 ml d'éthanol à 80% (v / v) à 70°C pendant 15 min, le broyat est centrifugé à 10 000 tr / min pendant 15 min. Le surnageant est ensuite dilué au (1:10) avec de l'eau distillée.

II.5.2. 3. Dosage

A 250 µL d'extrait glucidique sont rajouté 1,25 ml de réactif à l'anthrone (120 mg d'anthrone dissous dans 60 ml de solution d'acide sulfurique: 250 ml de H_2SO_4 dans 100 ml d'eau distillés eau). Les tubes sont agités puis placés au bain- marie à 95°C pendant 10 mn pour permettre le développement de la coloration. Après refroidissement L'absorbance est mesurée à 620 nm. Le spectrophotomètre est préalablement étalonné avec un blanc préparé à partir de 1 ml d'éthanol et de 2 ml de réactif. La teneur en sucres éthanolosolubles est exprimée en $mg.g^{-1}$ de MVF.

Des standards de glucose ont été préparés à partir d'une solution mère de 100 µg ml^{-1} et analysé de la même manière pour obtenir une courbe d'étalonnage (Annexe I ; Fig.1).

II.5.3. Détermination de la teneur totale en protéines

II.5.3. 1. Principe

Les protéines sont dosées selon la méthode de Bradford (1976), qui utilise le bleu brillant de Coomassie G250 comme réactif. Ce dernier, forme un complexe bleu avec les protéines, la coloration est proportionnelle à la quantité de protéines présentes, elle se développe, rapidement et reste stable pendant une heure. Le maximum d'absorption du complexe protéines-bleu de Coomassie se situe à 595 nm.

II.5.3. 2. Extraction

100 mg de l'échantillon de chaque concentration est broyé dans un mortier avec 1ml d'un tampon d'extraction 5mM Tris-HCl, pH 7.2, 0.25M sucrose et 1mM $MgCl_2$, L'extrait est ensuite centrifugé pendant 10 mn à 12000 tr/mn à 4°c, afin de sédimenter le matériel non soluble.

II.5.3. 3. Dosage

3 ml de réactif de Bradford sont ajoutés à 100 µl de surnageant, l'ensemble est homogénéisé

et incubé à température ambiante pendant quelques minutes. La lecture est faite à une longueur d'onde λ= 595 nm, après étalonnage du spectrophotomètre par un blanc préparé à partir de 100µl d'eau distillée et 3 ml de réactif de Bradford.

Une gamme étalon (Annexe I ; Fig.3) est réalisée à l'aide de concentrations croissantes de sérum albumine bovine (BSA) préparées à partir d'une solution mère de 1mg.ml^{-1}. La teneur en protéines est exprimée en équivalents de BSA (mg éq. BSA. g^{-1}MVF).

II.5.4. Détermination du contenu en proline

II.5.4.1. Principe

Cette technique est basée sur la capacité de la proline à réagir en milieu acide à chaud avec la ninhydrine pour donner un composé de couleur rose, soluble dans le toluène.

II.5.4.2. Extraction

La teneur en proline est déterminée d'après Bates *et al*. (1973). 150 mg des feuilles sont mélangés avec 3 ml d'acide sulfosalicylique à 3% et centrifugé à 10 000 tr / min pendant 15 minutes.

II.5.4.3. *Dosage*

Un millilitre de surnageant est mélangé avec 1 ml d'acide acétique glacial et 1 ml de réactif à la ninhydrine (1,25 g de ninhydrine dissous dans 30 ml acide acétique glacial et 20 ml d'acide phosphorique 6 M), incubés pendant 1 h à 100°C puis refroidi dans un bain de glace. Le mélange réactionnel est extrait avec 2 ml de toluène et mélangé vigoureusement pendant 20 secondes. Le chromophore contenant du toluène est aspiré de la phase aqueuse et l'absorbance est mesurée à 520 nm. Des standards de la proline sont préparés et analysés de la même manière pour obtenir une courbe d'étalonnage (Annexe I ; Fig.2).

II.6. Détermination des teneurs en composés phénoliques

II.6.1. Traitement et conservation des échantillons

Les plantules ont été bien lavés à l'eau du robinet, la partie aérienne est séparée de la partie racinaire puis séchées, dans une étuve dotée d'aération à 40°C, jusqu'à ce que la teneur en matière sèche atteint 90% (Silanikove *et al.*, 1996 ; Ma *et al.*, 2009). Lors des différentes expérimentations, pour éviter les variations entre les feuilles de différents étages foliaires ou entre racines, les échantillons sont broyés grossièrement afin d'homogénéiser le tout à l'aide d'un broyeur électrique de laboratoire. Les poudres obtenues ont été tamisées au moyen d'un tamis dont le diamètre des mailles est de 500 µm (Fig.II.2).

Les poudres ainsi obtenues ont été ensuite conservées dans des bocaux en verre, fermés, étiquetés et stockés à l'abri de la lumière, pour une prochaine utilisation.

II.6.2. Préparation des extraits bruts (composés phénoliques)

Le protocole extractif a été effectué selon la méthode de Ferreira *et al*. (2016). Une quantité de 5 g du matériel végétal broyé est macérée à la température ambiante dans 50 ml du méthanol 80% pendant 2h sous agitation continue. L'extrait est filtré et le résidu est repris une autre fois avec 50 ml du même solvant. Les volumes des deux filtrats obtenus sont mélangés puis centrifugés à 3000 tr/mn pendant 05 minutes, les solutions méthanoliques des parties concernées (aérienne et sous terraine) sont évaporées à sec sous pression réduite dans un évaporateur rotatif à 60°C. Les résidus secs sont repris dans 5ml du méthanol.

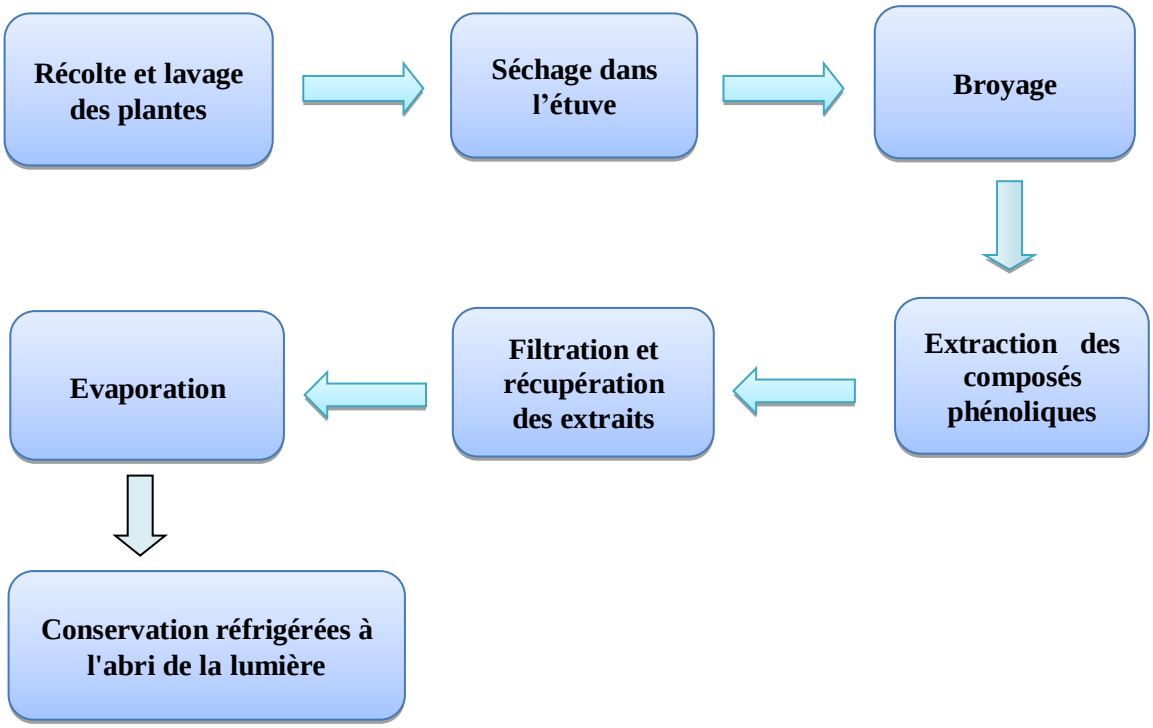


Figure II.2. *Schéma expérimental des étapes de préparation des extraits bruts des plantes étudiées*

II.6.3. Dosage des composés phénoliques

II.6.3.1. Polyphénols totaux

II.6.3.1. 1. Principe

Le dosage des polyphénols totaux dans les extraits de la partie aérienne et racinaire des deux plantes étudiées, est effectué selon la méthode de Meyers *et al*. (2003) utilisant le réactif de Folin–Ciocalteu. Le réactif utilisé est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique de couleur jaune. La réaction est basée sur la réduction du complexe d'acide phosphotungstique et de l'acide phosphomolybdique du réactif de Folin Ciocalteu, lors de l'oxydation des phénols, en un nouveau complexe d'oxyde bleu de

tungstène et de molybdène. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux (Ribéreau-Gayon, 1968).

II.6.3.1. 2. Dosage

Un volume de 100 µl pour chaque extrait est introduit dans des tubes à essais, auquel le mélange (750 µl de carbonate de sodium (7,5%) et 750 ul de réactif de Folin-Ciocalteu (dilué à 1/10) est additionné. Après 2 heures d'incubation (à la température ambiante et à l'obscurité) les absorbances sont mesurées à 750 nm.

La courbe d'étalonnage (Annexe III ; Fig.1) est établie avec l'acide gallique dans les mêmes conditions opératoires que les extraits. La teneur en polyphénols totaux est exprimée en milligramme équivalent d'acide gallique par gramme de matière sèche (mg EAG/g MS).

II.6.3.2. Flavonoïdes

II.6.3.2. 1. Principe

La quantification des flavonoïdes est réalisée selon la méthode de Bahorun *et al*. (1996), qui utilise le trichlorure d'aluminium susceptible de donner un complexe jaunâtre avec le groupement OH libre en position 5des flavonoïdes. La coloration est proportionnelle à la quantité de flavonoïdes présente (Ribéreau-Gayon, 1968).

II.6.3.2. 2. Dosage

Une quantité de 1ml de l'extrait méthanolique est ajoutée à 1ml d'une solution méthanolique à 2% de chlorure d'aluminium hydraté ($AlCl_3$, 6 H_2O). Après incubation de 10 minutes à la température ambiante et à l'obscurité, les absorbances sont mesurées à 430 nm contre le blanc.

Les teneurs en flavonoïdes totaux sont déduites à partir de la courbe d'étalonnage établie avec la quercétine (Annexe III ; Fig.4), et préparée de la même manière que l'extrait. Les résultats sont exprimés en milligramme équivalent de quercétine par gramme de matière sèche (mg EQ/g MS).

II.6.3.3. Flavonols

Les teneurs en flavonols sont déterminées selon la méthode de Kumaran et Karunakaran (2007). 1ml d'extrait est mélangé avec 1ml d'une solution éthanolique à 2% de chlorure d'aluminium hydraté et 1.5 ml d'acétate de sodium (50 mg/ml). Après 02h30 d'incubation à 20ºC et à l'obscurité, les absorbances sont mesurées à 440 nm contre un blanc.

Les concentrations des flavonols des différents extraits sont déduites à partir de la courbe d'étalonnage, établie avec la quercétine (Annexe III ; Fig 5) et sont exprimées en en milligramme équivalent de quercétine par gramme de matière sèche (mg EQ/g MS).

II.6.3.4. Tanins condensés

II.6.3.4.1. Principe

La méthode proposée par Swain et Hillis (1959) est utilisée pour quantifier les tanins condensés dans les différents extraits. Le test est basé sur la condensation des composés polyphénoliques avec la vanilline en milieu acide. Il est spécifique des flavanes-3-ols (Price *et al*., 1978).

II.6.3.4. 2. Dosage

1ml d'extrait est mélangé avec 2 ml de réactif de vanilline (vanilline à 1% dans 70 % d'acide sulfurique). Après 15 min d'incubation à 20°C, les absorbances sont mesurées à 500 nm . La concentration des tannins est estimée en milligramme (mg) équivalents de catéchine par gramme (g) du poids de la matière sèche (mg EC/g MS) à partir de la courbe d'étalonnage (Annexe III ; Fig 3).

II.6.3.5. Tanins hydrolysables

II.6.3.5. 1. Principe

Les teneurs en tanins hydrolysables sont déterminées selon la méthode de Mole et Waterman (1987), la méthode repose sur l'aptitude des tanins à réagir avec le chlorure ferrique et former un complexe de couleur rouge violette.

II.6.3.5.2. Dosage

1ml d'extrait est mélangé avec 3,5ml de réactif de chlorure ferrique (0.01M dans HCl à 0.001M). Les absorbances sont mesurées à 660 nm, 15 secondes après l'addition du réactif.

La courbe d'étalonnage est préparée de la même manière que l'extrait, en utilisant l'acide tannique comme standard (Annexe III ; Fig. 2). La teneur en tanins hydrolysables est exprimée en milligramme équivalent d'acide tannique par gramme de matière sèche (mg EAT/g MS).

II.7. Etude anatomique

Après 21 jours de semis, les échantillons sont prélevés pour une étude par microscopie optique. Des plantes fraîches sont utilisées. Des coupes transversales sont réalisées sur la racine principale (1 cm du collet ; zone des racines secondaires) (Fig II.3), et celles de la tige sont effectuées dans la zone du premier entre-nœud. Les échantillons sont coupés avec un vibratome afin d'obtenir des coupes transversales de 100 micromètres ; des coupes fraîches sont recueillies et colorées au carmin vert d'iode comme décrit par Locquin et Langeron (1978).

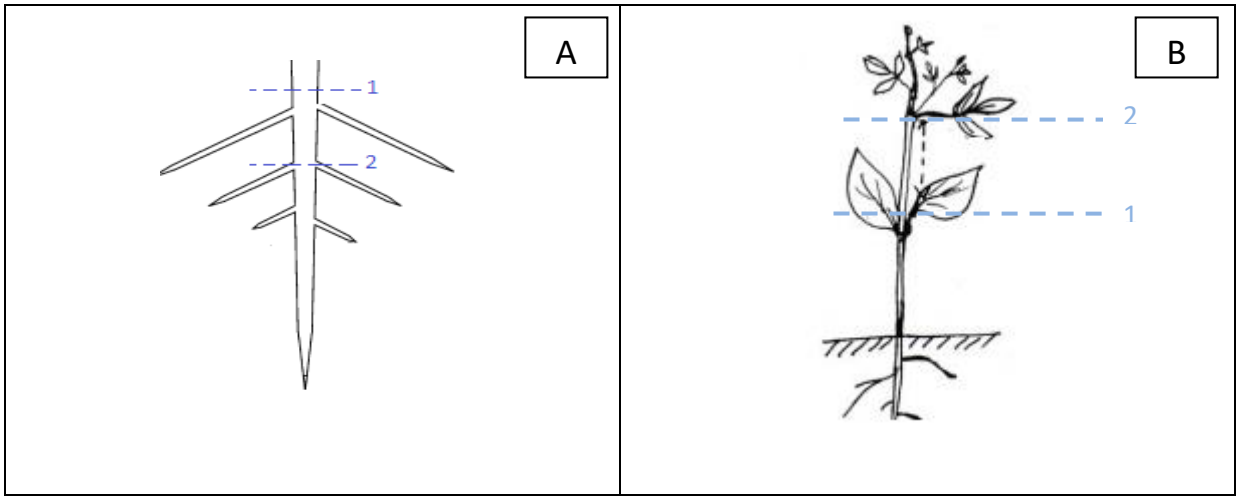


Figure II.3. *Schéma de localisation des coupes au niveau des racines(A) et des tiges (B).*

Les coupes ainsi préparées sont analysés à l'aide d'un microscope optique (optika B-350, Italie) utilisant les grossissements × 100 et × 400, des micrographies sont prises par un appareil photo numérique et les images sont traitées et archivées avec le logiciel TS view version 6.2.4.5.tucsen imagin technology

II.8. analyses statistiques

Toutes les données présentées sont les valeurs moyennes de trois répétitions ± écart-type (ET). L'analyse statistique est réalisée par le test de student au niveau de signification de 5%, 1% et 0,1%, en utilisant le logiciel statistique STATISTICA version 8.0

RESULTATS ET DISCUSSION

III. RESULTATS ET DISCUSSION

III.1. Effet du Cd sur la germination et l'élongation de la radicule de *Phaseolus vulgaris L.* et *Vicia faba L.*

Dans un premier temps, l'effet du Cd a été étudié en mesurant le taux de germination et l'élongation radiculaire des graines germées en présence de différentes concentrations de Cd : 0.25 g.l^{-1} ; 0.5 g.l^{-1} et 1 g.l^{-1}.

La figure III.1 représente la cinétique de germination (A) et l'élongation de la radicule (B, C) des graines de haricot commun *(Phaseolus vulgaris L)* cultivées dans un sol non pollué (témoin) et dans des sols pollués avec des concentrations croissantes de Cd. La germination commence le deuxième jour pour l'ensemble des graines, elle atteint un taux maximum de 90% au septième jour pour le témoin, alors que dans les sols pollués la germination a été abaissée significativement d'environ 68% avec 0,25 g.l^{-1} de métal, 84% avec 0,5 g.l^{-1} et 98% avec la concentration de 1 g.l^{-1} de Cd ($p < 0,05$ *) par rapport au témoin (Fig. III.1A).

L'élongation de la radicule durant la période de germination dans le lot témoin atteint 1,2 cm de long. En revanche, dans les lots traités les résultats montrent une réduction très significative de 70%, 87%, 91% (Fig.III. 1B) sous l'effet de 0.25 g.l^{-1} ; 0.5 g.l^{-1}et 1 g.l^{-1} de Cd respectivement ($p<0.01$**) comparé au témoin.

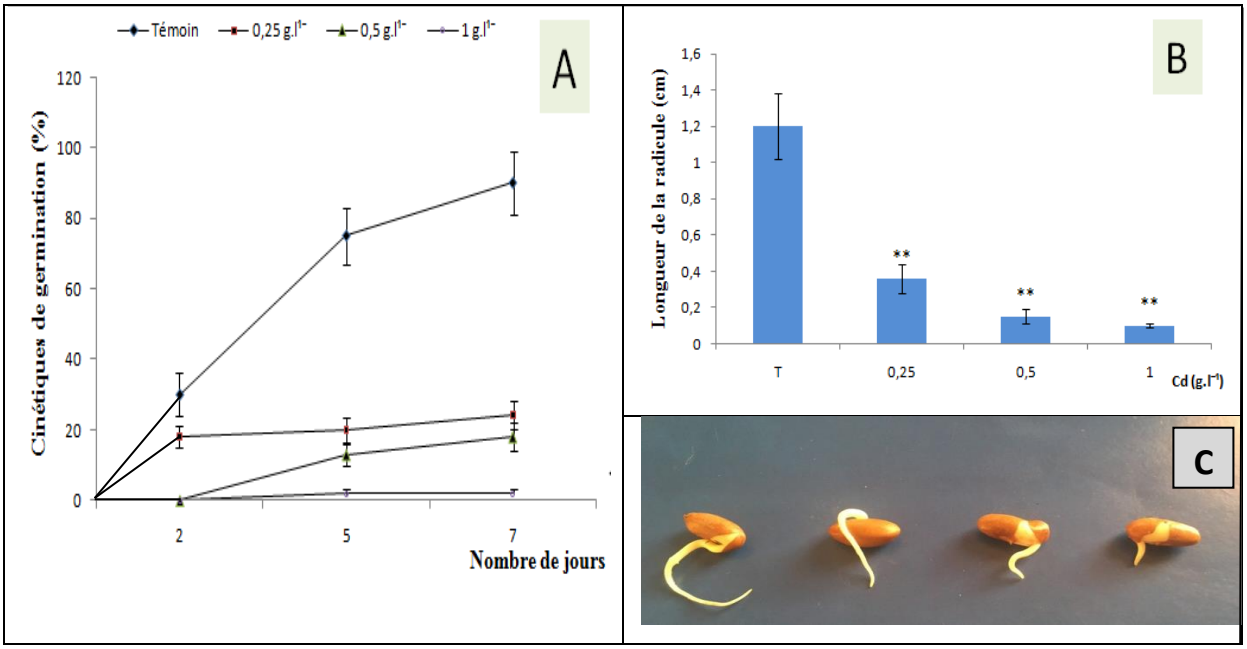


Figure III.1 : *Effet du Cd sur (A) la cinétique de germination (B) l'élongation de la radicule des graines de haricot commun (Phaseolus vulgaris L). Les résultats représentent la moyenne ± SE (n = 3) (*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 selon le test de Student)*

Chez la fève la germination commence également le deuxième jour, elle atteint un taux maximum de 100% au cinquième jour chez le témoin. Cependant, dans les sols pollués la germination affiche une réduction par rapport au témoin d'environ 9% sous l'effet de 0.25 $g.l^{-1}$ de Cd, 20% sous 0.5 $g.l^{-1}$ de Cd, et 44% sous 1 $g.l^{-1}$ de Cd par rapport au témoin (Fig. III.2.A).

L'élongation de la radicule chez la fève est sensiblement affectée par la présence de Cd dans le milieu (Fig. III.2.C). Elle diminue fortement et significativement chez les graines exposées au Cd ($p<0,01$). En effet, après 7 jours de germination, nous notons des valeurs moyennes de 3,7 cm pour les graines témoins et de 1,7 cm ; 1,13 cm ; 0,6 cm pour celles exposées à 0.25 $g.l^{-1}$; 0.5 $g.l^{-1}$ et 1 $g.l^{-1}$ de Cd respectivement (Fig. III.2.B).

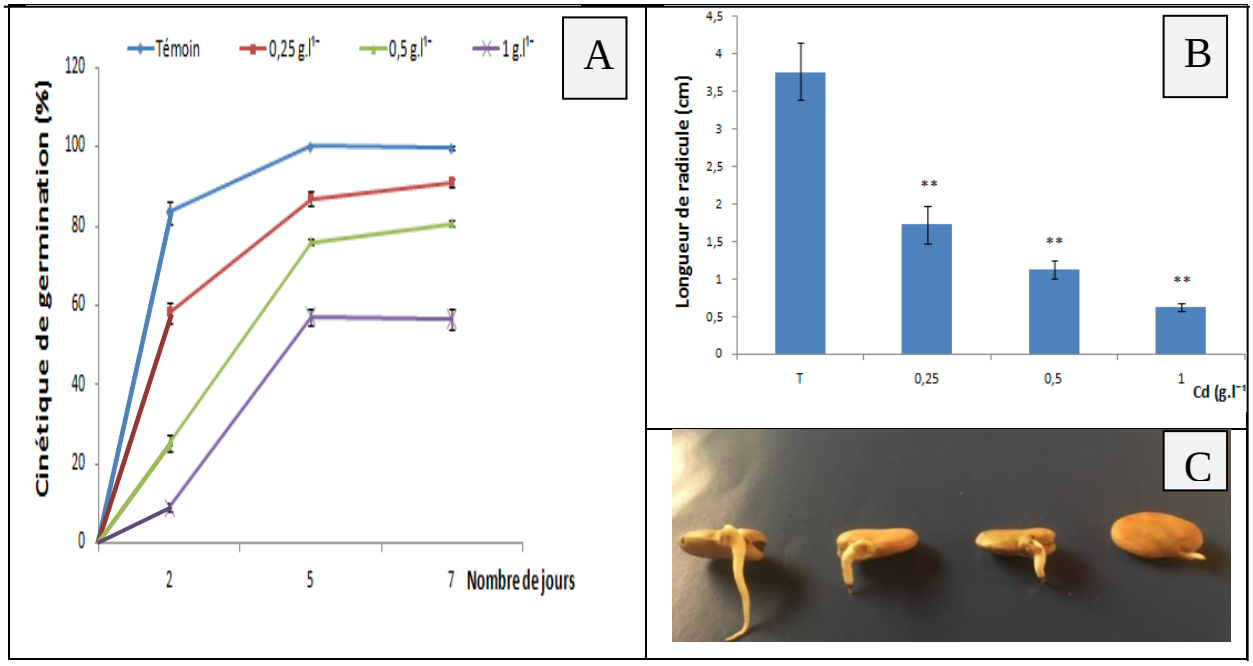


Figure III.2 : *Effet du Cd sur (A) la cinétique de germination (B)et (C) l'élongation de la radicule des graines de la fève (Vicia faba L). Les résultats représentent la moyenne ± SE (n = 3) (*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 selon le test de Student)*

Les tests de germination des graines et d'allongement des radicules sont fréquemment utilisés pour évaluer la phytotoxicité des métaux lourds (Wang et Keturi, 1990; Munzuroglu et Geckil, 2002). Nos résultats ont indiqué une inhibition significative de la germination des graines et de l'élongation des racines en présence du Cd, nos résultats corroborent ceux obtenus par Li *et al*. (2005) sur *Arabidopsis thaliana*. Hsu et Chang-Hung Chou (1992) ont rapporté que parmi les métaux lourds testés, le Cd présentait une plus grande toxicité pour la germination des graines de Miscanthus, Fattahi *et al*., (2019) ont également indiqué que

l'augmentation des concentrations de Cd entraînait une augmentation du temps de germination et une réduction de son pourcentage.

Les effets des métaux lourds sur la germination des graines dépendent de leur capacité à atteindre les tissus embryonnaires à travers les barrières physiologiques, principalement les téguments des graines (Akinci et Akinci, 2010). Cette capacité dépend directement de la structure de l'enveloppe de la graine, qui varie selon les espèces végétales, et des propriétés physiques et chimiques des ions métalliques eux-mêmes (Seregin et Kozhevnikova, 2005).

La germination des graines de haricot commun et de la fève est sensible au Cd, apparemment parce que l'enveloppe des deux graines peut être perméable au Cd. Selon la perméabilité du tégument de la graine, la germination des graines dépend presque exclusivement des réserves de graines pour l'apport de métabolites pour la respiration et d'autres réactions anaboliques (Liu *et al*. 2005).

Shri *et al*. (2009) ont évoqué que l'induction du stress oxydatif est le principal processus sous-jacent à la toxicité de l'arsenic chez les plantes. L'amidon est quantitativement le matériau le plus stocké dans les graines, qui est dégradé via diverses enzymes, telles que l'amylase, pour la germination. Par conséquent, l'inhibition de réactions enzymatiques spécifiques par les métaux est l'une des principales raisons de la toxicité des métaux. La toxicité de l'As (III) est liée à sa haute affinité pour les groupes sulfhydryle des biomolécules, comme le glutathion et l'acide lipoïque, et les résidus cystéinyl de nombreuses enzymes (Aposhian et Aposhian, 2006). La formation de liaisons As (III) -sulfure entraîne divers effets nocifs en inhibant les activités enzymatiques, telles que la glutathion réductase, la glutathion peroxydases, la thiorédoxine réductase et la thiorédoxine peroxydase (Sharma et Sohn, 2009).

Selon Kranner et Colville (2011), le Cd entrave l'absorption d'eau, inhibant la germination des graines, et prolongeait leur dormance à température ambiante, Munzuroğlu *et al*. (2008) démontrent que l'inhibition de la germination était liée à l'accumulation d'acide abscisique dans les graines. De plus, l'amidon est le matériau stocké le plus abondant dans les graines utilisées en germination après avoir été dégradé par des enzymes telles que l'amylase ; ainsi, l'inhibition de réactions enzymatiques spécifiques par les métaux lourds a un effet négatif sur la germination (Ko *et al*., 2012).

III.2. Effet du Cd sur la croissance des plantules de *Phaseolus vulgaris* L. et *Vicia faba* L.

Les changements morphologiques dans les plantules de *Phaseolus vulgaris* L. traitées avec des concentrations croissantes de Cd ont montré une chlorose foliaire, une inhibition de la

croissance ; et des tiges affaiblies (Fig.III.4). Chez la fève les extrémités des racines étaient brun foncé (Fig.III.3).

Figure III.3 : *Morphologie de la fève (Vicia faba, L)*

Figure III.4 : *Morphologie de haricot commun (Phaseolus vulgaris. L)*

Nous avons noté que les plantules de haricots et de fève âgés de 21 jours sur un sol pollué ont développé tous les organes aériens mais plus courts que les plantes témoins. Les extrémités des racines brun foncé et la croissance réduite sont les effets physiologiques les plus courants de l'exposition aux métaux lourds chez les plantes (Ovečka et Takáč, 2014).

III.2.1. Effet sur la hauteur de la tige et la longueur de la racine primaire

Les résultats obtenus sur les tiges et les racines de haricot cultivées dans des concentrations croissantes de Cd sont illustrés dans la figure III.5. La longueur des pousses des plantules d'haricot durant 21 jours de culture dans le lot témoin est de (35,26 ± 6,04 cm de hauteur). En revanche, dans les lots traités la hauteur des pousses passe à 31,7, 16,43, et 11,33 cm avec les concentrations 0.25 $g.l^{-1}$; 0.5 $g.l^{-1}$ et 1 $g.l^{-1}$ de Cd respectivement, soit une réduction hautement significative qui atteint 68.58% avec la concentration de 1 $g.l^{-1}$ de Cd ($p < 0,01$**).

Les résultats de l'effet de Cd sur la longueur de la racine primaire des plantules de haricot montrent un effet inhibiteur du Cd sur la croissance linéaire des racines (Fig. III.5), En effet, après 21 jours de croissance, nous notons la valeur 7,2 cm pour le témoin et 6,06 ; 2 ; 2 cm pour les lots traités avec 0.25 $g.l^{-1}$; 0.5 $g.l^{-1}$ et 1 $g.l^{-1}$ de Cd respectivement. Soit une réduction hautement significative de 71.43% avec la concentration de 1 $g.l^{-1}$ ($p < 0,01$**).

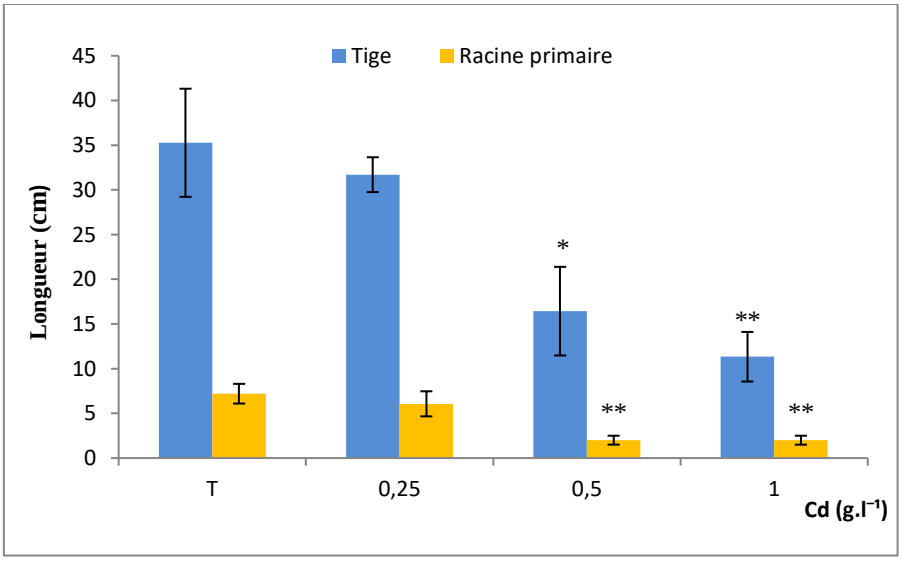


Figure III.5 : *Effet du Cd sur la hauteur des pousses et la longueur de la racine primaire de haricot commun (Phaseolus vulgaris L). Les résultats représentent la moyenne ± SE (n = 3) (*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 selon le test de Student)*

Des résultats similaires ont été obtenus avec les plantules de la fève. En effet, la hauteur des pousses qui était de 50,33 cm chez les plantules témoins a diminué significativement à 25,33 ; 23,33 ; et 21,33 cm chez les plantules traitées respectivement avec 0.25 $g.l^{-1}$; 0.5 $g.l^{-1}$ et 1 $g.l^{-1}$

de Cd ; Soit une réduction maximale de 58 % avec la plus forte concentration de Cd. De même que la longueur de la racine qui était de 20 cm chez les plantules témoins a diminué à 11 ; 10,66 ; et 9,66 cm avec 0.25 $g.l^{-1}$; 0.5 $g.l^{-1}$ et 1 $g.l^{-1}$ de Cd respectivement (Fig III.6).

Les résultats montrent que les longueurs des pousses et des racines diminuent nettement avec l'augmentation des concentrations de Cd.

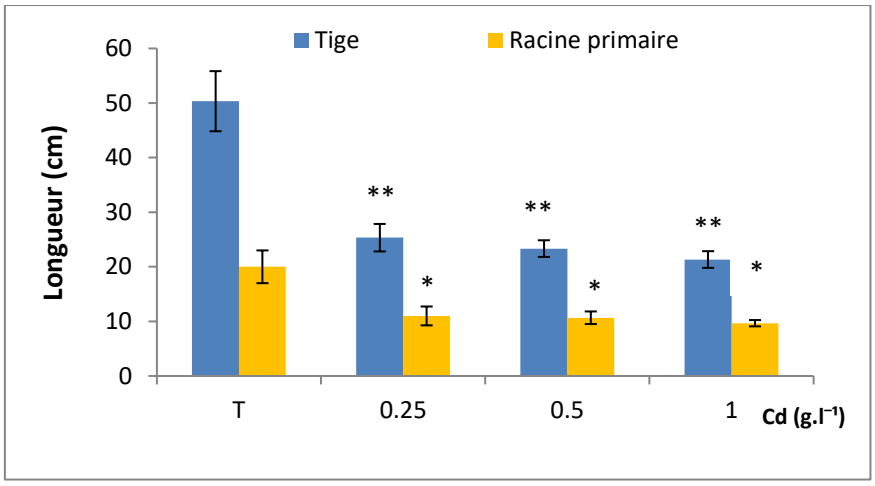


Figure III.6 : *Effet du Cd sur la hauteur de la tige et la longueur de la racine primaire de la fève (Vicia faba). Les résultats représentent la moyenne ± SE (n = 3) (*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 selon le test de Student*

III.2.2.Effet sur le nombre de feuilles et de racines secondaires

La visualisation de la figure III.7, montre que le nombre de feuilles passe de 8 feuilles par plantule de haricot chez le témoin à 4 feuilles chez les plantules traitées avec les concentration 0.5 $g.l^{-1}$ et 1 $g.l^{-1}$ de Cd ; soit une forte diminution de 50% du nombre des feuilles, alors qu'elle est de 25% de perte lorsque la concentration est de 0,25 $g.l^{-1}$ de Cd (p<0 ,05*).

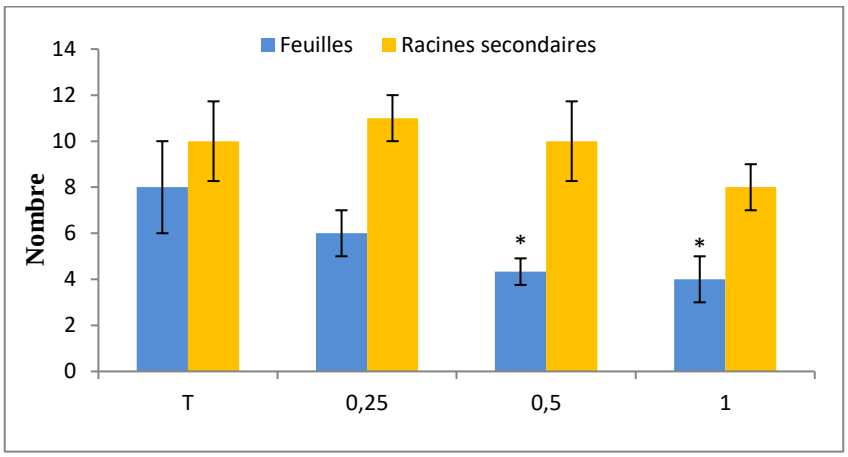


Figure III.7 : *Effet du Cd sur le nombre de feuilles et de racines secondaires de haricot commun (Phaseolus vulgaris L). Les résultats représentent la moyenne ± SE (n = 3) (*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 selon le test de Student)*

Quant au nombre de racines secondaires, la diminution n'est pas significative, elle n'a pas dépassé les 20% avec la concentration la plus élevée de Cd.

Sur la figure III.8 nous pouvons lire que le nombre de feuilles et de racines secondaires chez la fève cultivée sur un sol pollué par le Cd avec la concentration de 1 $g.l^{-1}$ présentent une diminution de l'ordre de 67% et 48% respectivement. En effet le nombre de feuilles passe de 18 à 6 feuilles ($p<0,001$), et les racines secondaires de 27 à 14 racines ($p<0,05$) (Fg III.8).

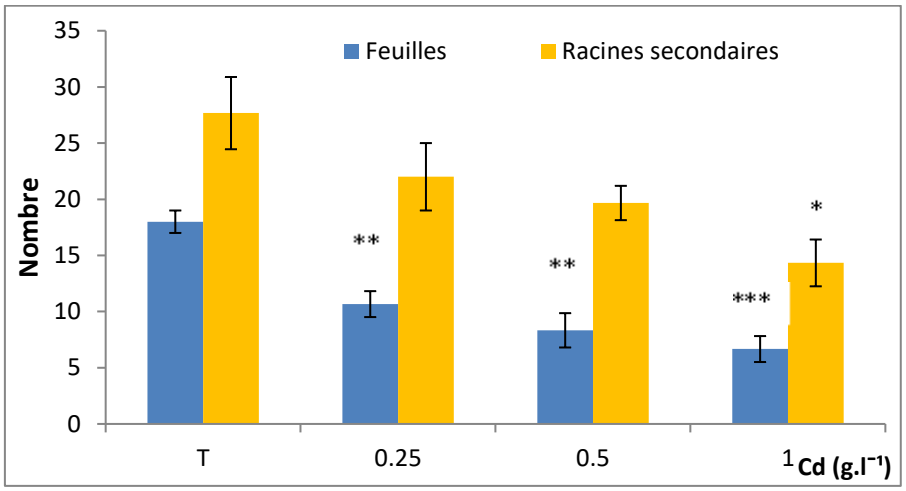


Figure III.8 : *Effet du Cd sur le nombre de feuilles et de racines secondaires de la fève (Vicia faba L). Les résultats représentent la moyenne ± SE (n = 3) (*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 selon le test de Student)*

III.2.3. Effet sur le poids de la matière végétale sèche

Les résultats de l'effet de Cd sur le poids de la matière végétale sèche des plantules de haricot commun peuvent être visualisés sur la Figure III.9.

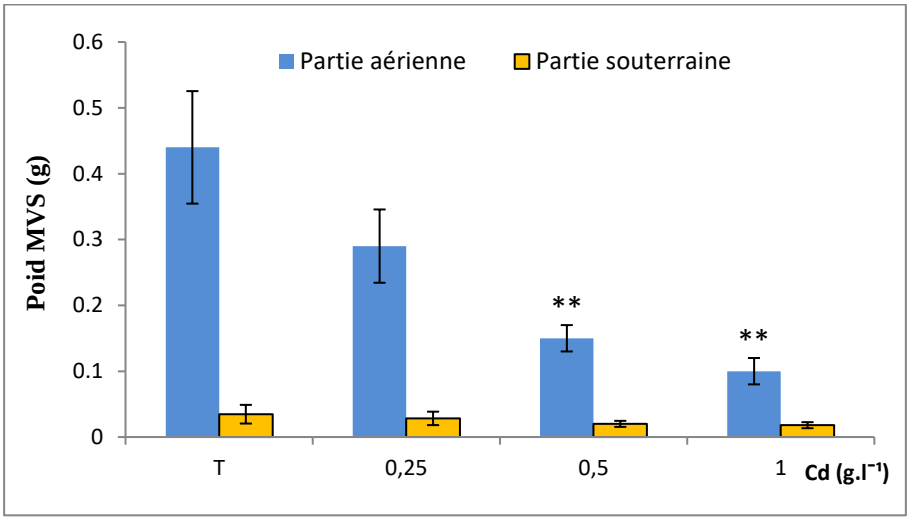


Figure III.9 : *Effet du Cd sur le poids de la matière végétale sèche de haricot commun (Phaseolus vulgaris L). Les résultats représentent la moyenne ± SE (n = 3) (*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 selon le test de Student)*

Les teneurs 0.5 $g.l^{-1}$ et 1 $g.l^{-1}$ de Cd ont provoqué une perte importante du poids sec de la partie aérienne ($p < 0,01$**). En effet le poids sec de la partie aérienne est passé de 0,44 à 0,15

g (65,90 %) et 0,1g (77,27%) de réduction respectivement pour les concentrations indiquées. Cet effet inhibiteur du cadmium sur la production de la biomasse des plantules affecte aussi bien les racines que les parties aériennes, avec un effet plus marqué sur les parties aériennes que sur les parties racinaires ($p>0,05$), ceci peut être expliqué par la longueur des racines secondaires qui a contribué à augmenter le poids de la partie racinaire.

Le poids de la MVS de la partie aérienne des plantules de la fève traitées par le métal est affecté dès la première concentration de Cd utilisée. La réduction est de 51% sous la concentration 0.25 $g.l^{-1}$; et 57 % sous 0.5 $g.l^{-1}$ et 74 % sous 1 $g.l^{-1}$ de Cd.

Le poids de la MVS de la partie souterraine des plantules de la fève est en relation perpétuelle avec le nombre des racines secondaires. Le Cd présente un effet dépressif significatif sur le poids de la MVS (Fig III.10) avec une perte avoisinant les 63 % pour la concentration de 1 $g.l^{-1}$ de Cd.

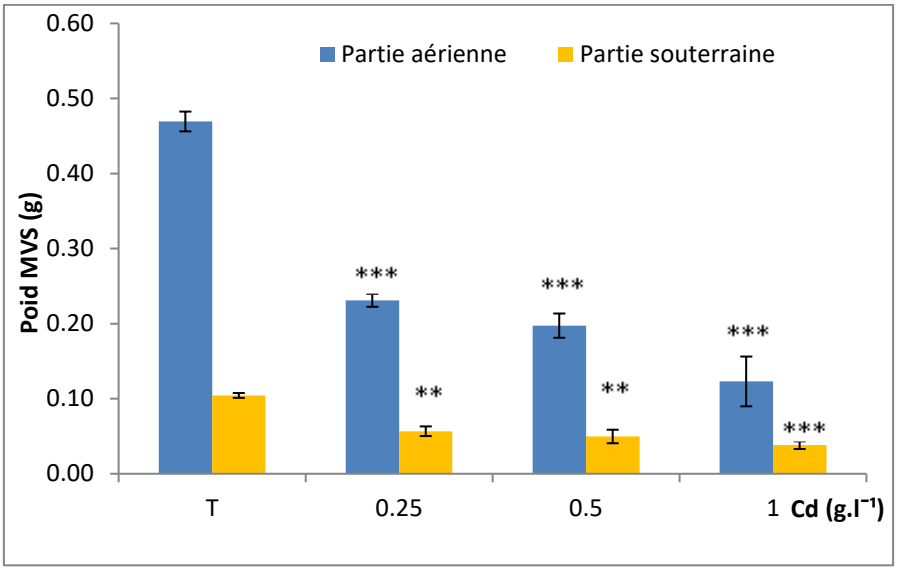


Figure III.10 : *Effet du Cd sur le poids de la matière végétale sèche de la fève (Vicia faba L). Les résultats représentent la moyenne ± SE (n = 3) (*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 selon le test de Student)*

III.2.4. L'indice de tolérance

Selon les résultats cantonnés dans le tableau III.1, les indices de tolérance des plantules de haricot commun et de la fève sont inférieurs à 1 pour les concentrations appliquées du Cd pour les deux parties des plantes, ceci confirme la nette diminution de la biomasse et suppose que les plantules de *P. vulgaris* L. et *V. faba* L. sont stressées.

Il semblerait que le Cd affecte d'une manière importante la croissance des deux plantes étudiées au niveau des parties aériennes et souterraines, particulièrement pour des concentrations élevées de Cd (1 $g.l^{-1}$).

Tableau III.1 : *Valeurs de l'indice de tolérance des plantules de haricot commun et de fève en fonction des concentrations en Cd*

	Espèces	Parties de la plante	Traitements au Cd ($g.l^{-1}$)		
			0,25	0,5	1
IT	*P. vulgaris L.*	Partie aérienne	0,65	0,34	0,22
		Partie souterraine	0,82	0,58	0,52
	V.faba L	Partie aérienne	0,48	0,42	0,25
		Partie souterraine	0,53	0,47	0,36

III.2.5. Effet sur la teneur relative en eau (TRE)

L'état hydrique des feuilles des plantules de haricot commun sous l'effet des différentes concentrations de Cd est illustré sur la (Fig.III.11).

L'allure générale de la figure montre, que la TRE diminue relativement avec l'augmentation des concentrations de Cd appliqué. Elle passe de 86% chez le témoin à 85% pour le traitement 0,25 $g.l^{-1}$ de Cd et à 84% pour 0,5 $g.l^{-1}$ de Cd, et à 82% pour 1 $g.l^{-1}$ de Cd. Toutefois l'analyse statistique montre que les effets de ces différentes concentrations ne sont pas significatifs.

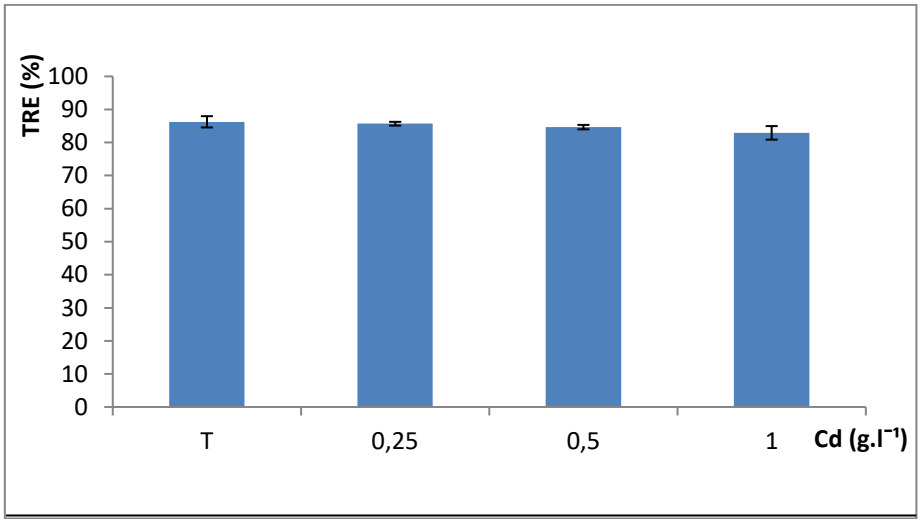


Figure III.11 : *Effet du Cd sur la teneur relative en eau de Phaseolus vulgaris L. Les résultats représentent la moyenne ± SE (n = 3) (*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 selon le test de Student)*

Le Cd n'a pas présenté un effet significatif sur la teneur relative en eau au niveau des feuilles des plantules de la fève (Fig.III.12). La teneur relative en eau varie autour de 89%. Le Cd n'a

donc pas provoqué de sécheresse physiologique chez les plantules de fève qui leur sont exposées.

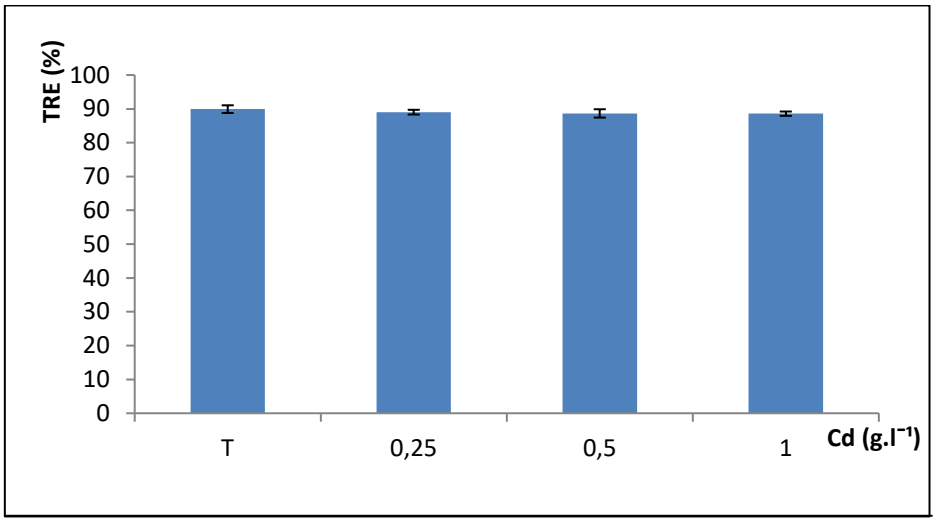


Figure III.12 : *Effet du Cd sur la teneur relative en eau de Vicia faba L. Les résultats représentent la moyenne ± SE (n = 3) (*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 selon le test de Student)*

La croissance des plantes est considérée comme l'un des meilleurs indicateurs pour évaluer la réponse des plantes au stress environnemental. Le stress au cadmium est un facteur environnemental majeur qui induit divers symptômes de phytotoxicité tels que le retard de croissance, le brunissement des racines, la chlorose, la nécrose et l'apoptose cellulaire (Chang *et al*., 2013; Zemanová *et al*., 2015; Younis *et al*., 2018a). Nos données expérimentales ont révélé que le stress lié au cadmium inhibait la croissance des plants de haricots et de fève; un comportement similaire a été rapporté par Yazdi *et al*. (2019), qui ont constaté que les semis de laitue traités avec de faibles doses de Cd (100, 200 et 300 µg.g^{-1} de perlite) avaient des effets phytotoxiques. De plus, Younis *et al*. (2018a) ont rapporté que (*Phaseolus vulgaris*) traité avec (10^{-6}, 10^{-3}M de Cd) a montré une diminution significative des paramètres de croissance. Le même résultat a été observé dans les recherches menées sur trois espèces de Miscanthus (Guo *et al*., 2016).

L'inhibition de la croissance pourrait être attribuée à l'inhibition de la photosynthèse, de la respiration, de l'absorption d'eau et de nutriments par le Cd (Dias *et al*., 2013; Xue *et al*., 2013). En effet, le stress lié au cadmium peut favoriser le stress hydrique. Des résultats similaires ont été souligné par Monteiro en 2012, le déclin le plus important de la croissance des plantes sous un stress métallique étant causé par les dommages oxydatifs (Monteiro *et al*., 2012). La production de diverses formes d'espèces réactives de l'oxygène dû à la présence de métaux lourds, entraîne des dommages aux lipides membranaires, aux protéines, aux acides

nucléiques et aux pigments ainsi qu'un retard de croissance des plantes qui pourrait éventuellement entrainer la mort de la plante (Loi *et al*., 2018). Il a été proposé que l'inhibition de la croissance des racines et des pousses en présence de métaux lourds peut être principalement due à une division cellulaire anormale ainsi qu'à l'interférence des métaux lourds avec des cofacteurs qui jouent un rôle vital dans la photosynthèse, la respiration et la synthèse des protéines dans les racines et les pousses de plantes (Volland *et al*., 2014).

Chez les plantes de haricot et de fève poussant sur le sol pollué par le Cd, nous avons observé une inhibition de la croissance ainsi qu'un brunissement de la racine primaire. Le brunissement des racines a été observé chez de nombreuses plantes exposées au Cd (Lux *et al*., 2011 ; Chang *et al*., 2013).

La toxicité du cadmium est souvent décrite par une diminution de la longueur des racines et de la masse sèche, ainsi que par une augmentation du diamètre des racines (Gratao *et al*., 2009). Lunackova *et al*. (2003) ont rapporté que les racines du saule (*Salix alba*) et du peuplier (*Populus euramericana* cv. Robusta) sont devenues plus courtes et plus épaisses après un traitement avec 10 mol L^{-1} Cd $(NO3)_2$. Il a été démontré que l'inhibition de l'élongation des racines est l'un des symptômes les plus précoces et distincts de la toxicité du Cd (Lux *et al*., 2011). Selon Seth *et al*. (2008) l'inhibition de l'élongation des racines induite par le cadmium pourrait être attribuée à la dépolymérisation des microtubules du cytosquelette cellulaire et à la formation d'aberrations chromosomiques, qui entraînent une baisse des activités mitotiques des cellules méristématiques. En outre, Boot et Mensink (1990) et Lima *et al*. (2006) ont constaté que l'allongement des racines, excepté la biomasse, était plus affecté par le Cd dans les graminées vivaces et le pois (*Pisum sativum* L.). Étant donné que la capacité d'absorption des racines est liée à leur longueur totale et spécifique (Guerrero-Campo *et al*., 2006), les diminutions de la longueur des racines, de leur superficie, de leur longueur spécifique, du nombre de pointes et l'augmentation de leur diamètre suggèrent une diminution de la capacité de l'acquisition de ressources (eau, nutriments, etc.) des plantes soumises à un stress au Cd. Il a également été démontré que le cadmium influence l'architecture du système racinaire de plusieurs espèces végétales (Wei *et al*., 2012). Par conséquent, les paramètres morphologiques des racines ont été proposés comme indicateur pour évaluer la toxicité du Cd (Lu *et al*., 2013).

Nos résultats ont montré une diminution du nombre de racines secondaires. Selon Agbogidi (2009), dans la plupart des cas, une réduction de la croissance des pousses est le résultat direct d'une réduction de la croissance des racines qui sont des organes importants pour l'absorption et la translocation de l'eau et des éléments minéraux.

De plus les auxines sont des phytohormones importantes impliquées dans la coordination de la croissance et de la défense des plantes. Le cadmium induit la formation d'espèces réactives de l'oxygène, qui à leur tour activent les auxine-oxydases. Les auxine-oxydases entraînent une dégradation accrue de l'auxine et sont donc susceptibles de diminuer les activités de nombreux gènes impliqués dans les processus de croissance (Elobeid *et al*., 2011).

III.3. Effet du Cd sur les paramètres biochimiques et physiologiques des plantules

III.3.1. Effet sur les pigments photosynthétiques

III.3.1.1. Teneur en chlorophylles totales

En présence de cadmium, les plantules de haricot commun ont montré une déperdition de la production de la chlorophylle totale (Fig. III.13).Cette production est sévèrement inhibée dès la première dose de Cd utilisées. Elle passe de 11,87 mg.g^{-1} chez le témoin à 10,04 ; 8,69 ; et 6,23 mg.g^{-1} de MVF des plantules traitées avec des solutions de 0.25 g.l^{-1}; 0.5 g.l^{-1} et 1 g.l^{-1} de Cd respectivement, soit un pourcentage de réduction maximale de 47,51%.

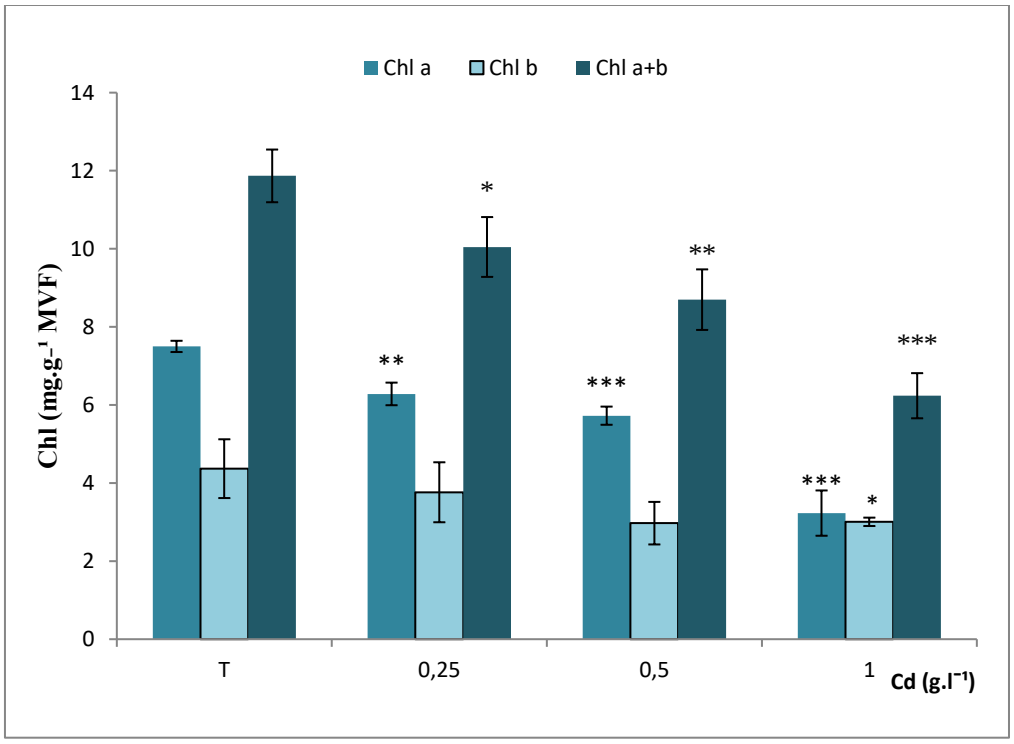


Figure III.13 *: Effet du Cd sur la teneur en chlorophylles totales de haricot commun (Phaseolus vulgaris L). Les résultats représentent la moyenne ± SE (n = 3) (*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 selon le test de Student)*

Dans les mêmes conditions, les plantules de fève présentent des comportements pratiquement similaires pour la production des chlorophylles totales ; la production des chlorophylles

totales chute de 12,43 $mg.g^{-1}$ à 5,50 $mg.g^{-1}$ de MVF après traitement par la solution de 1$g.l^{-1}$ de Cd, soit une réduction de 55,75 % (Fig. III.14).

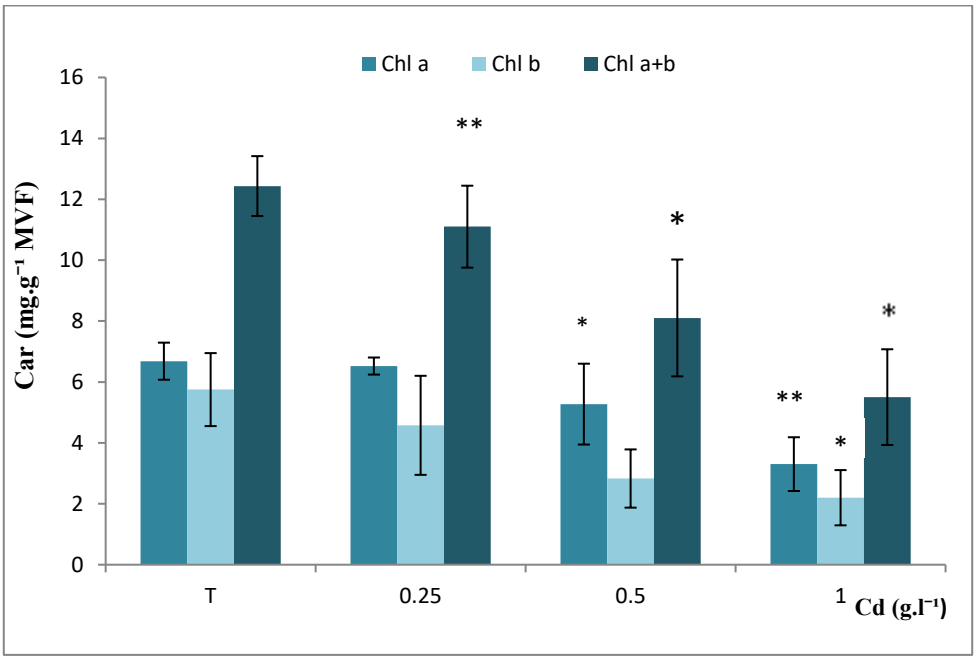


Figure III.14: *Effet du Cd sur la teneur en chlorophylles totales de la fève (Vicia faba L). Les résultats représentent la moyenne ± SE (n = 3) (*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 selon le test de Student)*

III.3.1.2. Teneur en caroténoïdes

La teneur en Car diminue globalement au fur et à mesure que la concentration de cadmium augmente dans le milieu chez les plantules de haricot commun (Fig. III.15).

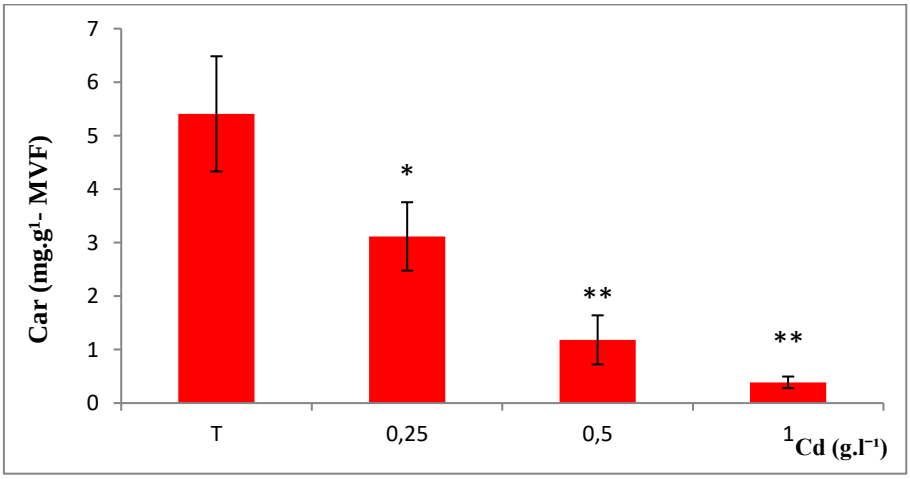


Figure III.15:*Effet du Cd sur la teneur en caroténoïdes de haricot commun (Phaseolus vulgaris L). Les résultats représentent la moyenne ± SE (n = 3) (*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 selon le test de Student)*

En effet, la teneur en Car des plantules témoins est de 0,54 mg.g^{-1} de MVF contre 0,31 pour les plantules cultivées sur sol pollué avec 0,25 g.l^{-1} de Cd ; cette teneur atteint 0,11 et ; 0,038 pour des concentrations de 0.5 g.l^{-1}et 1 g.l^{-1} de Cd respectivement. Notons que pour la concentration de 1 g.l^{-1} de Cd nous assistons à une réduction très significative (P<0,001***) de la teneur en Car située à 92%.

La présence de Cd dans le milieu de culture des plantules de fève induit une diminution significative de la production des caroténoïdes avec les trois concentrations de Cd (Fig.III.16) ; nous notons une diminution de 58 % pour les concentrations de 0.25 g.l^{-1}; 0.5 g.l^{-1} de Cd et 72 % pour la concentration de 1 g.l^{-1} de Cd.

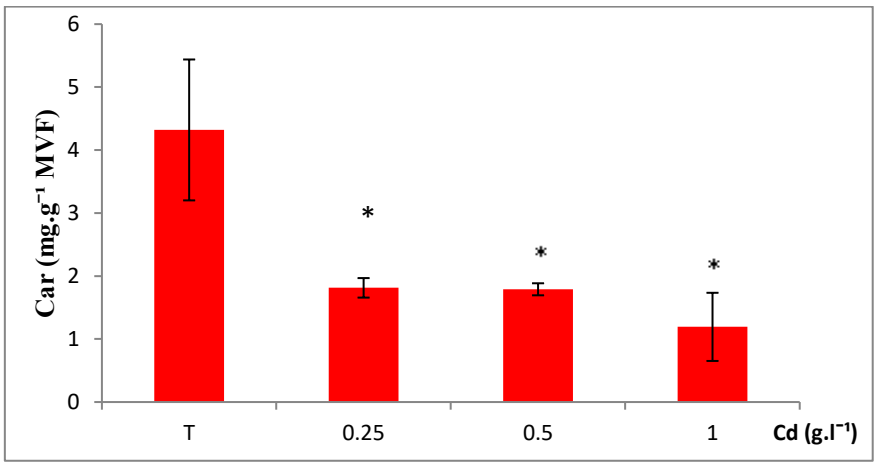


Figure III.16: *Effet du Cd sur la teneur en caroténoïdes de la fève (Vicia faba L). Les résultats représentent la moyenne ± SE (n = 3) (*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 selon le test de Student)*

III.3.2. Effet sur la teneur en sucres solubles des feuilles

Les plantes sont des organismes photosynthétiques qui produisent les sucres. Cependant, les sucres ne sont pas seulement des ressources métaboliques et des composés structuraux, ils jouent de nombreux rôles notamment de signalisation et de protection.

La figure III.17 montre que la teneur en sucres solubles des feuilles des plantules de haricot en présence de Cd (0,25 g.l^{-1}) ne présente pas de changement significatif (p> 0,05). En revanche, l'application d'un traitement au Cd de 0,5 g.l^{-1} et/ou 1 g.l^{-1} entraine une augmentation significative d'environ 19 % des teneurs en sucres solubles (p<0,05).

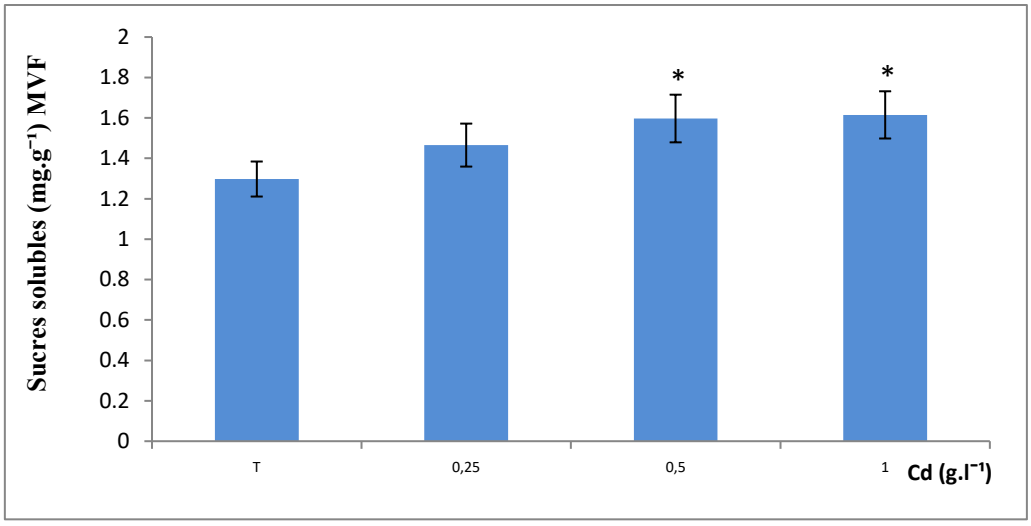


Figure III.17 : *Effet du Cd sur la teneur en sucres solubles de Phaseolus vulgaris L. Les résultats représentent la moyenne ± SE (n = 3) (*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 selon le test de Student)*

Contrairement au haricot, l'application de Cd aux plantules de fève provoque une diminution significative de la teneur en sucres solubles dans les feuilles (Fig. III.18). Le pourcentage de réduction est de 40,69% pour 0,5 g.l⁻¹ de Cd, et de 65,69 % pour 1 g.l⁻¹.

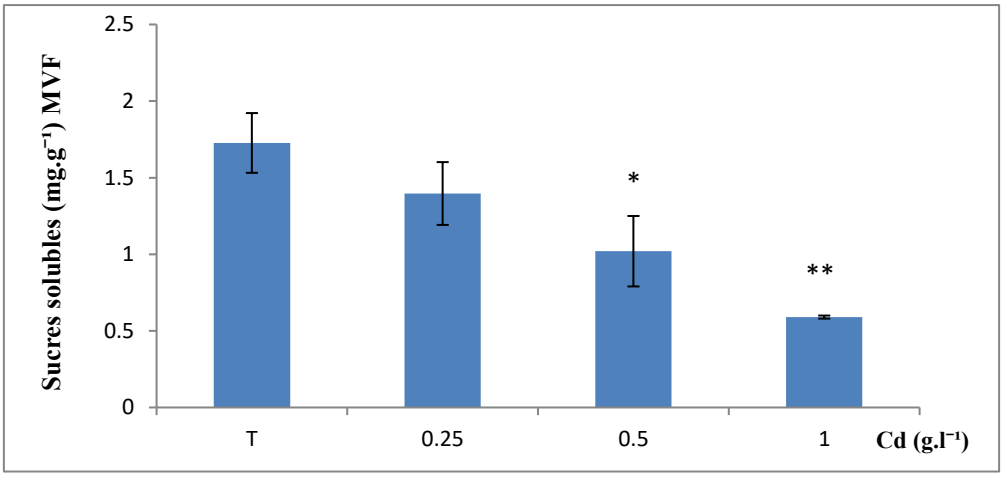


Figure.III.18 : *Effet du Cd sur la teneur en sucres solubles de la fève (Vicia faba L.). Les résultats représentent la moyenne ± SE (n = 3) (*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 selon le test de Student).*

III.3.3. Effet sur la teneur en protéine

Les résultats relatifs au teneur en protéines foliaires des plantules de haricot commun après traitement au Cd ont permis de montrer que la concentration qui entraine un effet significatif est égale à 1 g.l⁻¹ ($p<0,01$). Cette même concentration a fait passer la teneur en protéines de 5,25 mg.g⁻¹ à 0,80 mg.g⁻¹ MVF soit une chute de l'ordre de 84.67%.

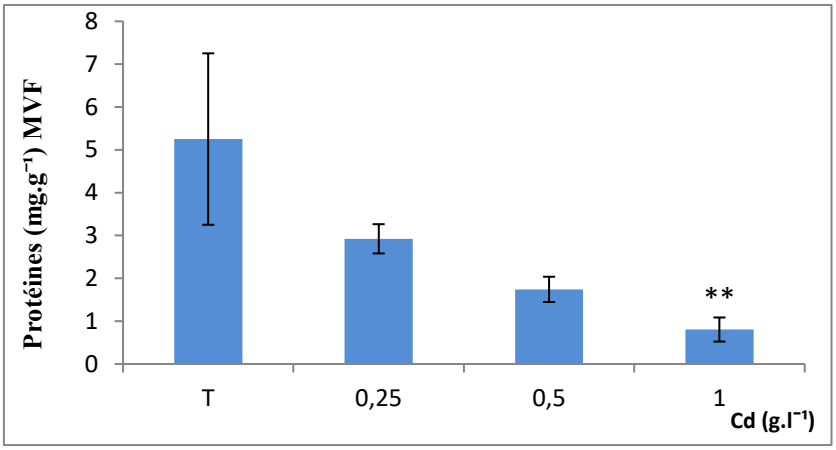


Figure.III.19 : *Effet du Cd sur la teneur en protéines de haricot commun (Phaseolus vulgaris L). Les résultats représentent la moyenne ± SE (n = 3) (*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 selon le test de Student)*

La figure III.20, montre que la teneur en protéines dans les feuilles des plantules témoins de la fève est de 1 mg.g⁻¹ MVF. Sous l'effet de Cd (0,5 et 1 g.l⁻¹), les teneurs diminuent d'une manière hautement significative (P<0,01) pour atteindre les 0,55 et 0,35 mg.g⁻¹ MVF, soit une réduction de 44,4 %, et 64,2 % respectivement.

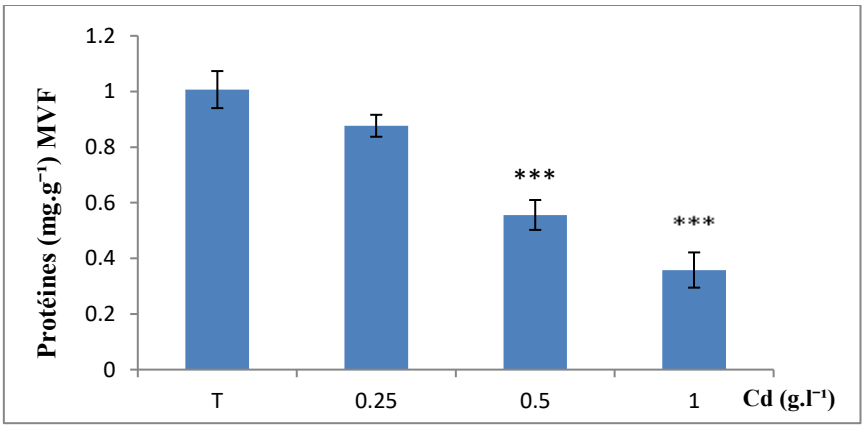


Figure III.20 : *Effet du Cd sur la teneur en protéines de la fève (Vicia faba L). Les résultats représentent la moyenne ± SE (n = 3) (*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 selon le test de Student).*

III .3. 4. Effet sur la teneur en proline libre

La proline est connue pour être synthétisée en réponse à de nombreux stress ; c'est pourquoi une attention particulière a été portée à cet acide aminé. L'exposition au Cd (1 g.l⁻¹) induit une accumulation hautement significative de la proline dans les feuilles des plantules de haricot commun dont la teneur est multipliée par un facteur de 2,75 par rapport au témoin (Fig. III.21). La teneur en proline passe de 0,66 mg.g⁻¹ à 1,82 mg.g⁻¹ MVS.

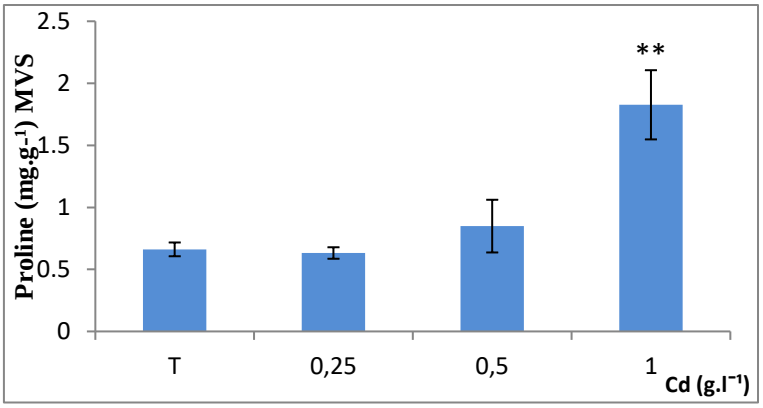


Figure III.21 : *Effet du Cd sur la teneur en proline de haricot commun (Phaseolus vulgaris L). Les résultats représentent la moyenne ± SE (n = 3) (*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 selon le test de Student)*

Des résultats similaires sont obtenus avec la plante de la fève ; la teneur en proline est multipliée par un facteur de 5,14 par rapport au témoin (Fig. III.22) après addition de 1 $g.l^{-1}$ de Cd. Une augmentation significative a été également relevée pour la concentration de 0,5 $g.l^{-1}$, soit un pourcentage de 68 %.

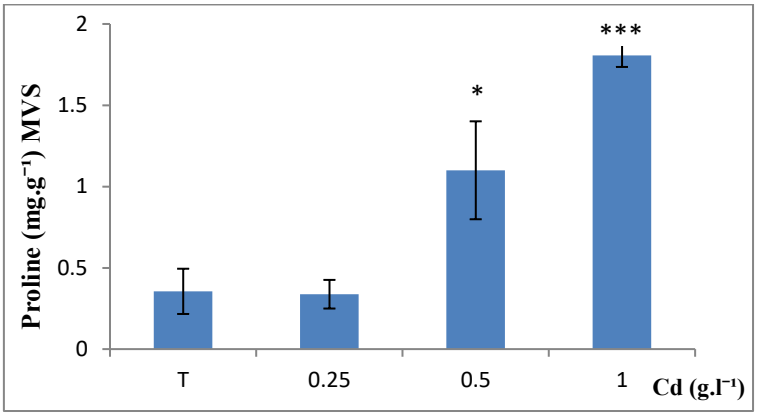


Figure III.22: *Effet du Cd sur la teneur en proline de la fève (Vicia faba L). Les résultats représentent la moyenne ± SE (n = 3) (*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 selon le test de Student)*

Les résultats obtenus montrent que les traitements au cadmium entraînent une diminution de la pigmentation des plantules de haricot commun et de la fève. Des études antérieures ont fait le même constat, en effet, Molnarova *et al*. (2012) ont trouvé que le Cd induit une diminution des teneurs en pigments sur les plantules de *Sinapis alba*. ;Younis *et al*. (2018a), sur *P. vulgaris* L. ;Yazdi *et al*. (2019), sur *Lactuca sativa* Linn. ; Chen *et al*. (2019), sur *Kandelia obovata*.

Selon Siedlecka et Krupa, 1996 le cadmium présente un effet négatif sur la concentration de chlorophylle dans les cyanobactéries, les chlorophytes unicellulaires (Chlorella), les

gymnospermes, tels que *Picea abies* et les angiospermes, comme *Zea mays, Quercus palustris* et *Acer rubrum*.

La diminution de la teneur en chlorophylle est attribuée à l'inhibition de sa synthèse soit en affectant la synthèse d'enzymes clés telles que l'acide d-aminolévulinique déshydratase (ALA-déshydratase) et la proto-chlorophyllide réductase (Stobart *et al*., 1985; Van Assche et Clijsters, 1990), ou indirectement par induction d'une carence en Fe en inhibant la Fe (III) réductase et en affectant gravement la photosynthèse (Alkantara *et al*., 1994; Lang *et al*., 1995; He *et al*., 2017). Le Cd est également connu pour augmenter la dégradation enzymatique de la chlorophylle (Somashekaraiah *et al*., 1992). Une diminution de l'apport de Fe^{2+}, Zn^{2+} et Mg^{2+} contribue également à réduire la teneur en chlorophylle (Van Assche et Clijsters, 1990; Kupper *et al*., 1996).

La teneur en chlorophylle et l'intensité photosynthétique sont considérées comme des indicateurs sensibles de l'état de croissance des plantes soumises à un stress au Cd (Chen *et al*., 2008). Des études ont montré que le Cd est un inhibiteur efficace de la photosynthèse. Le cadmium, en effet, inhibe fortement la synthèse des chlorophylles et leur liaison stable aux protéines, endommageant ainsi l'appareil photosynthétique, en particulier la diminution du complexe de captage de lumière II et des photosystèmes I (PSI) et II (PSII) (Kupper *et al*., 2007), inhibant certaines des enzymes du cycle de Calvin (Van Assche et Clijsters, 1990)

Baryla *et al*. (2001) et Chen *et al*. (2008) ont montré que le Cd interférait avec la réplication des chloroplastes. La dégradation des chlorophylles ou l'inhibition de leur biosynthèse a été proposée comme étant responsable de la réduction de la croissance par le stress au Cd (Wan *et al*., 2012).

Les sucres sont des métabolites importants dans le métabolisme des plantes, non seulement parce qu'ils sont les premiers composés organiques complexes formés dans la plante par photosynthèse, mais ils sont également considérés comme la principale source d'énergie respiratoire. Les sucres sont impliqués dans de nombreux mécanismes de réponse au stress biotique ou abiotique, leur action dans le stress abiotique est très large, ils peuvent agir comme osmo-protecteurs en stabilisant les membranes cellulaires et en maintenant la turgescence (Peshev et Ende, 2013) ou comme molécules antioxydantes (Keunen *et al*., 2013).

Nos résultats indiquent que le traitement au Cd conduit à une augmentation de la teneur totale en sucres solubles dans le haricot commun. Elles rejoignent ceux rapportés par Li *et al*. (2013) sur les plants de blé et Vezza *et al*. (2018) sur des plants de soja soumis à un stress au Zn et As, respectivement. En effet, le cadmium induit une perturbation du métabolisme des glucides

en modulant leurs activités enzymatiques ou, réduit leur translocation de la source (feuilles) vers les racines et provoque ainsi une accumulation de sucres. La diminution de l'utilisation des glucides pour la croissance peut également être une cause de leur accumulation chez les plantes stressées (Devi *et al*., 2007; Mishra et Dubey, 2013). De plus de nombreuses études semblent mettre en évidence l'action des sucres en tant que molécules antioxydantes (Keunen *et al*., 2013).

Contrairement au haricot, une réduction de la teneur en sucre a été observée chez la fève sous l'effet de Cd, plusieurs auteurs ont rapporté que la teneur en sucres a également tendance à diminuer dans les pousses de plantes exposées au Cd, Bhardwaj *et al*. (2009) a trouvé une réduction de 18.29% de sucres totaux sous l'effet de 3 $g.kg^{-1}$ de Cd. Younis *et al*. (2018a) ont trouvé une réduction du taux de fructose, sucrose, polysaccharide des saccharides totaux sous l'effet de 10^{-3} M Cd et de 10^{-6} M Cd chez le haricot commun.

Ceci pourrait être dû à des changements dans la production des photoassimilats. Vezza *et al*. (2018) rapporte que la fermeture des stomates induite par l'As peut affecter négativement la diffusion du CO_2. De plus, une diminution de la teneur en pigments photosynthétiques et des dommages de la structure du chloroplaste ont été observés sous traitement à l'As (Armendariz *et al*., 2016). Ces événements ont réduit le taux de photosynthèse et, par conséquent, la production de photoassimilats et donc des sucres solubles, comme l'ont a observé d'autres auteurs (Stoeva *et al*., 2005; Vernay *et al*., 2007).

La teneur en protéines est inversement proportionnelle aux concentrations de Cd, elle diminue avec l'augmentation du Cd. Cela peut être dû à une hydrolyse accrue des protéines, soit par une activité protéase accrue (Palma *et al*., 2002; Melnichuk *et al*., 1982), soit par la dénaturation des protéines due aux effets toxiques des espèces réactives de l'oxygène. En fait, l'ion dénaturant des protéines fonctionnelles et structurales est connu comme résultat de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans des cellules dans des conditions de stress (Davies *et al*., 1987; Bowler *et al*., 1992). De surcroit, la diminution de la teneur en protéines peut également être attribuée au ralentissement de leur biosynthèse à cause de la diminution de l'activité de la nitrate réductase (Fresneau *et al*., 2007). Des études antérieures ont montré que la dégradation des protéines pouvait contribuer à l'accumulation de proline induite par Ni-or Cu dans les feuilles de riz détachées (Lin et Kao, 2007). Nos résultats confortent cette conclusion car la diminution de la teneur en protéines est significative dans les feuilles de haricot commun et de fève traitées au Cd et les teneurs en proline augmentent significativement.

Des effets similaires ont été enregistrés chez nombreuses espèces végétales soumises à un stress au Cd (Tamas *et al*., 1997 ; John *et al*., 2008; Aslam *et al*., 2014) ou chez *Phaseolus vulgaris* L. (Bhardwaj *et al*., 2009; Younis *et al*., 2018a).

La proline a toujours été considérée comme un biomarqueur de la sécheresse ou du stress salin. En effet, plusieurs études ont associé son accumulation au stress métallique (Alia et Pardha, 1991 ;Choudhary *et al*., 2007 ;Vezza *et al*., 2018; Younis *et al*., 2018a). La proline favorise l'activité photosynthétique, le statut hydrique, les activités des enzymes antioxydantes (Zouari *et al*., 2016) et assure l'ajustement osmotique au niveau cellulaire (Kasai *et al*., 1998) de l'autre côté l'action protectrice de la proline est liée à sa capacité à détoxifier les ROS (Tripathi et Gaur, 2004) et à inhiber la peroxydation des lipides (Mehta et Gaur, 1999).

Selon Strizhov *et al*., (1997) l'accumulation de la proline est une expression à différents types de stress, elle est corrélée à la stimulation de l'OAT et l'activation transcriptionnelle du gène codant pour cette enzyme (Strizhov*et al*., 1997). Cependant, une enquête antérieure suggère que la voie du glutamate, plutôt que la voie de l'ornithine, joue un rôle vital dans l'accumulation de proline dans les plantes lorsqu'elles sont exposées aux stress environnementaux. Par contre, l'accumulation de la proline est dépendante de sa dégradation catalysée par l'enzyme mitochondriale PDH dans les cellules végétales (Li *et al*., 2013). Chen *et al*. (2001) ont démontré que l'activité de l'OAT, mais pas celle de la PDH, était associée à une augmentation de la teneur en proline dans les plantules de riz traités au Cu. De plus, chez *Nicotiana benthamiana*, un excès de cuivre a augmenté l'expression de deux gènes de synthèse de la proline, la pyrroline-5 carboxylate synthétase (P5CS) et l'OAT, mais a supprimé le gène du catabolisme de la proline, PDH (Ku *et al*., 2012) (Annexe VI, Fig 1) . Selon Alia et Pardha (1991), l'augmentation du taux de proline pourrait être soit due à sa synthèse fraîche et / ou due à une diminution de son utilisation dans les plantes stressées. Li *et al*. (2013) ont rapporté que l'accumulation de proline est due à la voie de l'ornithine impliquant dans la stimulation de l'OAT (ornithine d-aminotransférase) une enzyme de biosynthèse de la proline; d'autre part, une diminution des activités GK (glutamate kinase) et PDH (proline déshydrogénase) impliquées dans le catabolisme de la proline (Annexe VI).

Des études antérieures ont démontré que la dégradation des protéines pouvait contribuer à l'accumulation de la proline induite par le Ni ou le Cu dans les feuilles de riz détachées (Chen *et al*., 2001 ; Lin et Kao, 2007). Nos résultats sont en accord avec cette conclusion car la diminution de la teneur en protéines est significative tant chez l'haricot commun que la fève.

III.4. Effet du Cd sur la teneur en composés phénoliques

L'application du Cd sur le milieu de culture des plantules de haricot et de la fève conduit à de grandes modifications dans les teneurs en composés phénoliques.

III.4.1. Effet du Cd sur la teneur en polyphénols totaux

La présence du Cd à différentes concentrations dans le milieu de culture des plantules de haricot commun induit une augmentation de la synthèse des polyphénols totaux tant dans la partie aérienne que dans la partie souterraine (Fig. III.23). Dans la partie aérienne l'augmentation est hautement significative dès la première concentration de Cd utilisée : la teneur en polyphénols totaux passe de 0,03 à 0,12 mg eq GAE. g^{-1} MVS pour 1 $g.l^{-1}$ de Cd soit 43% d'augmentation.

Dans la partie souterraine, l'augmentation est significative pour l'ensemble des concentrations de Cd ($p<0,05$), avec un taux d'augmentation avoisinant les 32 %.

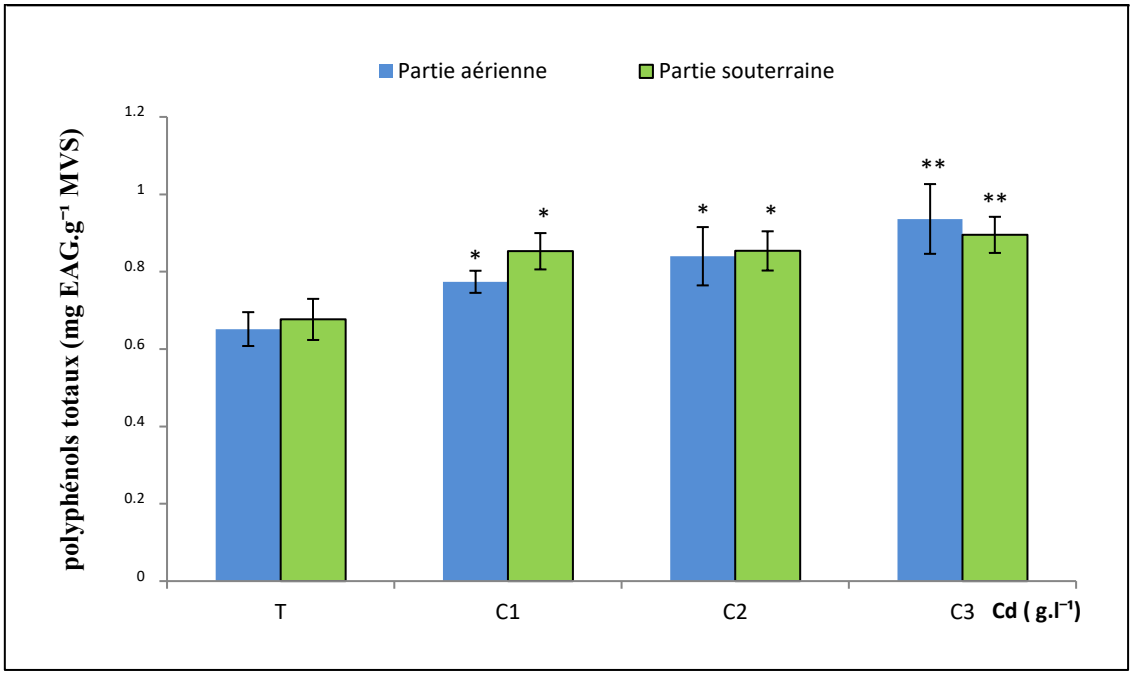


Figure III.23 : *Effet du Cd sur la teneur en polyphénols totaux de haricot commun (Phaseolus vulgaris L). Les résultats représentent la moyenne ± SE (n = 3) (*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 selon le test de Student)*

Dans le système aérien des plantules de la fève, une augmentation significative ($p < 0.05$) de la teneur en polyphénols est enregistrée à partir de 0,5 $g.l^{-1}$ de Cd : ainsi la teneur en polyphénols des plantules traitées est d'environ 1,2 mg eq GAE $.g^{-1}$ MVS, soit une augmentation de 43 % par rapport au témoin.

A l'instar de la partie aérienne, la partie souterraine présente une augmentation hautement significative ($p < 0,01$) ; elle est visible à partir de la première concentration de Cd. Le pourcentage d'augmentation est d'environ 39 % (Fig. III.24).

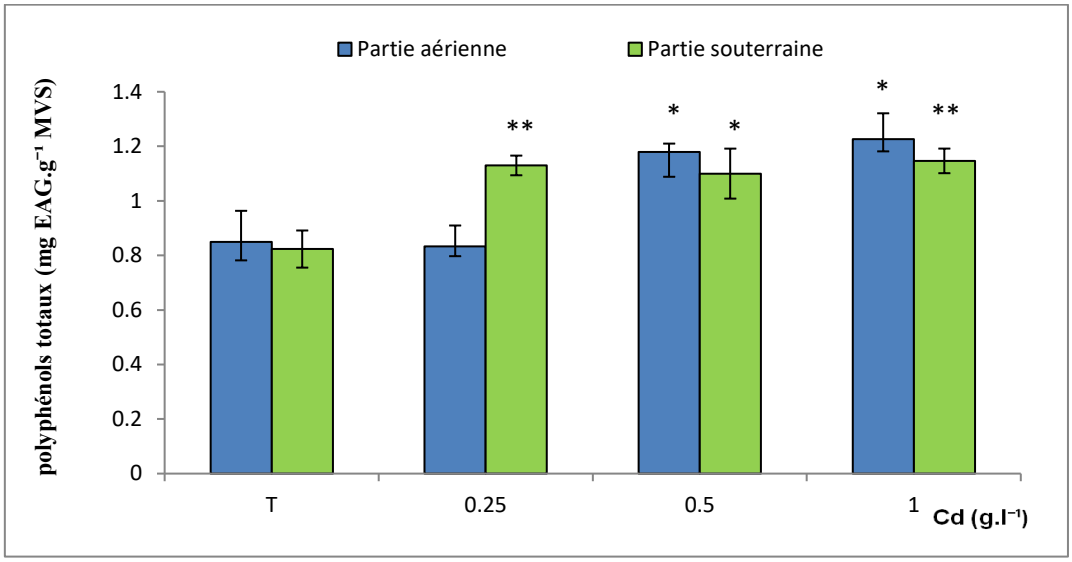


Figure III.24 : *Effet du Cd sur la teneur en polyphénols totaux de la fève (Vicia faba L). Les résultats représentent la moyenne ± SE (n = 3) (*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 selon le test de Student)*

III.4.2. Effet du Cd sur la teneur en flavonoïdes

La lecture de la (Fig.III.25) montrent que les teneurs en flavonoïdes augmentent de façon significative à partir de 0,5 $g.l^{-1}$ de Cd chez les plantules de haricot commun dans la partie aérienne ($p<0,05$): elle passe de 0,59 à 0,96 mg eq Q $.g^{-1}$ MVS pour le lot traité avec 1 $g.l^{-1}$ de Cd soit 63 % d'augmentation. Dans la partie souterraine, l'augmentation est hautement significative pour le lot traité avec 1 $g.l^{-1}$ de Cd soit 34 %. Notons que la teneur en flavonoïdes est plus importante dans la partie aérienne que dans la partie souterraine.

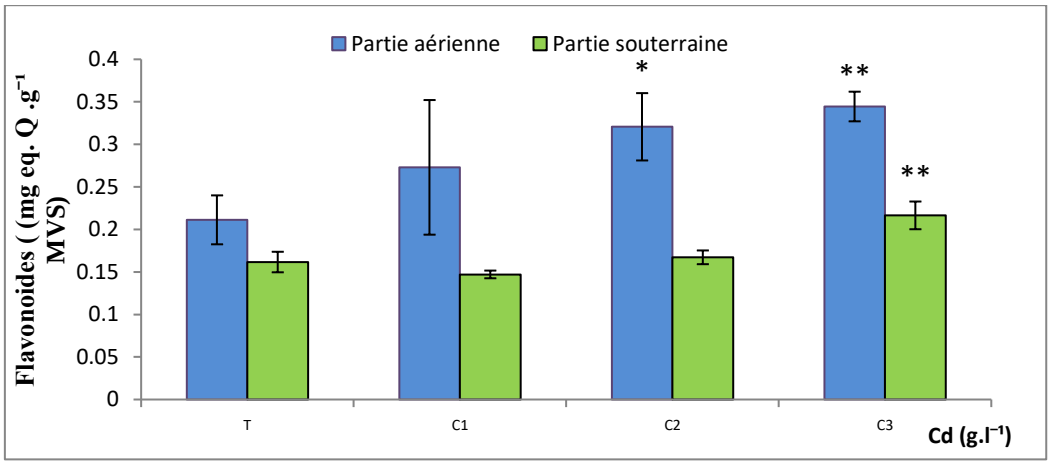


Figure III.25 : *Effet du Cd sur la teneur en flavonoïdes de haricot commun (Phaseolus vulgaris L). Les résultats représentent la moyenne ± SE (n = 3) (*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 selon le test de Student)*

Les teneurs en flavonoïdes des plantules de la fève sont représentés sur la figure III.26, Chez les plantules témoins, la teneur en flavonoïdes est de 0,047 mg eq Q .g^{-1} MVS au niveau de la partie aérienne. Sous l'effet du polluant, cette activité atteint 0,1 mg eq Q .g^{-1} MVS soit une augmentation significative de 39,44 %. Au niveau des racines, la teneur en flavonoïdes chez le témoin est de 0,063 mg eq Q .g^{-1} MVS, elle atteint son maximum de 0,1 mg eq Q .g^{-1} MVS avec 1 g.l^{-1} de Cd, ce qui correspond à une augmentation de 58 % comparativement aux plantules témoins.

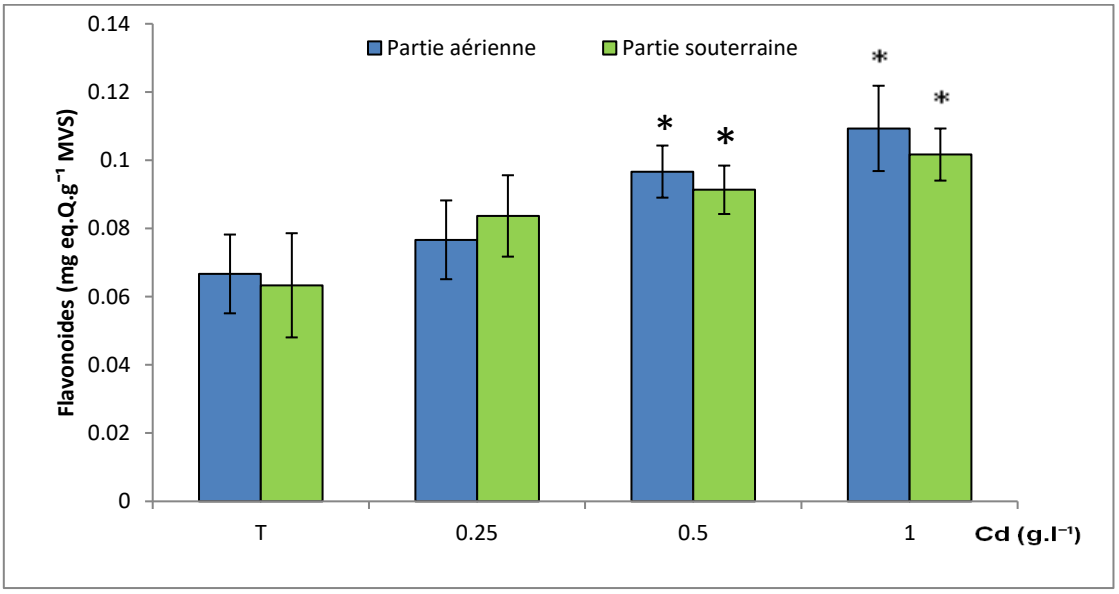


Figure III.26 : *Effet du Cd sur la teneur en flavonoïdes de la fève (Vicia faba L). Les résultats représentent la moyenne ± SE (n = 3) (*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 selon le test de Student)*

III.4.3. Effet du Cd sur la teneur en flavonols

L'expérimentation menée sur les flavonols a montré une augmentation de leur teneur au niveau des plantules de haricot commun cultivées sur sol pollué par le Cd aussi bien au dans la partie aérienne que dans la partie racinaire. Une augmentation hautement significative de la teneur en flavonols est enregistrée pour la partie aérienne, cette teneur passe de 0,13 mg eq. Q.g^{-1} MVS chez les témoins à 0,22 mg eq. Q.g^{-1} MVS pour les plantules cultivées en sol pollué par 1 g.l^{-1} de Cd, soit une augmentation de 58 %. Pour la partie racinaire, la teneur en flavonols chez les plantules témoins passe de 0,046 mg eq. Q.g^{-1} MVS à 0,067 mg eq. Q.g^{-1} MVS chez les plantules cultivées en sol pollué par 1 g.l^{-1} de Cd ; soit une augmentation de 65 % (Fig. III.27).

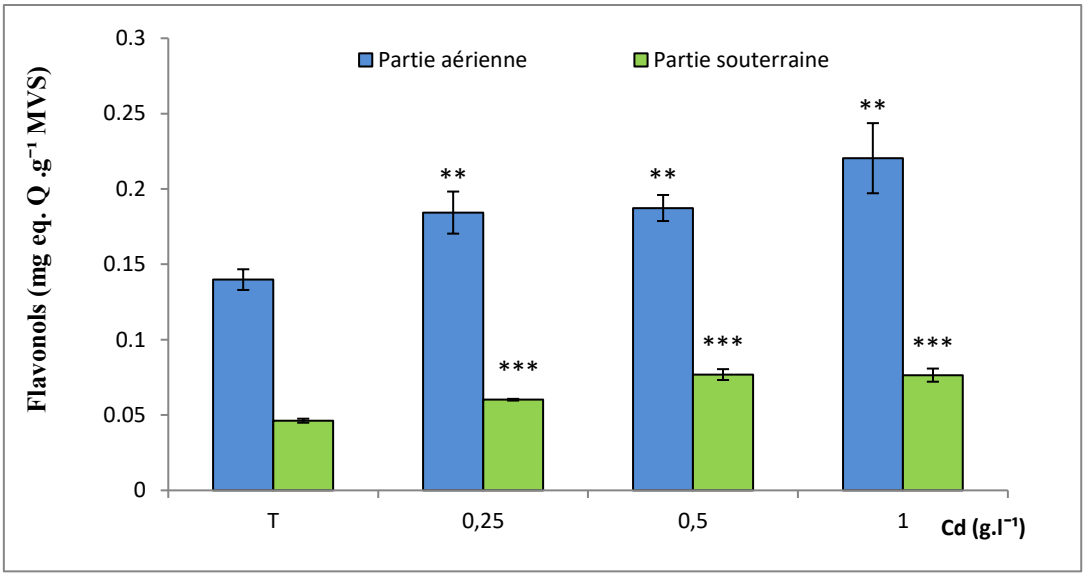


Figure III.27 : *Effet du Cd sur la teneur en flavonols de haricot commun (Phaseolus vulgaris L). Les résultats représentent la moyenne ± SE (n = 3) (*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 selon le test de Student)*

L'application de Cd aux plantules de fève ne produit, par rapport au témoin, aucun changement de production de flavonols. De fait, malgré de légères fluctuations au cours de la culture, le test de Student n'a montré aucune différence significative. La production de flavonols peut donc être considérée constante, elle oscille entre 0,047 mg eq. $Q.g^{-1}$ MVS et 0,048 mg eq. $Q.g^{-1}$ MVS pour la partie aérienne, et 0,037 mg eq. $Q.g^{-1}$ MVS et 0,038 mg eq. $Q.g^{-1}$ MVS pour la partie souterraine.

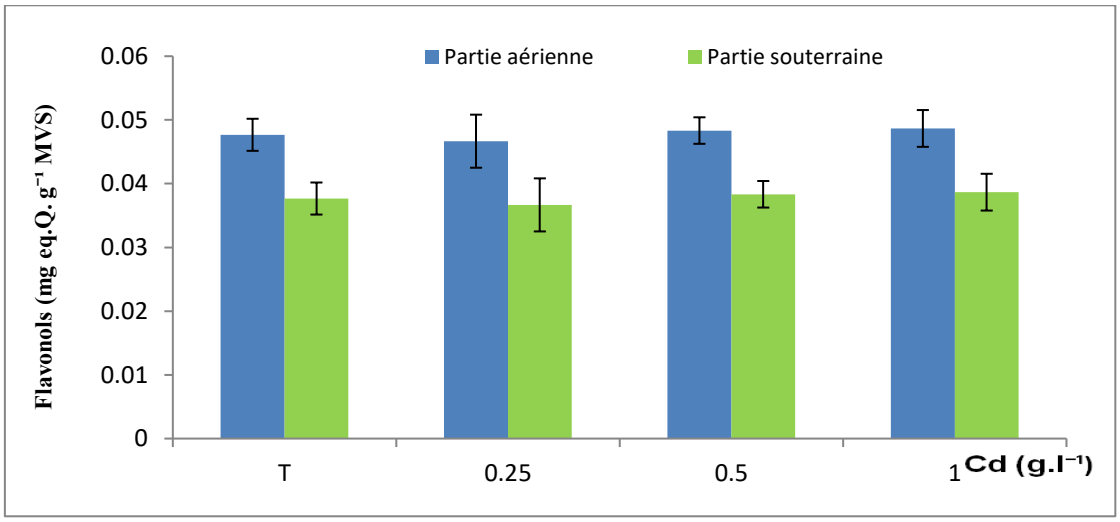


Figure III.28 : *Effet du Cd sur la teneur en flavonols de la fève (Vicia faba L). Les résultats représentent la moyenne ± SE (n = 3) (*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 selon le test de Student)*

III.4.4. Effet du Cd sur la teneur en tanins hydrolysables

L'application de Cd aux plantules de haricot commun engendre globalement une augmentation de la production des tanins hydrolysables sur les deux parties étudiées des plantules, mais statistiquement non vérifiée (Fig.III.29). Elle varie entre 2,55 mg eq.TA.g^{-1} et 5,26 mg eq.TA.g^{-1} pour la partie aérienne et 3,34 mg eq.TA.g^{-1} et 4,41 mg eq.TA.g^{-1} pour la partie souterraine.

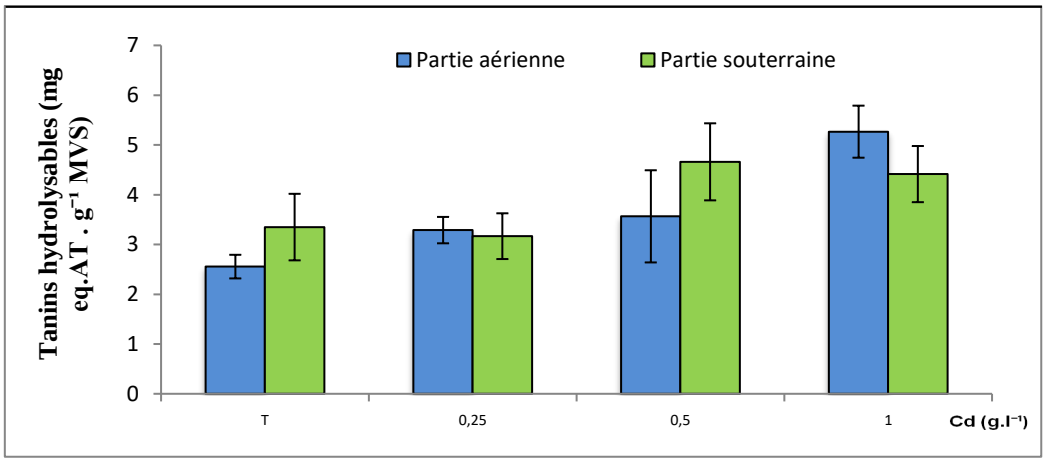


Figure III.29 : *Effet du Cd sur la teneur en tanins hydrolysables de haricot commun (Phaseolus vulgaris L). Les résultats représentent la moyenne ± SE (n = 3) (*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 selon le test de Student)*

L'application de Cd à différentes concentrations aux plantules de fève affecte peu la production des tanins hydrolysables, qui se situe à 0,091 mg eq.TA.g^{-1} pour le témoin et 0,13 mg eq.TA.g^{-1} pour la concentration de 1 g.l^{-1} de Cd pour la partie aérienne, et 0,1 mg eq.TA.g^{-1} pour le témoin et 0,12 mg eq.TA.g^{-1} pour la concentration de 1 g.l^{-1} de Cd pour la partie souterraine (Fig III.30).

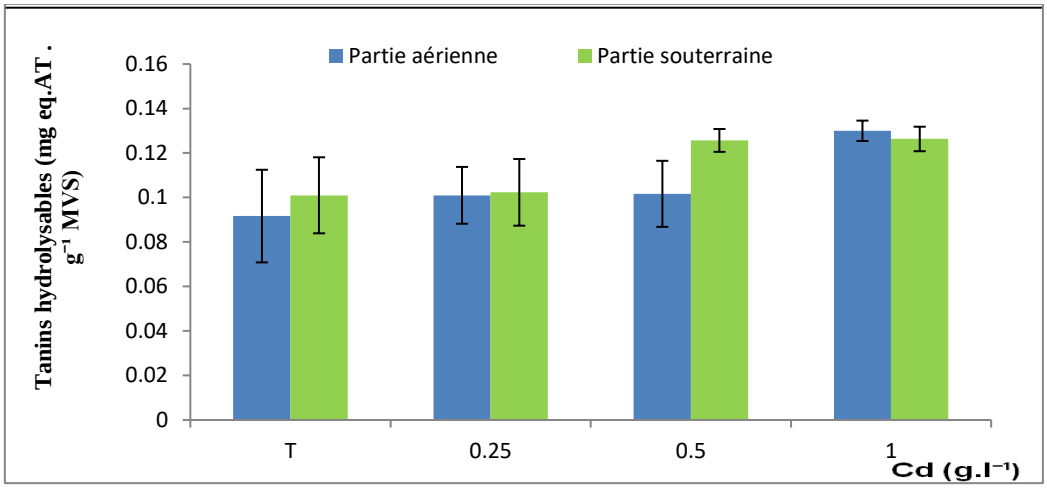


Figure III.30 : *Effet du Cd sur la teneur en tanins hydrolysables de la fève (Vicia faba L). Les résultats représentent la moyenne ± SE (n = 3) (*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 selon le test de Student)*

III.4.5. Effet du Cd sur la teneur en tanins condensés

La présence du Cd dans le milieu provoque, dès la concentration de 0,25 g.l^{-1}, une augmentation hautement significative de la teneur en tanins condensés dans la partie aérienne des plantules de haricot commun, qui s'accentue avec l'augmentation de la concentration en Cd (Fig.III.31). Celle-ci passe de 0,038 mg eq. CA.g^{-1} chez lz témoin à 0,129 mg eq. CA.g^{-1} chez le traité avec 1 g.l^{-1} de Cd.

Dans la partie souterraine, la présence de Cd entraine une augmentation significative à partir de 0,5 g.l^{-1} de Cd, elle varie entre 0,1 mg eq. CA.g^{-1} et 0,127 mg eq. CA.g^{-1}.

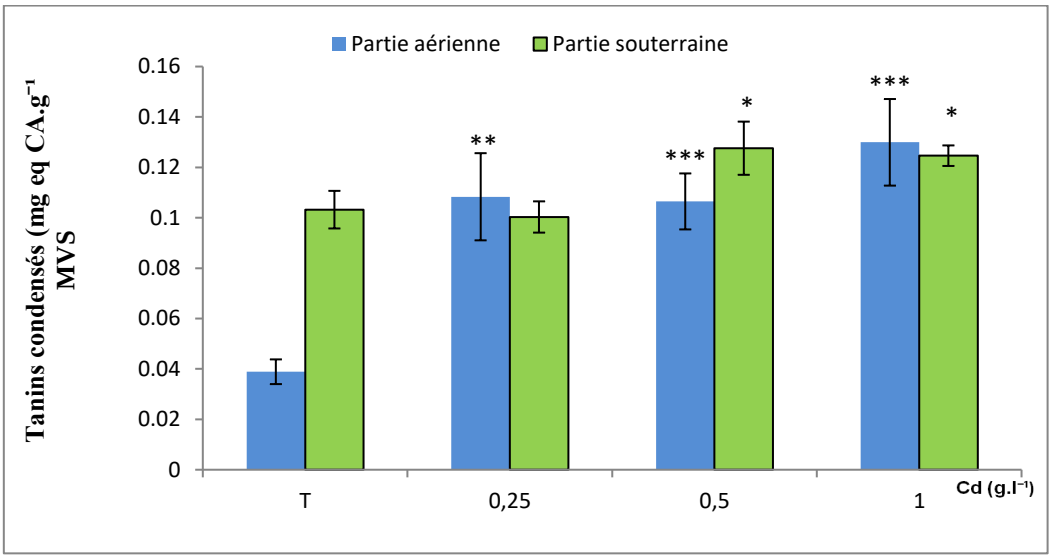


Figure III.31 : *Effet du Cd sur la teneur en tanins condensés de haricot commun (Phaseolus vulgaris L). Les résultats représentent la moyenne ± SE (n = 3) (*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 selon le test de Student)*

Au niveau des racines de la fève, les évaluations des teneurs en tanins condensés en réponse à l'augmentation de la concentration de cadmium dans le milieu de culture s'avèrent similaires pour les autres paramètres, à savoir une augmentation de leurs teneurs. A la concentration de 1 g.l^{-1} l'augmentation est hautement significative avec un pourcentage de 100 %. Cependant au niveau aérien, l'augmentation de la concentration en Cd ne produit pas d'effet significatif sur la teneur en tanins condensés par rapport au témoin, qui varie au tour de 0,06 mg eq. CA.g^{-1}.

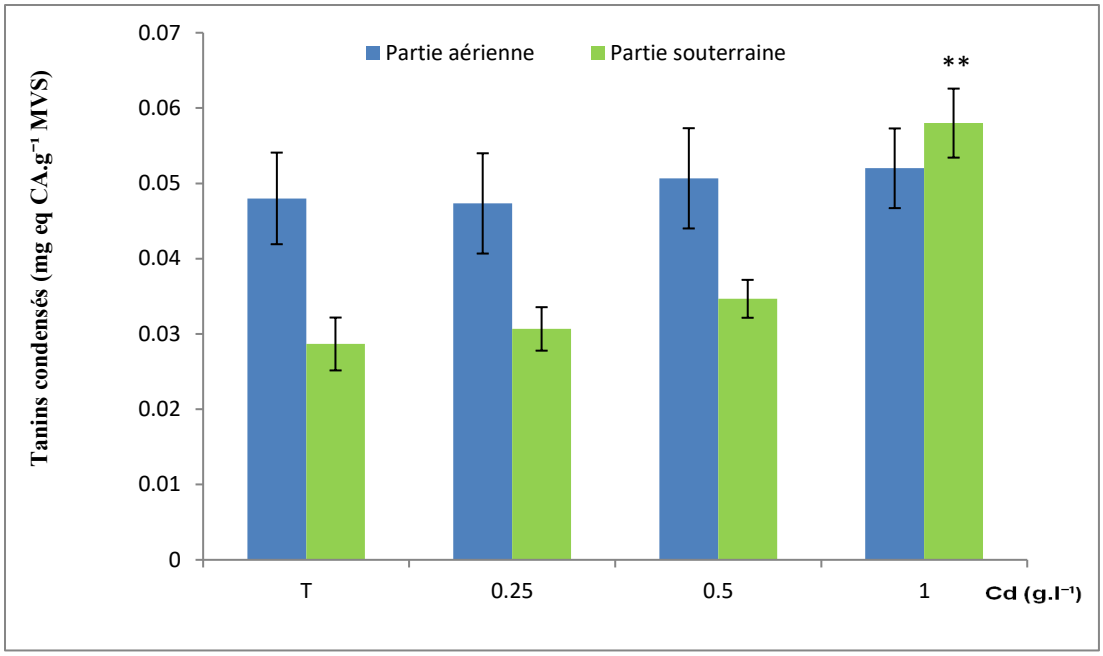


Figure III.32: *Effet du Cd sur la teneur en tanins condensés de la fève (Vicia faba L). Les résultats représentent la moyenne ± SE (n = 3) (*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 selon le test de Student)*

Le stress oxydatif est un mécanisme important de la toxicité du cadmium (Smeets *et al*., 2005). Les plantes utilisent un système de défense antioxydant complexe pour prévenir les dommages oxydatifs et maintenir les concentrations des espèces réactives de l'oxygène dans un intervalle fonctionnel étroit (Ozgur *et al*., 2013). Les principaux composants de ce système comprennent des capteurs de radicaux non enzymatiques, parmi lesquels les caroténoïdes, les flavonoïdes et les composés phénoliques. Ces composants protègent les cellules végétales des dommages oxydatifs en éliminant les ROS (Schafer *et al*., 2002). Une meilleure compréhension des mécanismes antioxydants sous-jacents assurée par les composés phénoliques est nécessaire pour développer des stratégies pour les sols de cultures contaminés.

Les plantules, de haricot ainsi que ceux de la fève, cultivées sous traitements au Cd ont montré une augmentation significative des teneurs en composés phénoliques, des teneurs totales en flavonoïdes ; ainsi que des falvonols ; et des tanins condensés chez le haricot dans les deux parties des plantes. En effet sous stress métallique, les composés phénoliques peuvent agir comme des chélateurs d'ions de métaux de transition, des piégeurs de ROS (Vollmannova *et al*., 2014; Manquian-Cerda *et al*., 2016) et peuvent supprimer la peroxydation lipidique en inhibant les réactions radicalaires en chaîne pendant la peroxydation lipidique (Arora *et al*., 2000; Sakihama et Yamasaki, 2002).De plus ils interviennent dans la biosynthèse de plusieurs produits comme la lignine, la subérine et les

flavonoïdes (Booke r*et al*. 1996). Ces produits augmentent la rigidité de la paroi cellulaire en présence du stress (Quiroga, 2000).

Selon Jiang *et al*. (2017) une teneur plus élevée en composés phénoliques dans les racines et les feuilles semble non seulement avoir une plus grande capacité à éliminer les ROS, mais aussi une plus grande capacité à transloquer et chélater les métaux phytotoxiques dans les plantes. Ces ions métalliques chélatés peuvent être transférés par la suite vers des vacuoles (Catherine A. Rice-Evans, 1996). Chen *et al*. (2019) ont rapporté qu'une augmentation des composés phénoliques solubles qui rentrent dans la biosynthèse de la lignine augmente l'endurance de la paroi cellulaire par la création de barrières physiques qui protègent les cellules contre l'action nocive des métaux lourds, ainsi qu'influencent la transition des ions métalliques dans les tissus végétaux puisque la lignification conserve probablement une partie substantielle de métaux dans la fraction de paroi cellulaire. Cette séquestration aurait pu immobiliser efficacement le Cd et le Zn dans les racines de la mangrove. Cela peut être identifié comme une stratégie de protection écologique en réponse au stress métallique.

En outre l'activité de la Shikimate déshydrogénase (SKDH), de l'alcool cinnamylique déshydrogénase (CAD) et de la polyphénol oxydase (PPO) augmentait entre-temps lorsque les composés phénoliques totaux augmentent chez *Kandelia obovata* exposé à des concentrations plus élevées de cadmium (Cd) et de zinc (Zn), qui indiquent que le Cd et le Zn jouent un rôle auparavant non reconnu mais majeur dans la synthèse, le transport et le métabolisme des composés phénoliques.

En effet L'activité CAD est liée à la biosynthèse de la lignine ; La PPO partage également un rôle dans la synthèse des composés phénoliques et de la lignine chez *K.obovata*, et peut participer à l'élimination des excès de ROS causés par le Cd et le Zn, jouant ainsi un autre rôle détoxifiant pendant le traitement au Cd et au Zn. Il a été rapporté (Mobin *et al*., 2014) que le dépôt de phénols polymérisés joue un rôle important dans la restriction des niveaux d'ions métalliques libres en stimulant plusieurs enzymes apparentées : Les polyphénol oxydases. Chen *et al*. (2019) ont enregistré une forte augmentation de l'activité peroxydase préférentiellement dans le Cd et / ou le Zn traités dans les racines et les feuilles, ce qui a également été signalé dans d'autres espèces végétales (Drazic et Mihailovic, 2005). De l'autre part SKDH est un type d'enzyme qui participe à la voie du shikimate, convertissant les glucides simples en acides aminés aromatiques ou en phénylalanine qui serons utilisés pour la synthèse de polyphénols.

Kovácik *et al*. (2006) ont affirmé que l'activation de l'enzyme phénylalanine ammoniac-Liaza (PAL) est la principale cause d'augmentation de la concentration des métabolites phénoliques, car c'est la principale voie de biosynthèse des composés phénoliques. Une augmentation du total des composés phénoliques sous pollution par le Cd a été signalée dans plusieurs plantes, dont *P. vulgaris* (Manquian-Cerda *et al*., 2016; Mongkhonsin *et al*., 2016; Younis *et al*., 2018b; Chen *et al*., 2019).

Les flavonoïdes sont fréquemment induits par le stress abiotique en particulier par les ETM et favorisent les rôles dans la protection des plantes (Grace et Logan, 2000; Dai*et al*., 2006). Les activités biologiques et antioxydantes des flavonols, entre autres la quercétine, ont été prouvées (Tsai *et al*., 2002). Les propriétés antioxydantes de l'ATH (anthocyanines) du chou rouge ont également été prouvées (Glinska *et al*., 2007; Posmyk *et al*., 2007). De plus, ils ont une forte tendance à chélater les ETM. En particulier, les groupes hydroxyle et carbonyle des polyphénols qui peuvent se lier fortement au Cu et au Fe. Ce comportement chélatant fait des polyphénols de bons candidats dans la prévention de la formation de radicaux libres catalysée par les métaux (Lopes *et al*., 1999), Posmyk *et al*. (2009) ont rapporté qu'à 0,5 mM de Cu^{2+}, la concentration d'anthocyanines augmentait et que la synthèse d'anthocyanines était la stratégie efficace contre les ROS générés par le stress au Cu^{2+}. On sait que les flavonoïdes sont des inhibiteurs de l'enzyme lipoxygénase, qui convertit les acides gras polyinsaturés en dérivés contenant de l'oxygène (Nijveldt*et al*., 2001).

Posmyk *et al*. (2009), Mongkhonsin *et al*. (2016) et Younis *et al*. (2018b) ont examiné des plants de haricots communs traités avec des métaux tels que le Cu et le Cd et ont signalé une augmentation de la concentration de flavonoïdes dans les pousses et les racines.

Dans la présente étude, le Cd a conduit à une augmentation marquée des tanins. Les tanins ont de grandes capacités anti-oxydantes grâce à leurs noyaux phénoliques. Selon Bruneton (1999), les tanins hydrolysables sont des piégeurs de ROS et d'anions superoxyde et sont de très bons donneurs de protons pour les ROS produits pendant la peroxydation, ce qui entraîne une formation de radicaux tanniques plus stable. Les tanins sont connus pour éliminer les métaux lourds des solutions à l'aide de technologies vertes (Sun *et al*., 2019). Oo (2009) a rapporté que les ions métalliques pouvaient interagir avec les groupes hydroxyle des tanins de mangrove par un processus d'échange d'ions et/ou de complexassions.

III.5. Effet du Cd sur l'anatomie des plantules de *Phaseolus vulgaris* L. et *Vicia faba* L.

III.5.1.Anatomie des tiges

L'examen microscopique des coupes transversales des tiges de *P. vulgaris* L., réalisé entre les premiers et deuxièmes entre-nœuds, après coloration au carmin vert d'iode (Fig. III.33 A, B, C, D), montre une similarité de diamètre que ce soit pour les échantillons témoins ou ceux traités au Cd, avec un léger aplatissement de la section de la tige. Les cellules du cortex sont de taille similaire dans tous les échantillons ; cependant, un léger élargissement de la zone corticale est relevé sur les tiges exposées au Cd.

À fort grossissement (Fig. III.33 E, F, G, H), nous notons que les plantules soumises à différentes concentrations de Cd présentent un nombre de cellules par faisceaux et une taille des vaisseaux du xylème nettement plus réduit par rapport aux témoins. La différenciation du xylème semble retardée chez les plantes cultivées en présence de Cd ainsi que les épaississements pariétaux ; ce qui a probablement conduit à une diminution du flux de la sève brute.

Chez les plantes témoins, le développement de la plante conduit à la disparition progressive du parenchyme cortical entraînant la formation de lacunes médullaires dans la tige ; nos résultats ont montré que le diamètre des lacunes médullaires diminue avec l'augmentation de la concentration de Cd jusqu'à sa disparition avec la concentration de 1 $g.l^{-1}$ Cd (Fig. III.33 A,B,C,D), ce qui suggère un retard dans le développement des plantules de haricot. En outre, en présence de Cd nous notons qu'il y a une absence ou tout au moins un retard dans la mise en place des tissus vasculaires secondaires, avec un nombre élevé de cellules cambiales chez le témoin (Fig. III.33E, F, G, H).

D'autre part, les concentrations élevées de Cd impact négativement sur la croissance en longueur des plantules et réduit aussi bien la taille que la densité des poils absorbants.

L'étude anatomique des coupes transversales réalisées au niveau des tiges de la fève a montré une diminution du diamètre des tiges traitées au Cd par rapport au témoin ; Cette diminution est liée à la réduction de la taille des cellules corticales et également de la taille des éléments vasculaires. Les faisceaux vasculaires sont disposés radialement, le xylème se différencie de manière centrifuge, superposé avec le phloème, présent au niveau du cylindre central ainsi qu'au niveau des pôles de la tige.

Une apparence modérée des éléments de xylème et de phloème de la tige par rapport aux échantillons témoins a également été signalée (Fig. III.34 A,B,C,D).

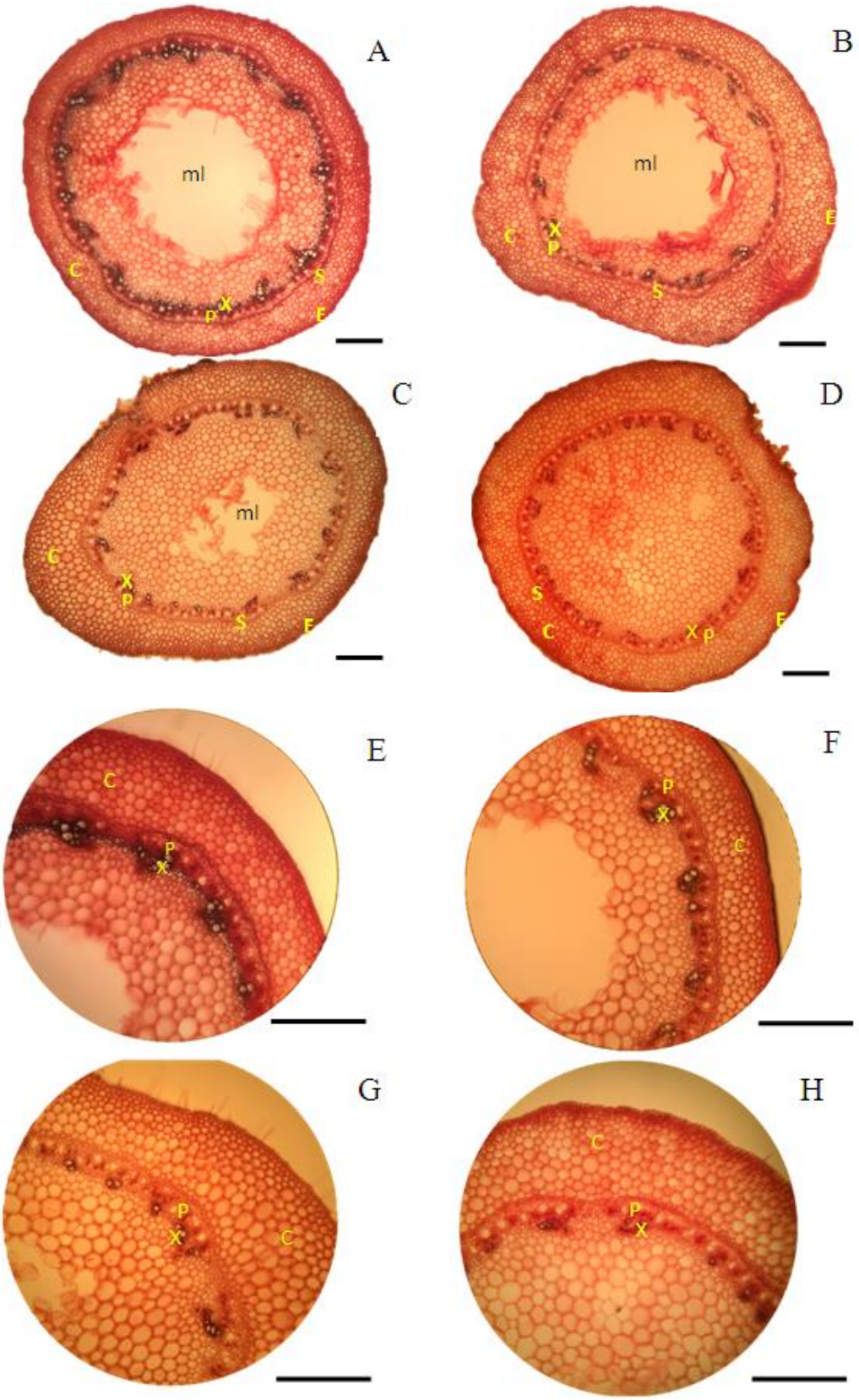
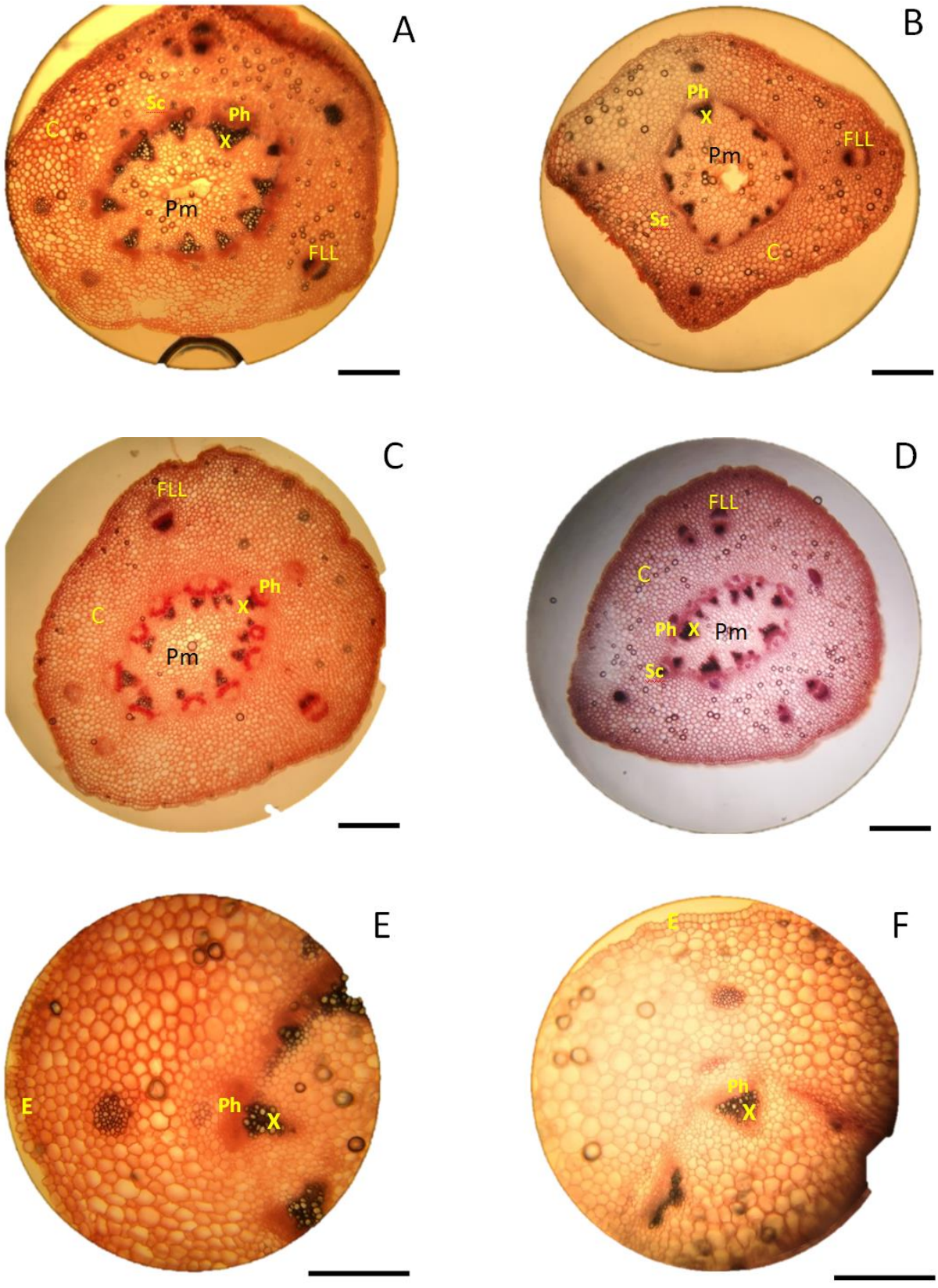


Figure III.33 : *Coupes transversales de tiges de haricot commun des plantes témoins (A, E) et traitées au Cd : 0,25 g.l^{-1} (B, F); 0,5 g.l^{-1} (C, G); 1 g.l^{-1} (D, H) observées au microscope photonique. C : cortex, X: xylème, P: phloème, S: sclérenchyme, E: épiderme, ml: lacunes médulaires; Barre d'échelle, 500 µm*


A
Sc
Ph
X
C
Pm
FLL
B
Ph
X
FLL
Pm
Sc
C
C
FLL
Ph
X
C
Pm
D
FLL
C
Ph
X
Pm
Sc
E
E
Ph
X
F
E
Ph
X

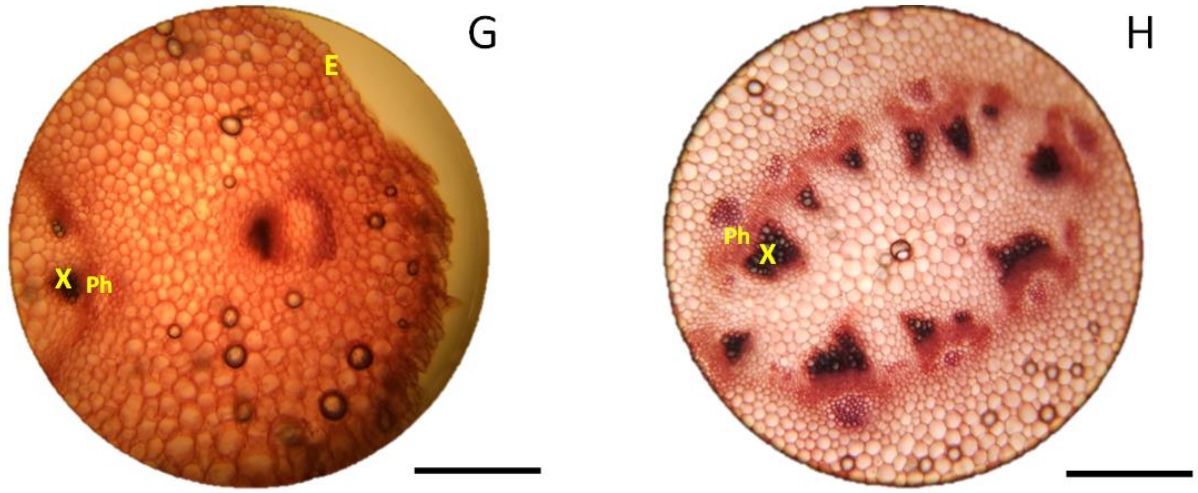


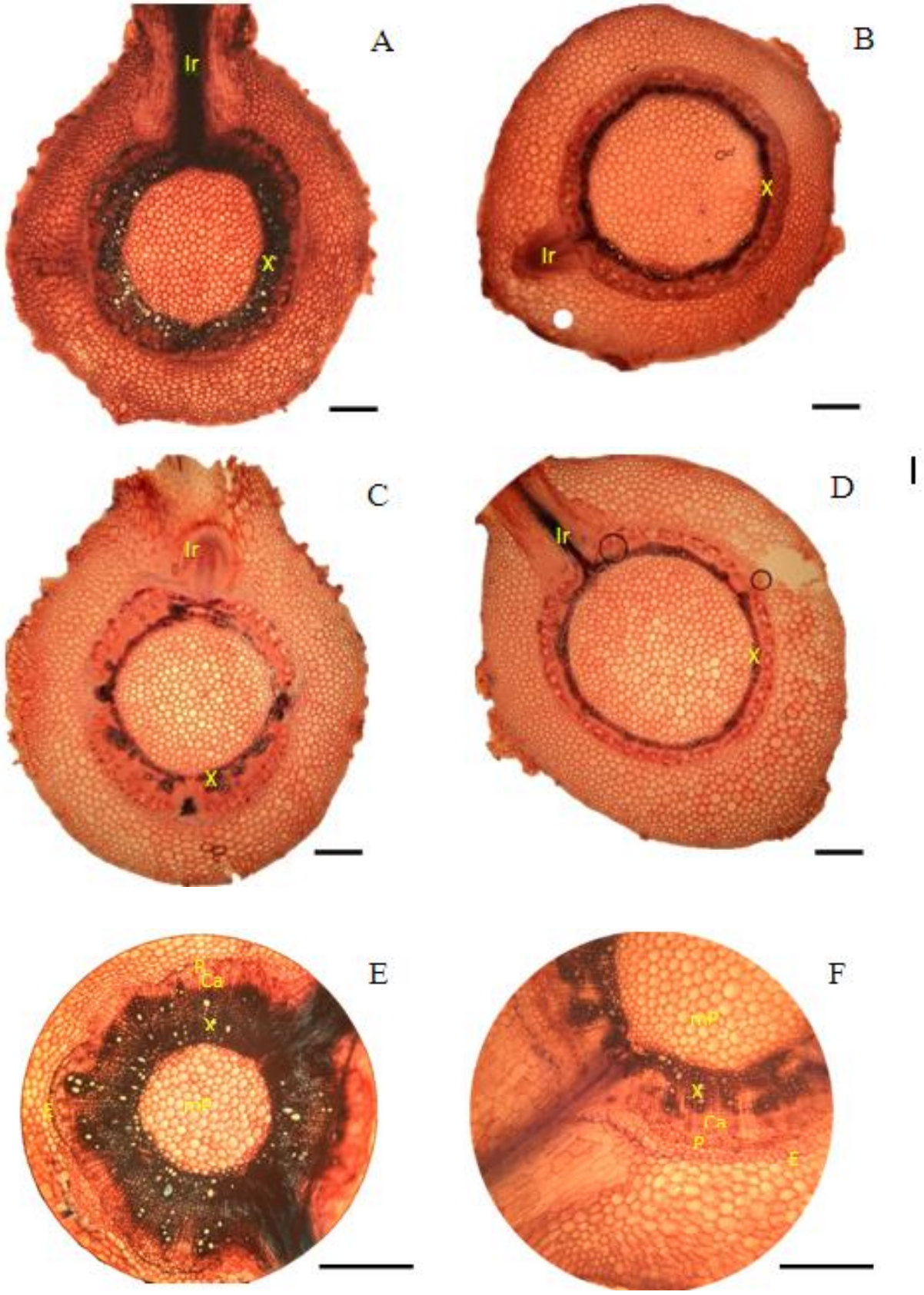
Figure III.34 *: Coupes transversales de tiges de la fève des plantes témoins (A, E) et traitées au Cd: 0,25 g.l^{-1} (B, F); 0,5 g.l^{-1} (C, G); 1 g.l^{-1} (D, H) observées au microscope photonique. C: cortex, X: xylème, P: phloème, Fs: fibres de sclérenchyme, E: épiderme, Pm: parenchyme médullaire, S : sclérenchyme ; FLL : faisceaux libéro-ligneux ; Barre d'échelle, 500 µm*

Il est à noter qu'au niveau de l'écorce de la tige, la présence de fibres de sclérenchyme est plus importante dans les plantules témoins que celles des plantules traitées au Cd, dont les parois se sont épaissies par un dépôt de lignine qui confère dureté et rigidité à la plante.

III.5.2. Anatomie des racines

L'anatomie des racines de *P. vulgaris* présente des modifications structurales au niveau des éléments du xylème, une diminution du nombre et de la taille des vaisseaux du xylème a été observée et la différenciation du xylème semble être retardée chez les plantules cultivées en présence de Cd. De plus, les tissus secondaires sont déjà formés chez les plantules témoins. En revanche, ces tissus sont retardés chez les plantules cultivées en présence de Cd avec un nombre élevé de cellules cambiales (Fig. III.35 E, F, G, H).

Les concentrations les plus élevées de Cd peuvent entraîner une désintégration du rhizoderme à certains endroits de la racine primaire. Cependant, la formation des racines secondaires a eu lieu dans tous les échantillons (Fig. III.35A, B, C, D).


A
Ir
X
B
X
Ir
C
Ir
X
D
Ir
X
E
Ca
X
mP
F
mP
X
Ca
P
E
F

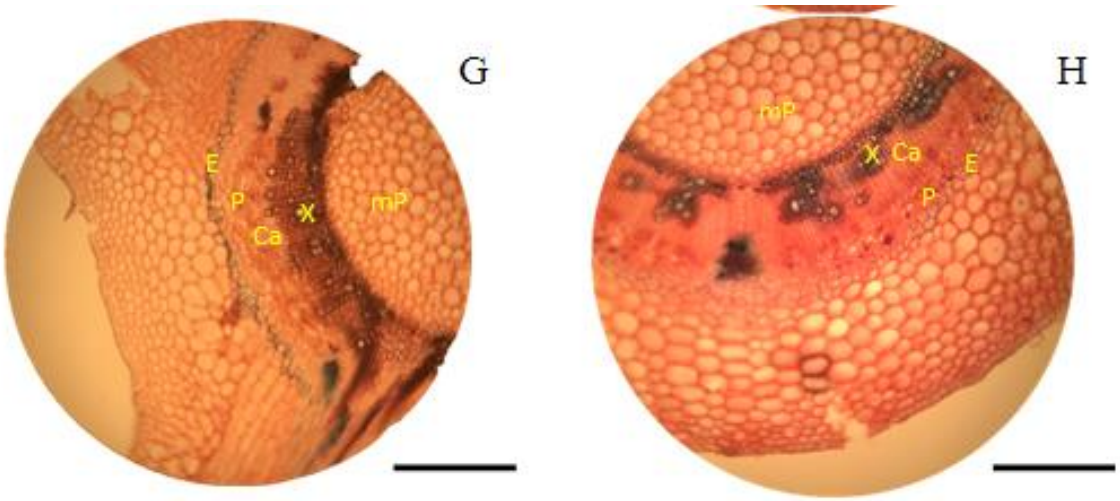


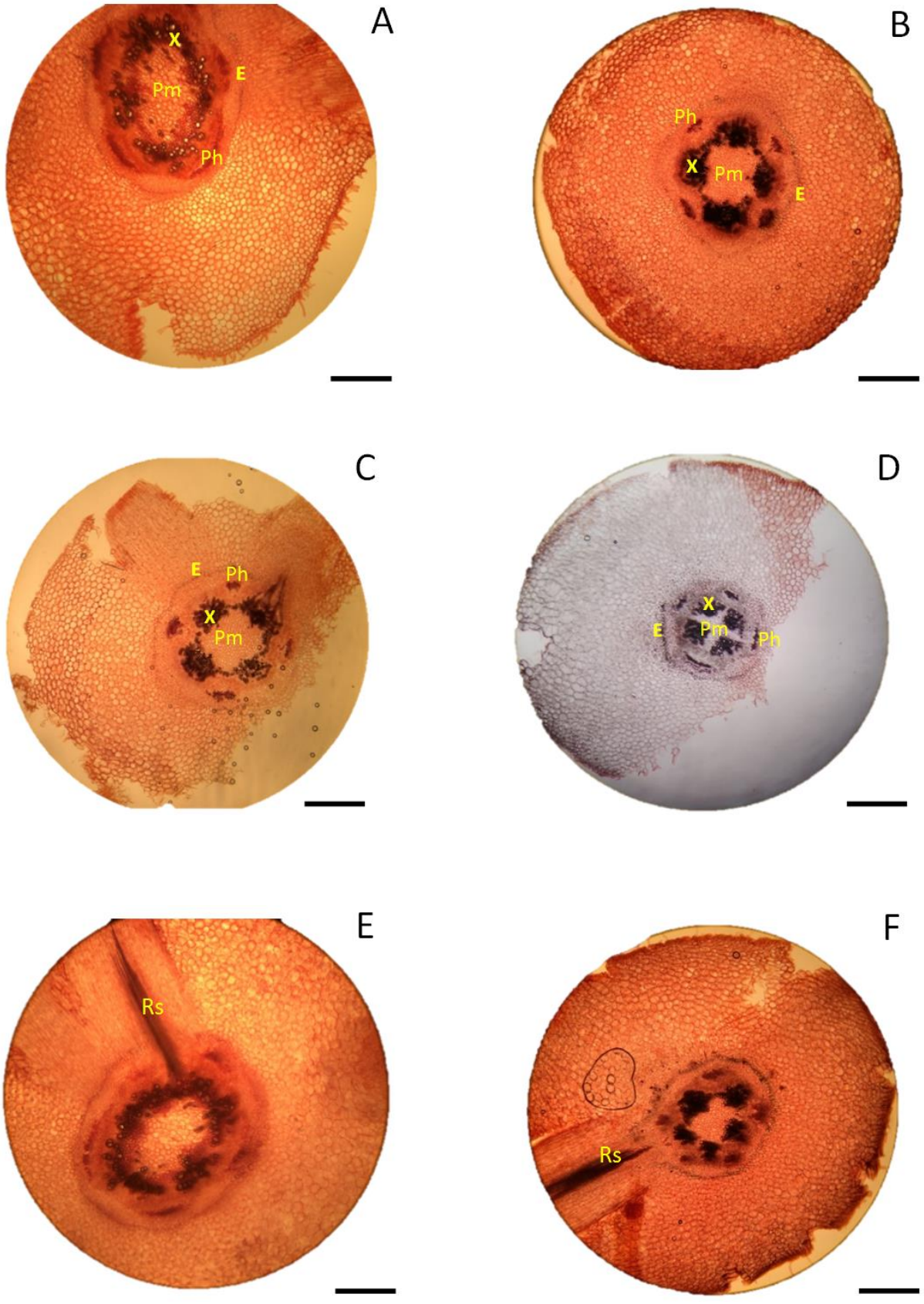
Figure III.35 : *Coupes transversales de racines de haricot commun des plantes témoins (A, E) et traitées au Cd: 0,25 g.l^{-1} (B, F); 0,5 g.l^{-1} (C, G); 1 g.l^{-1} (D, H) observées au microscope photonique. C: cortex, X: xylème, P: phloème, E: endoderme, Ca: cambium; lr: racine latérale; mP: parenchyme médullaire ; Barre d'échelle, 500 µm*

Au niveau des racines de fève, nous relevons une similarité de l'anatomie générale des échantillons traités et des témoins. En effet, les racines des plantes de fève témoins et traitées au Cd à différentes doses présentent des cellules du cortex de taille identique. Par contre le diamètre des racines a diminué chez les plantes traitées par rapport au témoin. Tant dans les racines témoins que traitées au Cd, l'épiderme était monocouche, le cortex composé des cellules parenchymateuses à méats à paroi mince juste sous l'épiderme (Fig. III.36. A,B,C,D). Aussi, nous remarquons un retard de développement au niveau de racines traitées par le Cd se traduisant par un retard de l'initiation de tissus secondaires, à la différence des racines témoins qui présentent plusieurs assises cambiales.

L'apparition des racines latérales a été observée dans les quatre échantillons dont une légère différence de l'épaisseur de ces dernières qui diminuent avec l'augmentation de la concentration de Cd (Fig. III.36. E,F,G,H).

Des changements structurels remarquables induits dans les tissus racinaires par l'exposition de la plante au Cd se sont produits dans le système vasculaire. Dans les racines traitées au Cd, le diamètre des vaisseaux du métaxylème a diminué par rapport au témoin. Le parenchyme médullaire était plus petit dans les racines des plantes traitées au Cd. En outre, on remarque la présence d'un endoderme monocouche à cadre dont la taille des cellules est presque similaire pour l'ensemble des coupes des plantules témoins et traitées.

V. faba semble incapable de survivre longtemps à une concentration très élevée de cadmium (1 g.l^{-1}), ceci s'expliquerait par les changements morpho-anatomiques extrêmes observés au niveau des racines qui limitent et altèrent la fonction racine (Balestri *et al*., 2014).


A
X
E
Pm
Ph
B
Ph
X
Pm
E
C
E
Ph
X
Pm
D
X
E
Pm
Ph
E
Rs
F
Rs

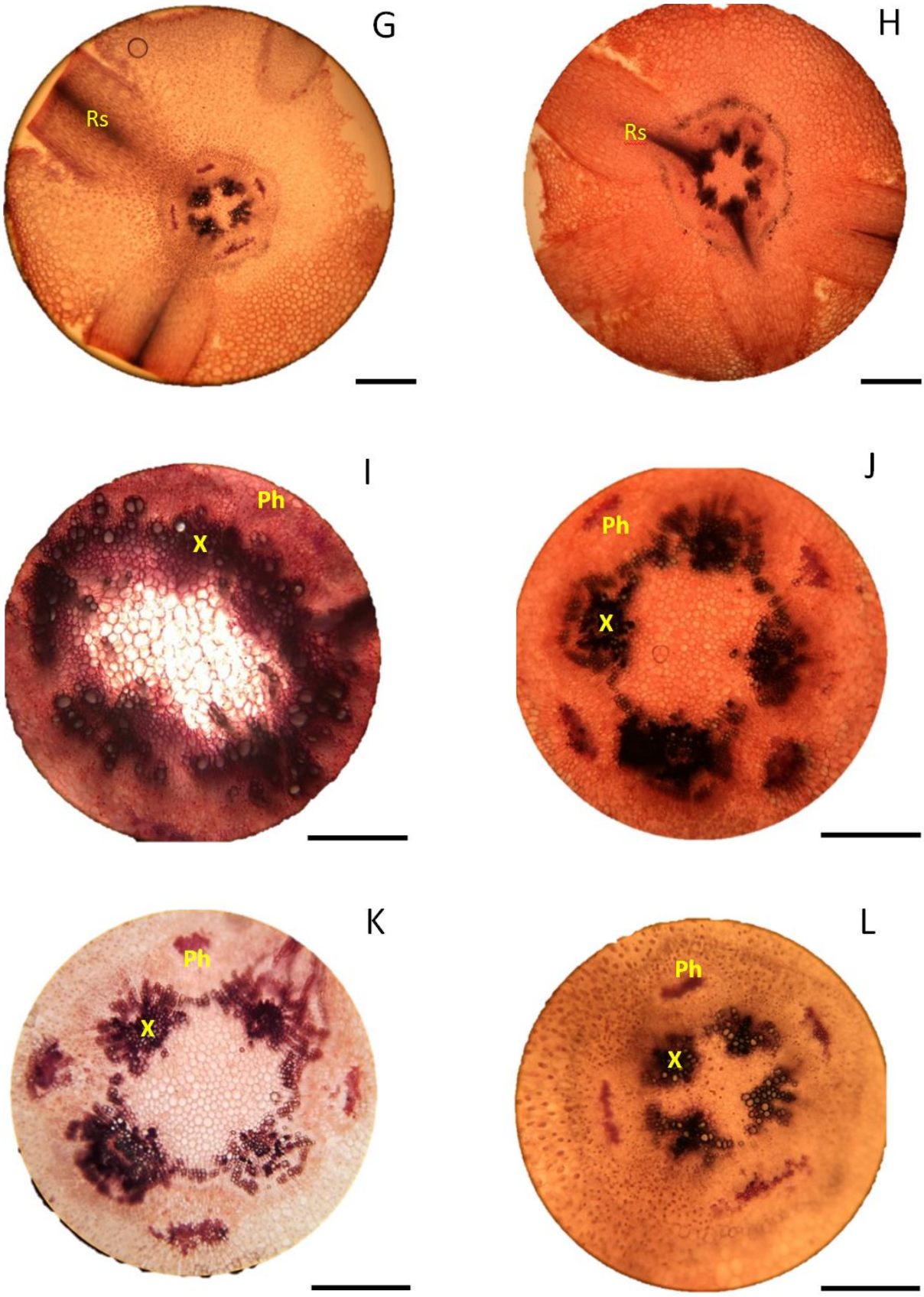


Figure III.36 : *Coupes transversales de racines de la fève des plantes témoins (A, E,I) et traitées au Cd: 0,25 g.l^{-1} (B, F, J); 0,5 g.l^{-1} (C, G, K); 1 g.l^{-1} (D, H, L) observées au microscope photonique. X: xylème, Ph: phloème; Rs: racine secondaire; Pm: parenchyme médullaire ; Barre d'échelle, 500 µm*

L'anatomie végétale est connue pour être sensible aux conditions physiques et chimiques, comme la pollution par le Cd. Des changements anatomiques en réponse au Cd ont été rapportées depuis longtemps par Barcelo *et al*., (1988), Lux *et al*., (2011) et Pereira *et al*. (2018) qui ont travaillé respectivement sur *Phaseolus vulgaris* L., *Zea mays* L. et *Solidago chilensis* L.

La présence de Cd dans le sol entraîne un léger élargissement de la zone corticale chez *P. vulgaris*. Dans la racine, le transport de l'eau et de solutés s'effectue de façon radiale, des poils absorbants vers la stèle centrale où se trouve le xylème, en traversant la paroi ou le cytoplasme des cellules du cortex. Comme mentionné par Maksimovic *et al*. (2007), l'élargissement de la zone corticale a un rôle fonctionnel dans l'augmentation de la résistance des plantes aux écoulements radiaux d'eau et de solutés chez le maïs sous une pollution par le Cd et le Ni.

Cependant, Peu d'informations sont disponibles sur le développement des cellules et des tissus du cylindre central sous stress par le Cd; ce sujet nécessite une attention particulière, compte tenu de l'importance du xylème dans la translocation du Cd et dans la régulation du mouvement du cadmium des racines vers les tissus aériens.

Nos résultats rejoignent ceux d'Aloni (1987), Barcelo *et al*. (1988) et Vazquez *et al*. (1992) qui ont signalé que le Cd réduit le nombre et la taille des vaisseaux du xylème. Les causes peuvent être multiples : Suivant l'hypothèse de l'adaptation vasculaire d'Aloni (1987), la présence de facteurs de stress dans l'environnement immédiat de la plante limite la taille finale de la plante et se traduit par des pousses petites ou supprimées avec des vaisseaux plus petits mais plus nombreux. Lors de notre étude, nous avons observé une diminution du diamètre des vaisseaux, mais aucune augmentation du nombre de vaisseaux, ce qui est en accord avec Barcelo *et al*. (1988).

Le cadmium peut affecter directement ou indirectement la division cellulaire et la différenciation dans le cylindre vasculaire, qui semble être essentielle à la fois pour la production de pro-cambium et de cambium et pour la différenciation des cellules de cambium en vaisseaux et en fibres (Fig. III.37) ce qui conduit à un mauvais développement des faisceaux vasculaires (Aloni, 1987). De plus Barcelo *et al*. (1988) rapportent que, le traitement au Cd diminue la densité des vaisseaux et des fibres et peut affecter la différenciation des éléments et des fibres de la trachée par plusieurs mécanismes. Les

vaisseaux et les fibres se différencient à partir du cambium, dont le nombre a été considérablement réduit par le Cd.

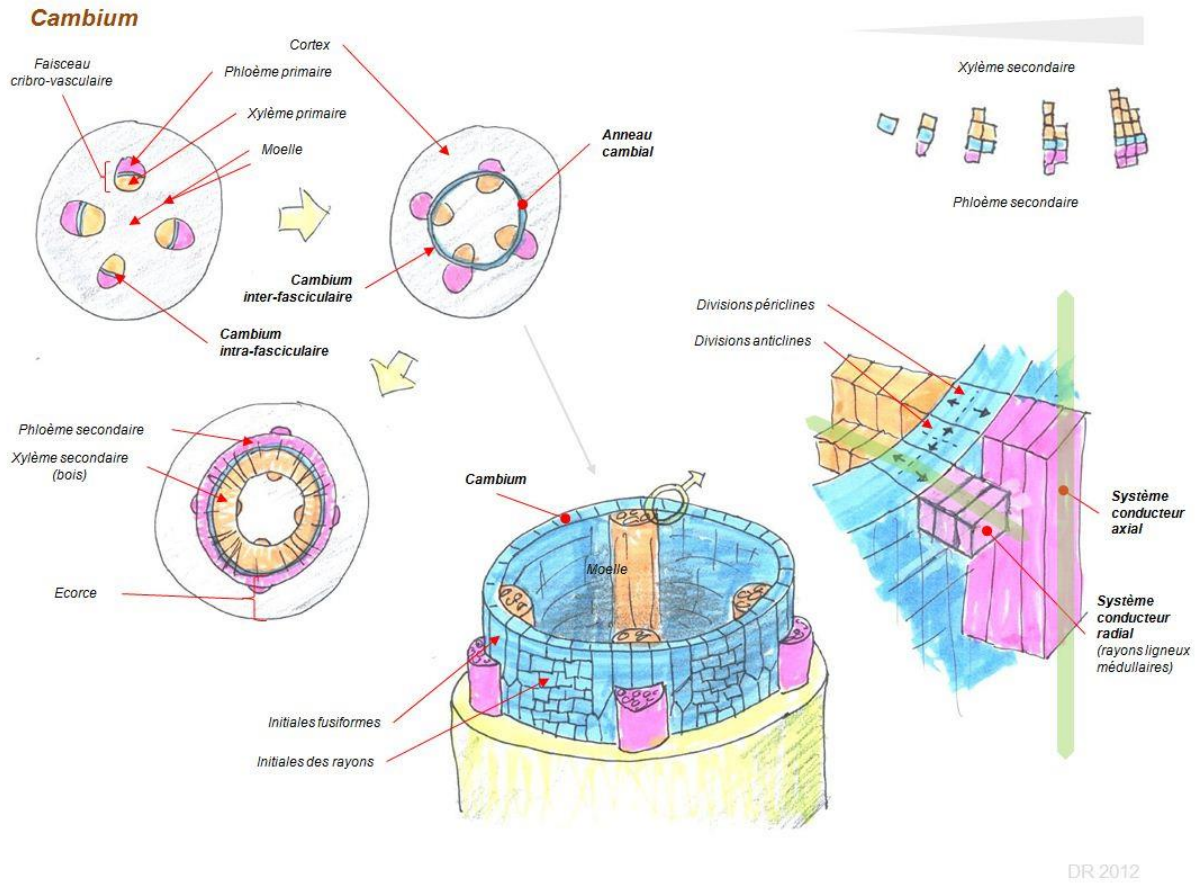


Figure III.37: *Schéma simplifié de la mise en place et du fonctionnement du cambium selon Heller et al. (2000)*

De plus la division et la différenciation de ces éléments conducteurs dépend de l'équilibre des diverses phytohormones. Nous avons constaté que les auxines, les gibbérélines, les cytokinines et l'éthylène influent sur la différenciation du xylème et / ou des fibres (Aloni, 1987, Bhalerao et Bennett, 2003). Les auxines sont les hormones végétales les plus connues et ont été impliquées dans la régulation de nombreux aspects du développement des végétaux. Les auxines jouent notamment un rôle fondamental dans l'induction et la progression du cycle cellulaire (Perrot-Rechenmann, 2010).

Au niveau du cambium, il a été montré que les auxines initient et maintiennent l'activité de division cellulaire (Little et Wareing, 1981), influencent le taux de division cambiale, ainsi que les proportions relatives de xylème et de phloème (Aloni, 1987).

Cependant, la présence de cytokinines est également indispensable pour stimuler les divisions cellulaires et donc pour la formation et le maintien des cellules cambiales (Fukuda, 2004). Enfin, les gibbérellines sont également connues pour promouvoir la division (Aloni, 2001). Auxines, cytokinines et gibbérellines agissent en stimulant la synthèse d'enzymes-clés de la régulation du processus de division, appelées protéines-kinases-cycline dépendantes (CDKs) (Perrot-Rechenmann, 2010). L'activité des CDKs est essentielle pour l'entrée des cellules qui ne se divisent pas dans le cycle cellulaire et pour le bon déroulement de celui-ci.
Dans des expériences à court terme, une augmentation transitoire de l'éthylène a été trouvée comme réponse précoce à un excès de Cd (Fuhrer, 1982). Il semble que le Cd stimule la dégradation de l'auxine (Chaoui*et al*., 2005).

Aloni (1982), rapporte que le Cd peut diminuer la taille du cambium et la différenciation des fibres dans les tiges en inhibant l'exportation des cytokinines à partir des racines.
Des informations sur ce sujet sont manifestement nécessaires pour comprendre les mécanismes des altérations de croissance et de différenciation induites par le Cd. D'autres altérations ont été observées par Barcelo *et al*. (1988), à savoir l'obstruction du xylème et l'accumulation de cristaux, peuvent être considéré comme des effets secondaires survenant plus tard.

L'exposition au Cd chez le haricot n'a eu aucun effet sur les diamètres des racines, ce qui corrobore les résultats obtenus en 1992 par Vázquez *et al*. Cependant, des concentrations plus élevées de Cd peuvent entraîner la désintégration du rhizoderme à certains endroits de la racine, des effets anormaux similaires ont également été décrits chez la tomate (Gratão *et al*., 2009).

Une grande partie du Cd absorbé par les plantes est retenue dans les racines, mais une partie est transférée vers les parties aériennes de la plante en général (Vollenweider *et al*., 2006).
Par conséquent, des changements minimes dans les caractéristiques anatomiques des tiges ont été observés par rapport aux racines.

CONCLUSION

VI. CONCLUSION

L'objectif général de la thèse était de caractériser au niveau morphologique, physiologique, biochimique, et anatomique les effets du Cadmium sur le haricot commun et la fève. L'étude a porté sur l'exposition des plantules de haricot commun et de fève à des concentrations croissantes du Cd ($0,25g.l^{-1}$, $0,5g.l^{-1}$, $1g.l^{-1}$) pendant 21 jours de culture. Notre objectif a été décliné en différentes opérations. La première était un test d'inhibition de germination de graines et d'élongation des radicules, les résultats ont montrés une baisse significative atteignant 98% et 91 % respectivement pour le haricot et la fève. L'analyse morphologique a montré que l'application du Cd produit une baisse de la croissance globale des plants, en perturbant de très nombreux mécanismes physiologiques, entraînant la formation de plantes de taille réduite. L'inhibition de la division et de l'élongation cellulaire sont les phénomènes les plus souvent mentionnées pour expliquer ces effets de Cd, l'indice de tolérance des plantules de haricot et de fève est inférieur à 1 pour toutes les concentrations de Cd dans les deux parties de la plante, ainsi confirme une diminution nette de la biomasse et suggère que nos plantules sont stressées.

Concernant les variables biochimiques de la plante, nous avons trouvé que, le Cd a perturbé l'activité de synthèse des pigments photorécepteurs en affectant la synthèse d'enzymes clés ou en augmentant la dégradation enzymatique de la chlorophylle, pour les pigments caroténoïdes, les résultats obtenus ont mis en évidence un effet dépressif du Cd sur la synthèse et /ou la libération des caroténoïdes pour les deux plantes.

Les glucides dont l'augmentation chez le haricot résulte, selon Jha et Dubey (2004), d'une activation de différentes enzymes hydrolytiques, contribueraient à l'élimination des ROS et à l'osmorégulation, augmentant ainsi la tolérance de la plante (Morsy *et al*., 2007). Ligands potentiels des métaux lourds, certains acides aminés joueraient ainsi un rôle dans la tolérance et la détoxification (Sharma et Dietz, 2006). Parmi les acides aminés, la proline constitue un indicateur de stresses environnementaux. Sous l'effet du cadmium, l'augmentation de sa teneur dans les feuilles est en accord avec son rôle de protection contre le stresse abiotique. La diminution des teneurs en protéines qui résulte soit d'une hydrolyse accrue soit d'un ralentissement de leur biosynthèse est significative chez les deux espèces étudiées.

Après exposition au Cd, les composés phénoliques ; substances antioxydantes non enzymatiques, augmentent fortement dans les deux parties des plantules, l'effet étant particulièrement marqué chez la fève cette accumulation résulterait d'une activation de leur synthèse et/ou d'une réduction de leur dégradation.

Les résultats de cette étude soutiennent l'idée que la présence du Cd dans le sol a affecté non seulement la morphologie des plantules de haricot et de la fève, mais aussi leur structure anatomique. En effet, nous montrons que les racines et les tiges des plantes cultivées en présence du Cd présentent une réduction du nombre et de la taille des vaisseaux de xylème secondaire suite à un retard dans la différenciation de ce tissu ce qui peut contribuer à diminuer l'absorption du polluant.

Cette étude a montré que les plantules de la fève sont un bon choix pour développer des tests de phytoremédiation. En effet, les plantules fève semblent tolérer le Cd. En dépit de la réduction de leur taille, de leur teneur en pigments, les plantules de fève apparaissent en bonne santé et continuent leur développement ; elles semblent faire face au polluant en prenant en charge les molécules actives d'oxygène (augmentation des teneurs en composés phénoliques) d'une part, d'autre part elles modifient la structure anatomique de leur racine.

Perspectives

En perspective, cette étude pourrait être améliorée par :

- Le dosage du Cd dans les parties aérienne et souterraines des deux plantules, permet de déterminer les facteurs de transfert (sol/ plante) et de translocation (partie souterraine/partie aérienne) et de déterminer le seuil de phytoremédiation par les deux plantes étudiées.
- L'évaluation du pouvoir prédictif des corrélations obtenues entre l'accumulation du cadmium et la teneur en composés phénoliques.
- L'évaluation de l'effet du Cd sur le profil des composés phénoliques et des antioxydants enzymatiques semble être importante.
- L'étude des mécanismes de la génotoxicité du Cd en mesurant le taux des cassures sur l'ADN et l'oxydation des bases, par la méthode « Comet assay ».
- Tester le Cd sur d'autres espèces
- Consulter d'autres éléments traces métalliques.

BIBLIOGRAPHIE

V. BIBLIOGRAPHIE

- Agbogidi, O.M. (2009): Locational effect on the performance of maize (*Zea mays L*) in soils treated with crude oil. – African Journal of Environmental Pollution and Health. 7(1): 36-42.
- Ahmad, P., Nabi, G., Ashraf, M. (2011): Cadmium-induced oxidative damage in mustard (*Brassica juncea L*.) Plants can be alleviated by salicylic acid. – S. Afr. J. Bot. 77: 36–44.
- Akinci, I.E., Akinci, S. (2010): Effect of chromium toxicity on germination and early seedling growth in melon (*Cucumis melo L*.). – Afr J Biotechnol. 9(29):4589–4594
- Alia, P., Pardha, S. (1991): Proline accumulation under heavy metal stress. – Journal of Plant Physiology 138: 554-558.
- Alkantara, E., Romerza, F. J., Canett, M., De LaGuardia, M. D. (1994): Effect of heavy metals on both induction and function of root Fe (III) reductase in Fe-deficient cucumber (*Cucumis sativus* L.). Plants. – J. Exp. Bot. 45: 1893-1898.
- Aloni, R. (1982): Role of cytokinin in differentiation of secondary xylem fibers. – Plant Physio. 70: 1631-1633.
- Aloni, R. (1987): Differentiation of vascular tissues. – Ann. Rev. Plant Physio. 38: 179-204.
- Aloni, R. (1988): Vascular Differentiation of within Plants. – In: Roberts, L. W., Mahan, P. B., Aloni, R. (eds.) Vascular Differentiation and Plant Growth Regulators. Springer-Verlag, Berlin, pp. 39-59.
- Aloni, R. (2001): Foliar and axial aspects of vascular differentiation: hypotheses and evidence.- Journal of Plant Growth Regulation 20: 22-34.
- Anjum, S. A., Tanveer, M., Hussain, S., Bao, M., Wang, L., Khan, I., Shahzad, B. (2015) Cadmium toxicity in Maize (*Zea mays* L.): consequences on antioxidative systems, reactive oxygen species and cadmium accumulation. – Environ SciPollut Res 22: 17022-17030.
- Aposhian, H.V., Aposhian, M.M. (2006): Arsenic toxicology: five questions. – Chem Res Toxicol 19:1–15
- Arias, J.A., Peralta-Videa ,J.R., Ellzey, J.T., Ren, M., Viveros, M.N., Gardea-Torresdey ,J.L. (2010): Effects of Glomus deserticola inoculation on Prosopis: enhancing chromium and lead uptake and translocation as confi rmed by X-ray mapping, ICP-OES and TEM techniques. – Environ Exp Bot 68:139–148
- Armendariz, A.L., Talano, M.A., Travaglia, C., Reinoso, H., Wevar Oller, A.L., Agostini, E. (2016): Arsenic toxicity in soybean seedlings and their attenuation mechanisms. – Plant Physiol.

Biochem. 98: 119–127.

- Arora, A., Byrem, T. M., Nair, M. G., Strasburg, G. M. (2000): Modulation of liposomal membrane fluidity by flavonoids and isoflavonoids. – Archives of Biochemistry and Biophysics 373: 102-109.
- Aslam, R., Ansari, M. Y. K., Choudhary, S., Bhat, T. M., Jahan, N. (2014): Genotoxic effects of heavy metal cadmium on growth, biochemical, cyto-physiological parameters and detection of DNA polymorphism by RAPD in *Capsicum annuum* L. - an important spice crop of India. – Saudi Journal of Biological Sciences 21: 465-472.
- ASMIDAL. (2004) : L'année (2003) : par les chiffres. ASMIDAL infos 22 Janvier
- Audet, P., Charest, C. (2007): Heavy metal phytoremediation from a meta-analytical perspective. – Environ. Pollut 147: 2337.
- Baghour, M., Moreno, D.A., Vı´llora, G., Hernandez, J., Castilla, N., Romero, L., (2001): Phytoextraction of Cd and Pb and physiological effects in potato plants (*Solanum Tuberosum* var. spunta): importance of root temperature. – J. Agric. Food Chem. 49: 5356–5363.
- Bahorun, T., Gressier, B., Trotin, F., Brunet, C., Dine, T., Luyckx, M., Vasseur, J., Cazin, M., Cazin, J. C., Pinkas, M. (1996): Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. – Arzneim Forsch 46: 1086-1108.
- Baize, D. (1997) : "Teneurs totales en éléments traces métalliques dans les sols (France). – " INRA Editions, Paris : 408.
- Balestrasse, K.B., Gardey, L., Gallego, S.M., Tomaro, M.L., (2001): Response of antioxidant defense system in soybean nodules and root subjected to cadmium stress. Aust. J. – Plant Physiol 28: 497–504.
- Balestri, M., Ceccarini, A., Forino, L.M.C., Zelko, I., Martinka, M., Lux, A., Ruffini Castiglione, M. (2014): Cadmium uptake, localization and stress-induced morphogenic response in the fern *Pteris vittata*. – Planta 239: 1055–1064.
- Barcelo, J., Vazquez, M. D., Poschenrieder, C. (1988): Structural and ultrastructural disorders in treated bush bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.). – New Phytol 108: 37-49.
- Baryla, A., Carrier, P., Franck, F., Coulomb, C., Sahut, C., Havaux, M. (2001): Leaf chlorosis in oilseed rape plants (*Brassica napus*) grown on cadmium-polluted soil: causes and consequences for photosynthesis and growth. – Planta. 212: 696–709.
- Bates, L. S., Waldren, R. P., Teare, I. D., (1973): Rapid determination of free proline for water stress studies. – Plant Soil 39: 205-207.

- Baudoin, J.P., Vanderborght, T., Kimani, P.M., Mwangombe, A.W.(2001): Common bean. In: Raemaekers, R.H. (Editor). Crop production in tropical Africa. – DGIC (Directorate General for International Co-operation), Ministry of Foreign Affairs, External Trade and International Co operation, Brussels, Belgium: 317–326.
- Bellout Y., Khelif L.,Guivarch A.,Haouche L., Djebbar R., Carol P.,Abrous Belbachir O. (2016): Impact of edaphic hydrocarbon pollution on the morphology and physiology of pea roots (*Pisum Sativum* L.). - Applied Ecology and Environmental Research 14(2): 511-525.
- Benavides M.P., Gallego S.M. et Tomaro M.L., (2005): Cadmium toxicity in plants. Braz. J. – Plant. Physiol. 17: 21-34.
- Berezin, I., Mizrachy-Dagry, T., Brook, E., Mizrahi, K., Elazar, M., Zhuo, S., Saul-Tcherkas, V., and Shaul, O. (2008): Overexpression of AtMHX in tobacco causes increased sensitivity to Mg^{2+}, Zn^{2+}, and Cd^{2+} ions, induction of V-ATPase expression, and a reduction in plant size. – Plant Cell Rep 27: 939-949.
- Bhalerao, R., Bennett, M. (2003): The case for morphogens in plants. – Nature Cell Biology 5: 939 - 943.
- Bhardwaj, P., Chaturvedi, A. K., Prasad, P. (2009): Effect of enhanced lead and cadmium in soil on physiological and biochemical attributes of *Phaseolus vulgaris* L. – Nat. Sci 7: 63-75.
- Boot, R.G.A., Mensink, M. (1990): Size and morphology of root systems of perennial grasses from contrasting habitats as affected by nitrogen supply. – Plant Soil. 129: 291–299.
- Bowler, C., Van Montagu, M., Inze, D. (1992): Superoxide dismutase and stress tolerance. – Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 43: 83-116.
- Bradford, M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. – Anal. Biochem 72: 248-254.
- Briat, J. F. et Lebrun, M. (1999): Plant response to metal toxicity. – C.R. Acad. Sci. Paris, Sciences de la vie 322: 43-54.
- Brignon, J.M. et Malherbe, L. (2005) : Cadmium et ses dérivés. INERIS – Données technico économiques sur les substances chimiques en France, Verneuil en Halatte : 25.
- Bruneton, J. (1999): Pharmacognosie, phytochimie, plantes médcinales. – Thechnique et Documentation. Ed. Lavoisier., Paris,: 227-401.
- Bulat, Z.P., Dukic-Cosic, D., Dokic, M., Bulat, P., Matovic, V. (2009): Blood and urine cadmium and bioelements profile in nickel-cadmium battery workers in Serbia. Toxicol. – Ind.

Health 25: 129–135.

- Burzynski, M. (1988): The uptake and accumulation of phosphorus and nitrates and the activity of nitrate reductse in cucumber seedlings treated with Pb and Cd. – Acta Soc. Bot 57: 349–359.
- Canado, I.C., Doussinague, C., Villena, E. (2003) : Technicien en agriculture. – Ed. Cultural S. A.Madrid. : 519.
- Cao, F., Zhou, T., Simpson, D., Zhou, Y., Boyer, J., Chen, B., Jin, T., Cordeiro-Stone, M., Kaufmann, W. (2007): Dependent but ATM-independent inhibition of DNA synthesis and G2 arrest in cadmium-treated human fibroblasts. –Toxicol. Appl. Pharmacol. 218: 174–185.
- Chang, C.Y., Yu, H.Y., Chen, J.J., Li, F.B., Zhang, H.H., Liu, C.P. (2014):Accumulation of heavy metals in leaf vegetables from agricultural soils and associated potential health risks in the Pearl River Delta, South China. – Environ. Monit. Assess. 186 : 1547–1560.
- Chang, Y. S., Chang, Y. J., Lin, C. T., Lee, M. C., Wu, C. W., Lai, Y. H. (2013): Nitrogen fertilization promotes the phytoremediation of cadmium in *Pentas lanceolata*. – Int Biodeter Blodegr. 85: 709-714.
- Chaoui, A., El Ferjani, E. (2005): Effects of cadmium and copper on antioxidant capacities, lignification and auxin degradation in leaves of pea (*Pisum sativum* L.) seedlings. – C R Biol. 328: 23 31.
- Chaoui, A., El Ferjani, E. (2004): Impact of cadmium and copper excess on cell wall peroxidases in *Pea stems*. – Pak J Biol Sci 7: 902-904
- Chaumont, A., De Winter, F., Dumont, X., Haufroid, V., Bernard, A. (2011): The threshold level of urinary cadmium associated with increased urinary excretion of retinolbinding protein and beta 2 microglobulin: a re-assessment in a large cohort of nickel-cadmium battery workers. – Occup. Environ. Med. 68: 257–264.
- Chaux, C., Foury, C.L. (1994) Production légumière: Légumineuses potagères, Légumes fruits. – Tome III, paris Ed: TEC. et DOC, Lavoisier : 563.
- Chen, C.T., Chen, L.M., Lin, C.C., Kao, C.H. (2001): Regulation of proline accumulation in detached rice leaves exposed to excess copper. – Plant Sci. 160: 283–290.
- Chen, F., Wang, F., Zhang, G.P., Wu, F.B. (2008): Identification of barley varieties tolerant to cadmium toxicity. – Biol Trace E- lem Res. 121: 171–179.
- Chen, S., Wang, Q., Lu, H., Li, J., Yang, D., Liu, J., Yan, C. (2019): Phenolic metabolism and related heavy metal tolerance mechanism in *Kandelia obovata* under Cd and Zn stress. – Ecotoxicology and Environmental Safety 169: 134-143.

- Chlopecka, A.J.R., Bacon, M.J., Wilson et Kay. J. (1996): Forms of cadmium, lead, and zinc in contaminated soils /Tom Southwest Poland. – J. Environ. QuaI. 25, 1:1151-1157.
- Cho, U.H., Seo, N.H. (2005): Oxidative stress in *Arabidopsis thaliana* exposed to cadmium is due to hydrogen peroxide accumulation. – Plant Sci. 168:113–120.
- Choi, Y.E., Harada, E., Wada, M., Tsuboi, H., Morita, Y., Kusano,T. et Sano, H.(2001) : Detoxification of cadmium in tobacco plants: formation and active excretion of crystals Containing cadmium and calcium through trichomes. – Planta 213: 45-50.
- Choudhary, M., Jetley, U. K., Abash, M., Zutshi, K. S., Fatma, T. (2007): Effect of heavy metal stress on proline, malondialdehyde, and superoxide dismutase activity in the cyanobacterium *spirulina platensis*-S5. – Ecotoxicology and Environmental Safety 66: 204-209.
- Chugh, L. K., Sawhney, S. K. (1995): Effect of cadmium on germination, amylases and rate of respiration of germinating pea seeds. – Environmental Pollution 92: 1-5.
- Clemens, S., (2006): Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. – Biochimie 88: 1707-1719.
- Cobbett, C. and Goldsbrough, P. (2002): Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. – Annu Rev Plant Biol 53: 159-182. Salt DE, Smith RD, Raskin I (1998) Phytoremediation. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 49: 643-668
- Comba, M.E., Benavioes, M.P., Gallego, S.M., Tonaro, M.L. (1998): Relationship between nitrogen fixation and oxidative stress induction in nodules of salt-treated soybean plants. – Phyton Int. J. Exp. Bot 60, 115–126.
- Connan, O., Maro, D., Hébert, D., Roupsard, P., Goujon, R., Letellier, B., Le Cavelier, S. (2013) : Wet and dry deposition of particles associated metals (Cd, Pb, Zn, Ni, Hg) in a rural wetland site, Marais Vernier, France. – Atmos Environ. 67: 394–403.
- Cook, M.E. et Morrow, H., (1995) : «Anthropogenic Sources of Cadmium in Canada» – Atelier national sur le transport du cadmium dans les plantes, Réseau canadien des centres de toxicologie, Ottawa, Ontario, Canada, (20-21 juin 1995).
- Cosio, C., Vollenweider, P., Keller, C. (2005): Localization and effects of cadmium in leaves of a cadmium-tolerant willow (*Salix viminalis* L.). I. Macrolocalization and phytotoxic effects of cadmium. - Environ. Exp. Bot 58: 64–74.
- Costa, G., Michaut, J., Morel, J. (1994): Influence of cadmium on water relations and gas exchanges, in phosphorus deficient *Lupinus albus* L. – Plant Physiol Biochem 32: 105-114
- Cruces, E., Rojas-Lillo, Y., Ramirez-Kushel, E., Atala, E., López-Alarcón, C., Lissi, E.,

Gómez, I. (2015): Comparison of different techniques for the preservation and extraction of phlorotannins in the kelp *Lessonia spicata* (Phaeophyceae): assays of DPPH, ORAC-PGR, and ORAC-FLas testing methods. – J. Appl. Phycol. 28: 573-580.

- Curie, C., Cassin, G., Couch, D., Divol, F., Higuchi, K., Le Jean, M., Misson, J., Schikora, A., Czernic, P., Mari, S. (2009): Metal movement within the plant: contribution of nicotianamine and yellow stripe 1-like transporters. – Ann Bot 103: 1-11
- Cuypers, A., Smeets, K., Ruytinx, J., Opdenakker, K., Keunen, E., Remans, T., Horemans, N., Vanhoudt, N., Van Sanden, S., Van Belleghem, F. (2011): The cellular redox state as a modulator in cadmium and copper responses in *Arabidopsis thaliana* seedlings. – J. Plant Physiol 168: 309-316.
- Dahmani-muller, H., Van Oort, F., Gelie, B., Balabane, M. (1999): Strategies of heavy metal uptake by three plant species growing near a metal smelter. – Environmental Pollution 109: 1-8.
- Dai, L. P., Xiong, Z. T., Huang, Y., Li, M. J. (2006): Cadmium-induced changes in pigments, total phenolics, and phenylalanine ammonialyase activity in fronds of *Azolla imbricate*. – Environ. Toxicol. 21: 505-512.
- DalCorso, G., Farinati, S., Maistri, S., Furini, A. (2008) : How plants cope with cadmium: staking all on metabolism and gene expression. – J Integr Plant Biol 50: 1268-1280
- Dally, H., Hartwig, A. (1997): Induction and repair inhibition of oxidative DNA damage by nickel(II) and cadmium(II) in mammalian cells. – Carcinogenesis 18: 1021–1026.
- Das, P., Samantaray, S. et Rout, G.R. (1997): Studies on cadmium toxicity in plants – A review. Environ. Pollut 98: 29-36
- Daud, M.K., Ali, S., Variath, M.T., Zhu, S.J. (2013): Differential physiological, ultramorphological and metabolic responses of cotton cultivars under cadmium stress. – Chemosphere 93: 2593–2602.
- Davies, C. S., Nielsen, S. S., Nielsen, N. C. (1987): Flavor improvement of soybean preparations by genetic removal of lipoxygenase-2. – J. Am. Oil Chem. Soc 64: 1428-1433.
- De Queiroz,, E.K.R., Waissmann, W. (2006) : Occupational exposure and effects on the male reproductive system. – Cad. Saude Publica 22: 485–493.
- De Kato, N., Krämer, U., Smith, R.D., Raskins I. (2000): The role of root exudates in nickel hyperaccumulation and tolerance in accumulator and nonaccumulator species of Thlaspi. In: Terry N, Banuelos G, eds. Phytoremediation of contaminated soil and water. – CRC Press LL: 189-200
- Devi, R., Munjral, N., Gupta, A. K., Kaur, N. (2007): Cadmium induced changes in

carbohydrate status and enzymes of carbohydrate metabolism, glycolysis and pentose phosphate pathway in pea..- Environ. Exp. Bot. 61: 167-174.

- Dewdy, R.H., Ham, G.E. (1997): Soybean growth and elemental content as influenced by soil amendments of sewage sludge and heavy metals: seedling studies. – Agron.J 69: 300–303.
- Dhingra, H.R., Priefer, U.R. (2006): Impact of cadmium on structural and functional aspect of pea (*Pisum sativum* L.) root nodules.J. – Plant Biol 33: 207.
- Dias, M. C., Monteiro, C., Moutinho-Pereira, J., Correia, C., Gonçalves, B., Santos, C. (2013): Cadmium toxicity affects photosynthesis and plant growth at different levels. – ActaPhysiol Plant 35: 1281-1289.
- Diaw, N.F. (2002) : utilisation des inoculums de rhizobium pour la culture du haricot (*Phaseolus vulgaris*) au Sénégal. – Thèse de doctorat. Université Cheikh Anta Diop. Dakar. : 97.
- Dietz, K.J. (2005): Plant thiol enzymes and thiol homeostasis in relation to thiol-dependent redox regulation and oxidative stress. In " Antioxidants and reactive oxygen species in plants"
- Dietz, K.J., Baier, M., Krämer, U. (1999): Free radical and reactive oxygen species as mediators of heavy metals toxicity in plants. In: Prasad MNV, Hagemeyer J, eds. Heavy metal stress in plants: from molecules to ecosystems. – Berlin: Springer-Verlag. : 73-97
- Dische, Z. (1962): Color Reactions of Hexoses. – In: Whistler, R. L., Wolfrom, M. L. (eds.) Methods in Carbohydrate Chemistry. Vol. 1. Academic Press, New York, pp. 488-490.
- Domınguez, M.T., Maranon,T., Murillo, J .M., Redondo-Gomez ,S. (2011) : Response of Holm oak (*Quercus ilex* subsp. ballota) and mastic shrub (*Pistacia lentiscus* L.) seedlings to high concentrations of Cd and Tl in the rhizosphere. – Chemosphere 83: 1166–1174.
- Drazic, G., Mihailovic, N. (2005): Modification of cadmium toxicity in soybean seedlings by salicylic acid. – Plant Sci. 168: 511–517.
- Dwivedi, S.L., Sahrawat, K.L., Upadhyaya, H.D., Mengoni, A., Galardini, M., Bazzicalupo, M. (2015): Advances in host plant and rhizobium genomics to enhance symbiotic nitrogen fixation in grain legumes. – Adv. Agron. 129: 1-116
- Escudey, M., Forster, J. E., Becerra, J. P., Quinteros, M., Torres, J., Arancibia, N., Galindo, G., Chang. A. C. (2007): Disposal of domestic sludge and sludge ash on volcanic soils. – J. Hazard. Mater. 139: 550-555.
- Evert, R.F. (2006): Structure and development of the plant body—an overview. In: Esau's Plant Anatomy. –John Wiley & Sons, Hoboken, NJ: 1–13.

- Faller, P., Kienzler, K., Krieger-Liszkay, A. (2005): Mechanism of Cd^{2+} toxicity: Cd^{2+} inhibits photoactivation of photosystem II by competitive binding to the essential Ca^{2+} site – Biochim Biophys Acta 1706: 158–164.
- FAOSTAT. (2017): Agricultural production, crop primary database. – Food and Agricultural Organization of the United Nations, http://www.fao.org/faostat/fr/#data
- Fattahi, B., Arzani, K., Souri, M. K., Barzegar, M. (2019): Effects of cadmium and lead on seed germination, morphological traits, and essential oil composition of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). – Industrial Crops & Products 138: 111584.
- Fernandez, R., Bertrand, A., Reis, R., Mourato ,M. P., Martins, L.L., Gonzalez, A.(2013): Growth and physiological responses to cadmium stress of two populations of *Dittrichia viscosa* (L.) Greuter. J – Hazard Mater 244-245: 555–562.
- Ferreira, V., Fernandes, F., Pinto-Carnide,O., Valentão, P., Falco,V., Pedro Martín, J., Ortiz, J.M., Arroyo-García, R., Andrade, P.B. , Castro, I. (2016): Identification of *Vitis vinifera* L. grape berry skin color mutants and polyphenolic profile. – Food Chemistry 194:117–127
- Fresneau, C., Ghashghaie, J., Cornic, G. (2007): Drought effect on nitrate reductase and sucrose phosphate synthase activities in wheat (*Triticum durum* L.): role of leaf internal CO2. – Journal of Experimental Botany 58: 2983-2992.
- Fuhrer, J. (1982): Early effects of excess cadmium uptake in *Phaseolus vulgaris*. – Plant, Celland Environm. 5: 263-270.
- Fukuda, H. (2004): Signals that control plant vascular cell differentiation. – Nature Reviews Molecular Cell Biology 5: 379-391.
- Gaillard ,S .,Jacquet, H., Vavasseur, A., Leon-hardt ,N., Forestier, C. (2008): AtMRP6/AtABCC6, an ATP binding cassette transporter gene expressed during early stepsof seedling development and up regulated by cadmium in *Arabidopsis thaliana*. – Bmc plant Biol. 8: 22.
- Girling, C.A., Peterson, P.J. (1981): The significance of the cadmium species in uptake and metabolism of cadmium in crop plants. – J Plant Nutr 3: 707-720
- Glinska, S., Bartczak, M., Oleksiak, S., Wolska, A., Gabara, B., Posmyk, M.M., Janas, K.M. (2007): Effects of anthocyanin-rich extract from red cabbage leaves on meristematic cells of *Allium cepa* L. roots treated with heavy metals. – Ecotoxicol. Environ. Saf. 68: 343–350.
- Gomes, M.P., de Sae Melo Marques, T.C.L.L., de Oliveira Goncalves Nogueira, M., de Castro, E.M., Soares, A.M.(2011) : Ecophysiological and anatomical changes due to uptake and

accumulation of heavy metal in *Brachiaria decumbens*. – Sci. Agric. 68: 566–573.

- Goncalves, J. F., Nicoloso, F. T., Becker ,A. G., Pereira, L. B., Tabaldi, L. A., Cargnelutti, D., de Pelegrin, C. M .G. , Dressler, V. L., da Rocha, J. B. T., Schetinger, M .R .C . (2009): Photosynthetic pigments content,-aminolevulinic acid dehydratase and acid phosphatase activities and mineral nutrients concentration – in Cd-exposed *Cucumis sativus* L. Biologia 64: 310–318.
- Gouia, H., Suzuki, A., Brulfert, J., Gharbal, M. H.(2003): Effect of cadmium on the co-ordination of nitrogen and carbon metabolism in bean seedlings. – J Plant Physiol 160: 367–376.
- Grace, S. C., Logan, B. A. (2000): Energy dissipation and radical scavenging by the plant phenyl propanoid pathway. – Philosophical Transactions of the Royal Society B 355: 149510.
- Gratao, P.L., Polle, A., Lea, P.J., Azedevo, R.A. (2005): Making the life of heavy metal stressed plants a little easier. Funct. – Plant Biol 32: 481–494.
- Gratao, P. L., Monteiro, C. C., Rossi, M. L., Martinelli, A. P., Peres, L. E. P., Medici, L. O., Lea, P. J., Azevedo, R. A. (2009): Differential ultrastructural changes in tomato hormonal mutants exposed to cadmium. – Environ Exp Bot 67: 387-394.
- Guerrero-Campo, J., Palacio, S., Perez-Rontome, C., Montserrat- Martı, G. (2006): Effect of root system morphology on rootsprouting and shoot-rooting abilities in 123 plant species from eroded lands in north-east Spain. – Ann Bot. 98: 439– 447.
- Guo, H., Hong, C., Chen, X., Xu, Y., Liu, Y., Jiang, D. (2016): Different growth and physiological responses to cadmium of the three Miscanthus species. – PLoS One 11: 0153475.
- Guo, H., Hong, C., Chen, X., Xu, Y., Liu, Y., Jiang, D., Zheng, B. (2016): Different growth and physiological responses to cadmium of the three Miscanthus species. – PLoS One 11: 1–16.
- Guo, W.J., Meetam, M., and Goldsbrough, P.B. (2008): Examining the specific contributions of individual *Arabidopsis metallothioneins* to copper distribution and metal tolerance. –Plant Physiol 146:1697-1706.
- Gupta, D. K., Pena, L. B., Romero-Puertas, M. C., Hernández, A., Inouhe, M., Sandalio, L. M. (2017): NADPH oxidases differentially regulate ROS metabolism and nutrient uptake under cadmium toxicity. – Plant Cell Environ 40: 509-526.
- Hall, J.L. (2002): Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. –J. Exp. Bot. 366: 1-11.
- Hamadach, A. (2003) : La féverole, Inst. Techn.Gr. – cult (T.T.G.C): 13.
- Harborne, J.B. and Williams, C.A. (2000): Advances in flavonoids research since 1992. Phytochemistry, 55: 481–504.

- Harrington, C.F., Roberts, D.J., Nickless, G. (1996): The effect of cadmium, zinc and copper on growth, tolerance index, metal uptake, and production of malic acid, in two strains of the grass *Festuca rubra*. – Canadian Journal of Botany. 74: 1742-1752.
- Hart, J.J., Welch, R.M., Norvell, W.A., Sullivan, L.A. et Kochian, L.V. (1998): Characterization of cadmium binding, uptake, and translocation in intact seedlings of bread and durum wheat cultivars. : Plant Physiol 116: 1413-1420.
- Hasan, S.A., Hayat, S., Ali, B., Ahmad, A. (2007): 28-homobrassinolide protects chickpea (*Cicer arietinum*) from cadmium toxicity by stimulating antioxidant. Environ. – Pollut. 151: 60–66.
- Hasenstein, K.H., Evans, M.L., Stinemetz, C.L., Moore, R., Fondren, W.M., Koon, E.C., Higby, M.A., Smucker, A.J. (1988): Comparative effectiveness of metal ions in inducing curvature of primary roots of *Zea mays*. –Plant Physiol. 86: 885-889
- Heller R., Esnault R., Lance C. (2000) : *Physiologie végétale*, t. 2.Développement.- Dunod, , 6e éd., Paris,366 p : 4.
- He, Z.L., Yang, X.E., Stoffella, P.J., (2005): Trace elements in agro-ecosystems and impacts on the environment. - J Trace Elem Med Biol 19: 125- 140
- He, S. Y., Yang, X. E., He, Z., Baligar, V. C. (2017): Morphological and physiological responses of plants to cadmium toxicity: a review. – Pedosphere 27: 421-438.
- Hernandez, L.L., Carpena-Ruiz, R., Garate, A. (1996): Alterations in the mineral nutrition of pea seedlings in exposed to cadmium. –J. Plant Nutr 19: 1581–1586.
- Hsu, F. H., Chang-Hung, C. (1992): Inhibitory effects of heavy metals on seed germination and seedling growth of Miscanthus species. – Bot. Bull. Acad. Sin. 33: 3342.
- Hubert, P. (1978): Recueil de fiche technique d'agriculture spéciale à usage des lycées agricoles à Madagacar. – Antananarivo, BDPA.
- ITGC. (1996): Fèves. Numéro special n° 29, El Harrach Alger, Algérie. 35
- INRS. (2013) : Fiche Toxicologique n°60 Cadmium et composés minéraux. Base de données - Fiches Toxicologiques: 19.
- Jiang, S. (2017): Response of phenolic metabolism to cadmium and phenanthrene and its influence on pollutant translocations in the mangrove plant *Aegiceras corniculatum* (L.) Blanco (Ac). – Ecotoxicol. Environ. Saf. 141: 290–297.
- Jianhua, Z., Lian, X., Shuanlai, Z., Juan, D., Shuanxi, Y. (2006): DNA lesion and Hprt mutant frequency in rat lymphocytes and V79 Chinese hamster lung cells exposed to cadmium. – J.

Occup. Health 48: 93–99.

- Jin, X., Yang, X., Islam, E., Liu, D., Mahmood, Q. (2008): Effects of cadmium on ultrastructure and antioxidative defense system in hyperaccumulator and non-hyperaccumulator ecotypes of Sedum alfredii Hance. – J. Hazard. Mater. 156: 387–397.
- John, R., Ahmad, P., Gadgil, K., Sharma, S. (2008): Effect of cadmium and lead on growth, biochemical parameters and uptake in *Lemna polyrrhiza* L. – Plant Soil Environ. 54: 262-270.
- Jumarie, C., Fortin, C., Houde, M., Campbell, P.G.C. et Denizeau, F. (2001): Cadmium uptake by Caco 2 cells: effects of complexation by chloride, glutathione and phytochelatins. –n170: 29-38.
- Kavita, S., Sareeta, N., Vyomendra, C., Prerna, S. (2019): Cadmium-Induced Anatomical Abnormalities in Plants (review). - Elsevier Inc. chapter 5: 111- 139.
- Kupper, H., Parames waran , A., Leitenmaier ,B., Trtılek ,M .,Setlık, I. (2007): Cadmium-induced inhibition of photosynthesis and long-term acclimation to cadmium stress in the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. –New Phytol 175: 655–674.
- Kabata-Pendias, A. (2000): Trace Elements in Soils and Plants. 3rd Ed. – CRC Press, Boca
- Keunen, E., Peshev, D., Van gronsveld, J., Van den ende, W. (2013): Plant sugars are crucial players in the oxidative challenge during abiotic stress: extending the traditional concept. – Plant, Cell & Environment 36: 1242-1255.
- Khaldi, R., Zkri, S., Maatougui, Ben Yassine ,A. (2002): L'économie des légumineuses alimentaires au Magrebet dans le monde. – Proceeding du 2eme séminaire du réseau REMAFEVE/REMALA « le devenir des légumineuses alimentaires dans le magreb », Hammamet, Tunisie : 100
- Kidd, P.S., Domínguez-Rodríguez, M.J., Díez, J., Monterroso, C. (2007): Bioavailability and plant accumulation of heavy metals and phosphorus in agricultural soils amended by long-term application of sewage sludge. –Chemosphere. 66: 1458–1467.
- Ko, K. S., Lee, P. K., Kong, I. C. (2012): Evaluation of the toxic effects of arsenite, chromate, cadmium, and copper using a battery of four bioassays. – Appl Microbiol Biotechnol 95: 1343-1350.
- Korte, F. (1983): Ecotoxicology of cadmium: general overview. - Ecotoxicology and Environmental Safety 7:3-8.
- Kovcik, J., Tomko, J., Backor, M., Repcak, M. (2006): *Matricaria chamomilla* is not a hyperaccumulator, but tolerant to cadmium stress. – Plant Growth Regul 50: 239-247.

- Kramer, U., Cotter-Howells, J.D., Charnock, J.M., Baker, A.J.M., Smith, J.A.C. (1996): Free histidine as a metal chelator in plants that accumulate nickel. – Nature 373: 635-638.
- Kranner, I., Colville, L. (2011): Metals and seeds: biochemical and molecular implications and their significance for seed germination. – Environ. Exp. Bot. 72: 93-105.
- Krzeslowska, M., Lenartowska, M., Samardakiewicz, S., Bilski, H., Wozny, A. (2010) :Lead deposited in the cell wall of *Funaria hygrometrica* protonemata is not stable - a remobilization can occur. – Environ Pollut 158:325–338
- Ku, H.M.,Tan, C.W.,Su, Y.S.,Chiu,C.Y.,Chen, C.T., Jan,FJ. (2012): The effect of water deficit and exces scoper on proline metabolism in *Nicotiana benthamiana*. – Biol. Plant56:337–343.
- Kumaran, A., Karunakaran, R. J. (2007a): Activity-guided isolation and identification of free radical scavenging components from an aqueous extract of *Coleus aromaticus*. – Food Chemistry 100: 356 361.
- Kumaran, A., Karunakaran, R. J. (2007b): In vitro antioxidant activities of methanol extracts of Phyllanhtus species from India. – Lebens-Wiss Technol 40: 344-352.
- Kumarpandit, T., Kumarnaik, S., Patra , P.K., Dey, N., Patra, P.K., Das, D.K. (2017): Influence of organic manure and lime on cadmium mobility in soil and uptake by Spinach (*Spinacia oleracea* L.). Commun – Soil Sci Plant Anal. 48: 357–369.
- Kupper, H., Jie Zhao, F., McGrath, S. (1999): Cellular compartmentation of zinc in leaves of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. –Plant Physiol. 119: 305–312.
- Kupper, H., Kupper, F., Spiller, M. (1996): Environmental relevance of heavy metal substituted chlorophylls using the example of water plants. – J. Exp. Bot. 47:259–266.
- Kupper, H., Parameswaran, A., Leitenmaier, B., Trtılek, M., Setlık, I. (2007): Cadmium-induced inhibition of photosynthesis and long-term acclimation to cadmium stress in the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. – New Phytol. 175: 655–674.
- Kuriakose, S.V., Prasad, M.N.V. (2008): Cadmium stress affects seed germination and seedling growth in *Sorghum bicolor* (L.) Moench by changing the activities of hydrolyzing enzymes. – Plant Growth Regul. 54: 143–156.
- Lang, F., Sarvari, E., Szigeti, Z., Fodor, F., Cseh, E. (1995): Effects of Heavy Metals on the Photosynthetic Apparatus in Cucumber. – In: Mathis, P. (ed.), Photosynthesis: From Light to Biosphere. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 533-536.
- Laumonnier, R. (1979) :Cultures légumières et maraîchères. –T III, Ed. TEC et DOC, Lavoisier : 124.

- Lecomote, B. (1997) : Etude du developpement embryonnaire in vivo et in vitro dans le genre Phaseolus L. – thèse de doctorat . Sci Agro. Gembloux. Belgique. Faculté universitaire des sciences agronomiques de Gembloux. : 186.
- Leita, L., De Nobili, M., Cesco, S. et Mondini, C. (1996): Analysis of intercellular cadmium forms in roots and leaves of bush bean. – J. Plant Nutr. 19: 527-533.
- Leopoldini, M., Russo, N. et Toscano, M. (2011): The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants.- Food Chemistry 125(2): 288-306.
- Levi-Minzi, R, G.F. Soldatini, et Riffaldi, R. (1976): Cadmium adsorption by soils. – J. Soil Sci. 27:10- 15.
- Li, U-M., Chaney, R.L., Schneiter, A.A. (1984): Effect of soil chloride level on cadmium concentration in sunflower kemels. – Plant and soil 167:275-280.
- Li, W., Khan, M. A., Yamaguchi, S., Kamiya, Y. (2005): Effects of heavy metals on seed germination and early seedling growth of *Arabidopsis thaliana*. – Plant Growth Regulation 46: 45-50.
- Li, X., Yang, Y., Jia, L., Chen, H., Wei, X. (2013): Zinc-induced oxidative damage, antioxidant enzyme response and proline metabolism in roots and leaves of wheat plants. – Ecotoxicol. Environ. Saf. 89: 150-157.
- Liao, Y.C., Chien, S.W.C., Wang, M.C., Shen,Y. Hung ,P.L., Das, B. (2006): Effect of transpiration on Pb uptake by lettuce and on water soluble low molecular weight organic acids in rhizosphere. Chemosphere 65:343–351
- Lichtenthaler, H. K., Wellburn, A. R. (1983): Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. – Biochem Society Transactions 11: 591-592.
- Lima, A.I.G., Pereira, S.I.A., De Almeida Paula Figueira, E.M., Caldeira, G.C.N., de Matos Caldeira, H.D.Q. (2006): Cadmium detoxification in roots of *Pisum sativum* seedlings: relationship between toxicity levels, thiol pool alterations and growth. – Environ Exp Bot. 55: 149–162.
- Lin, Y.C., Kao, C.H. (2007): Proline accumulation induced by excess nickel in detached rice leaves. – Biol. Plant 51: 351–354.

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

- Lions, J. (2004) : Étude hydrogéochimique de la mobilité de polluants inorganiques dans des sédiments de curage mis en dépôt : expérimentations, études in situ et modélisation, Thèse de doctorat. – École Nationale Supérieure des Mines de Paris. France : 248.
- Little, C.H.A., Wareing, P.F. (1981): Control of cambial activity and dormancy in *Picea sitchensis* by indol-3-ylacetic and abscisic acids. — Canadian Journal of Botany - Revue canadienne de Botanique59: 1480-1493.
- Liu, D., Kottke, I., Adam, D. (2007): Localization of cadmium in the root cells of *Allium cepa* by energy dispersive X-ray analysis. –Biol. Plant. 51: 363–366.
- Liu, H., Zhang, L. and Lu, S. (2012): Evaluation of antioxidant and immunity activities of quercetin in isoproterenol-treated rats. Molecules, 17: 4281–4291.
- Liu, X., Zhang, S., Shan, X., Zhu, Y.G. (2005): Toxicity of arsenate and arsenite on germination, seed growth and amylolytic activity of wheat. – Chemosphere 61:293–301
- Locquin, M., Langeron, M. (1978): Manuel de microscopie. – Ed. Masson, France.
- Loi, N. N., Sanzharova, N. I., Shchagina, N. I., Mironova, M. P. (2018): The effect of cadmium toxicity on the development of lettuce plants on contaminated sod-podzolic soil. – Russ. Agric. Sci. 44: 49-52.
- Lopes, G.K.B., Schulman, H.M., Hermes-Lima, M. (1999): Polyphenol tannic acid inhibits hydroxyl radical formation from Fenton reaction by complexing ferrous ions. – Biochem. Biophys. Acta 1472: 142–152.
- Lopez-Chuken, U.J., Young, S.D. (2005): Plant screening of halophyte species for cadmium phytoremediation. – Z Naturforsch, C 60: 236- 243
- Lu, Z.W., Zhang, Z., Su, Y., Liu, C.F., Shi, G.R. (2013): Cultivar variation in morphological response of peanut roots to cadmium stress and its relation to cadmium accumulation. – Ecotox En- viron Safe. 91: 147–155.
- Lunackova, L., Sottnıkova, A., Masarovicova, E., Lux, A., Stresko ,V. (2003): Comparison of cadmium effect on willow and poplar in response to different cultivation conditions. – Biol Plantarum. 47: 403–411.
- Lux, A., Martinka, M., Vaculık, M., White, P. J. (2011): Root responses to cadmium in the rhizosphere: a review. – J. Exp. Bot. 62: 21-37.
- Ma, J.F., Zheng, S.J., Hiradate, S., Matsumoto, H., (1997): Detoxifying aluminium with buckwheat. Nature 390, 569-570.
- Maksimovic, I., Kastori, R., Krstic, L., Lukovic, J. (2007): Steady presence of cadmium and

nickel affects root anatomy, accumulation and distribution of essential ions in maize seedlings. – Biologia Plantarum 51: 589-592.

- Manquián-Cerda, K., Cruces, E., Escudey, C., Zúñiga, G., Calderon, R. (2018): Interactive effects of aluminum and cadmium on phenolic compounds, antioxidant enzyme activity and oxidative stress in blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) plantlets cultivated in vitro. – Ecotoxicology and Environmental Safety 150: 320-326.
- Manquián-Cerda, K., Escudey, M., Zúñiga, G., Arancibia-Miranda, N., Molina, M., Cruces, E. (2016): Effect of cadmium on phenolic compounds, antioxidant enzyme activity and oxidative stress in blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) plantlets grown in vitro. – Ecotoxicol. Environ. Saf. 133: 316-326.
- Martin, B. (2006): Cereals and Pulses. -Plant resources of tropical Africa, – PROT . Volume 1,297:195-199. (ISBN 9789057821707)
- Martin, S.R., Llugany, M., Barceló, J. et al.: Cadmium exclusion a key factor in differential Cd resistance in Thlaspi arvense ecotypes. – Biol Plant 56: 729–734 (2012).
- Matthews, P., Marcellos H. (2003) : Faba bean, Agriculture factsheet. – Ed. NSW Agriculture : 12.
- McLaughlin, M. J., Whatmuff, M., Warne, M., Heemsbergen, D., Barry, G., Bell, M., Nash, D., Pritchardet, D. (2006): A field investigation of solubility and food chain accumulation of biosolid-cadmium across diverse soil types. – Environ Chem: 3428-432.
- Mclaughlin, M.J., Smolders, E., Degryse, F., Rietra, R. (2011): Uptake of metals from soil into vegetables. In: Swartjes, F.A. (Ed.), Dealing with Contaminated Sites: From TheoryTowards Practical Application. – Springer, Dordrecht: 325–367.
- McLaughlin, M.J., Williams, C.M.J., McKay, A., Kirkham, R., Gunton, J., Jackson, K.J., Thompson,R., Dowling, B., Partington ,D., Smart,M.K., iller, K.G .(1994): Effect of cultivar on uptake of acdmium by potato tubers. – Aust J Agric Res 45: 1483-1495
- Meharg, A.A., Macnair, M.R. (1992) :Genetic correlation between arsenate tolerance and the rate influx of arsenate and phosphate in *Holcus lamatus*. – Heredity 69: 336-341
- Mehta, S.K., Gaur, J.P. (1999): Heavy-metal-induced proline accumulation and its role in ameliorating metal toxicity in *Chlorella vulgaris*. – NewPhytol.143: 253–259.
- Melnichuk, Y.u.P., Lishko, A. K., Kalinin, F. L. (1982): Cd effect on free amino acid content in germs of pea seeds at early germination stages. – Fiziologiya biokhimiya kulturnyh Rasstenii 14: 383-385.
- Ménager, M.T., Garnier-Laplace, J., Goyffon, M. (2009) : Toxicologie nucléaire

environnementale et humaine. – Edition TEC et DOC lavoisier : 68

- Mensch, M. et Baize, D. (2004) : Contamination des sols et de nos aliments d'origine végétale par les éléments en trace, mesures pour réduire l'exposition. - Courrier de l'Environnement de l'INRA 52: 31-54.
- Mendoza-Cozatl, D.G., Jobe, T.O., Hauser, F., Schroeder, J.I. (2011): Long-distance transport, vacuolar sequestration, tolerance, and transcriptional responses induced by cadmium and arsenic. Curr. Opin. – Plant Biol. 14: 554–562.
- Mendoza-Cózatl, D.G., Jobe, T.O., Hauser, F., Schroeder, J.I. (2011): Long-distance transport, vacuolar sequestration and transcriptional responses induced by cadmium and arsenic. Curr. Opin. Plant Biol. 14 (5): 554–562.
- Merian, E. (1984): Introduction on environmental chemistry and global cycles of chromium, nickel, cobalt, beryllium, arsenic, cadmium and selenium, and their derivatives. -Toxicol. Environ. Chem. 8:9-38.
- Messiaen, C.M. & Seif, A.A. (2004): *Phaseolus vulgaris* L. (French bean). In: Grubben, G.H.J. & Denton, O.A.(Editors). Plant Resources of Tropical Africa 2. Vegetables.–PROTA Foundation, Wageningen, Netherlands / Backhuys Publishers,Leiden,Netherlands/CTA, Wageningen, Netherlands. : 415–419.
- Meyers, K. J., Watkins, C. B., Pritts, M. P., Liu, R. H. (2003): Antioxydant and antiproliferative activities of strawberries. – Journal of Agricultural and Food Chemistry 51: 6887-6892.
- Michalak, A. (2010): Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. – Pol. J. Environ. Stud.15: 523-530.
- Pitrat, M., et Foury, C. (2003) : Histoires de légumes : Des origines à l'orée du XXIe siècle, – INRA éditions. : 376
- Mishra, P., Dubey, R. S. (2013): Excess nickel modulates activities of carbohydrate metabolizing enzymes and induces accumulation of sugars by up regulating acid invertase and sucrose synthase in rice seedlings. – Biometals 26: 97-111.
- Mobin, M. (2014): Studies on the glyphosate-induced amino acid starvation and addition of precursors on caffeic acid accumulation and profiles in adventitious roots of *Echinacea purpurea* (L.) Moench. – Plant Cell, Tissue Organ Cult. (PCTOC). 120: 291–301.
- Mole, S., Waterman, P. G. (1987): A critical analysis of techniques for measuring tannins in ecological studies. II. Techniques for biochemically defining tannins. – Oecologia 72: 148-156.
- Molnarova, M., Fargasova, A. (2012): Relationship between various physiological and

biochemical parameters activated by cadmium in *Sinapisalba* L. and *Hordeum vulgare* L. – Ecological Engineering 49: 62.

- Mongkhonsin, B., Nakbanpote, W., Hokura, A., Nuengchamnon, N., Maneechai, S. (2016): Phenolic compounds responding to zinc and/or cadmium treatments in *Gynura pseudochina* (L.) DC. Extracts and biomass. – Plant Physiol. Biochem. 109: 549-560.
- Monteiro, C., Santos, C., Pinho, S., Oliveira, H., Pedrosa, T. (2012): Cadmium-induced cyto- and genotoxicity are organ-dependent in lettuce. Chem. Res. – Toxicol. 25, 1423–1434.
- Moral, R., Palacios, G., Gomez, I., Navarro-Pedro, J, et Mataix, J. (1994): Distribution and accumulation of heavy metals (Cd, Ni and Cr) in tomato plant. – Freesenius Environ. Bull 3: 395-399.
- Morel, J.L., Mench, M., et Guckert, A.(1986) : Measurement of Pb2., Cu2 ., Cd2 • binding with mucilage exsudates from maize (*Zea mays* L.) roots. – Biol. Fertil. Soils 2:29-34.
- Morel, M., Crouzet, J., Gravot, A., Auroy, P., Leonhardt, N., Vavasseur, A., and Richaud, P. (2009): AtHMA3, a P1B-ATPase allowing Cd/Zn/Co/Pb vacuolar storage in Arabidopsis. – Plant Physiol 149: 894-904.
- Mourato, M., Reis, R., Martins, L.L. (2012): Characterization of plant antioxidative system in response to abiotic stresses: a focus on heavy metal toxicity. -In: Montanaro, G., Dichio, B. (Eds.), Advances in Selected Plant Physiology Aspects. -In Tech, Vienna, Austria: 23–44.
- Munzuroglu, O., Geckil, H. (2002): Effects of metals on seed germination, root elongation, and coleoptile and hypocotyl growth in *Triticuma estivum* and *Cucumis sativus*. – Bull. Environ. Contam. Toxicol. 43: 203-213.
- Munzuroğlu, O., Zengin, F. K., Yahyagil, Z. (2008): The abscisic acid levels of wheat (*Triticuma estivum* L. Cv. Cakmak 79) seeds that were germinated under heavy metal (Hg^{++}, $Cd^{++,}$ Cu^{++}) stress. – J. Fac. Pharm. Gazi. 21: 1-7.
- Munzuroğlu, O., Zengin, F. K., Yahyagil, Z. (2008): The abscisic acid levels of wheat (*Triticuma estivum* L. Cv. Cakmak 79) seeds that were germinated under heavy metal (Hg++, Cd++, Cu++) stress. – J. Fac. Pharm. Gazi. 21: 1-7.
- Smirnoff, N. éd. – Blackwell Publishing Ltd. : 197-214.
- Nijveldt, R. J., Van Nood, E., Van Hoorn, D. E. C., Boelens, P. G., Van Norren, K., Van Leeuwen, P. A. M. (2001): Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. – American Society for Nutrition 74: 418-425.
- Nijveldt, R.J., van Nood, E., van Hoorn, D.E.C., Boelens, P.G., van Norren, K., van Leeuwen, P.A.M. (2001): Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential

applications. – American Society for Nutrition 74: 418–425.

- Nishizono, H., Ichikawa, H., Suziki, S., Ishii, F. (1987): The role of the root cell wall in the heavy metal tolerance of Athyrium yokoscense. – Plant Soil 101:15–20.
- Nookabkaew, S., Rangkadilok, N., Prachoom, N., Satayavivad, J. (2016): Concentrations of trace elements in organic fertilizers and animal manures and feeds and cadmium contamination in Herbal Tea (*Gynostemma pentaphyllum Makino*). – J Agric Food Chem. 64: 3119–3126.
- Oo, C. W., Kassima, M. J., Pizzib, A. (2009): Characterization and performance of *Rhizophora apiculata* mangrove polyflavonoid tannins in the adsorption of copper (II) and lead (II). – Industrial Crops and Products 30: 152-161.
- Organisation de coopération et de développement économiques (OCDE). (1994) : Monographie sur la réduction des risques n ° 5: Cadmium– Direction de l'environnement de l'OCDE. Paris, France.
- Organisation mondiale de la santé (OMS). (1992) : Critères d'hygiène du milieu 134 - Monographie du Programme international de cadmium sur la sécurité chimique (IPCS).
- Ovecka, M., Takac, T. (2014): Managing heavy metal toxicity stress in plants: biological and biotechnological tools. – Biotechnol. Adv. 32: 73-86.
- Ozgur, R., Uzilday, B., Sekmen, A. H., Turkan, I. (2013): Reactive oxygen species regulation and antioxidant defence in halophytes. – Functional Plant Biology 40: 832-847.
- Pagliano, C., Raviolo, M., Vecchia, F. D., Gabbrielli, R., Gonnelli, C., Rascio, N., Barbato, R., Rocca, N. L. (2006): Evidence for PSII donor-side damage and photoinhibition induced by cadmium treatment on rice (*Oryza sativa* L.). – J Photochem Photobiol B 84: 70–78.4
- Palma, J. M., Sandalio, L. M., Javier Corpas, F., Romero-Puertas, M. C., McCarthy, I., del Rio, L. A. (2002): Plant proteases protein degradation and oxidative stress: role of peroxisomes. – Plant Physiol. Biochem 40: 521-530.
- Pereira, L. S., Pereira de Araújob, R., Souza de Oliveirac, P., Dias da Silvac, L., Casaes Alvesa, P. A., Fernandesd, V. F., Gross, E. (2018): Cadmium induced changes in *Solidago chilensis* Meyen (Asteraceae) grown on organically fertilized soil with reference to mycorrhizae, metabolism, anatomy and ultrastructure. – Ecotoxicology and Environmental Safety 150: 75.
- Peron, J-Y. (2006) : Productions Légumières. – Ed. Lavoisier : 613.
- Perrot-Rechen Mann, C. (2010): Cellular responses to auxin : division versus expansion. - Cold Spring Harbor perspectives in biology 2 doi : 10.1101/cshperspect.a001446.
- Peshev, D., Van den Ende, W. (2013): Sugars as Antioxidants in Plants. – In: Tuteja, N., Gill,

S. S. (eds.) Crop Improvement under Adverse Conditions. Springer-Verlag, Berlin.

- Polle, A., Klein, T., Kettner, C. (2013): Impact of cadmium on young plants of *Populus euphratica* and P. × canescens, two poplar species that differ in stress tolerance. – New Forest 44: 13–22.
- Posmyk, M. M., Kontek, R., Janas, K. M. (2009): Antioxidant enzymes activity and phenolic compounds content in red cabbage seedlings exposed to copper stress. – Ecotoxicology and Environmental Safety 72: 596-602.
- Pourrut, B. (2008): Implication du stress oxydatif dans la toxicité du plomb sur une plante modèle, *Vicia faba*. – thèse de doctorat de l'université de Toulouse : 104.
- Punz, W.F. ET Sieghardt, H. (1993): The response of roots of herbaceous plant species to heavy metals. – Environ. Exp. Bot. 33: 85-98.
- Quariti, O., Govia, H., Ghorbal, M.H. (1997): Response of bean and tomato plants to cadmium, growth mineral nutrition and nitrate reduction. – Plant Physiol. Biochem 35: 347–354.
- Quiroga, G., Guerrro, C., Botella, A. M. A., Barcelo, A., Amaya, I., Meddina, M. I., Alonso, F. J., Forchetti, M. S., Tigier, H., Valpuesta, V. (2000) :A tomato peroxidase involved in the synthesis of lignin nad suberin. - Plant Physiol. 122 : 1119-1127.
- Rachef , S., Ouamer., Ouffroukha .(2005) : Inventaire des ravageurs de la fève en Algérie (identification et caractérisation). – INRA 16 : 36-41.
- Ramos, I., Esteban, E., Lucena, J J, Garate, A. (2002): Cadmium uptake and subcellular distribution in plants of Lactuca sp. Cd–Mn interaction. – Plant Sci 162: 761–767.
- Rascio, N., Navari-Izzo, F. (2011): Heavy metal hyperaccumulating plants: how and why do they do it? And what makes them so interesting? –Plant Sci (Shannon Ireland) 180:169–181
- Raton Kasai, Y., Kato, M., Aoyama, J., Hyodo, H. (1998): Ethylene production and increase in 1 aminocyclopropane-1 carboxylate oxidase activity during senescence of broccoli florets. – Acta Horticulturae 464: 153-157.
- Ribereau-Gayon, B. (1968) : Notion générale sur les composes phénoliques. In : Les composés phénoliques des végétaux. -Ed. Dunod: 1-27. Cotton, F.A. ET Wilkinson, G. Zinc, cadmium and mercury. Dans: Advanced inorganic chemistry. 3e édition. - Interscience Publishers. : 503 (1972).
- Rice-Evans, B., Catherine, A. N.J.M., Paganga, G. (1996): Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. – Free Radic. Biol. Med. 20: 933–956.

- Sabir, M., Hanafi, M.M., Rehman, M.Z., Saifullah, A.H.R., Hakeem, K.R., Aziz, T. (2014): Comparison of low molecular weight organic acids and ethylene diamine tetra acetic acid to enhance phytoextraction of heavy metals by maize (*Zea mays* L.). – Commun Soil Sci Plant Anal 45:42–52
- Sabir, M., Waraich, E.A., Hakeem, K.R., Ozturk, M., Ahmad, H.R., Shahid, M. (2015) :Phytoremediation: Mechanisms and adaptations. Soil Remediat Plants .– Article localization anatomie 4:85–105
- Sadana, U.S., Bijay, S. (1989): Effect of cadmium-zinc interaction on yield and cadmium and zinc content of maize (*Zea mays* L.). – Curr Sci 58: 194-196
- Saifullah, M.E., Qadir, M., de Caritat, P., Tack ,F.M.G, Du Laing, G., Zia ,M.H. (2009): EDTA assisted Pb phytoextraction. – Chemosphere 74:1279–1291
- Sakihama, Y., Yamasaki, H. (2002): Lipid peroxidation induces by phenolics in cinjunction with aluminium ions. – Biol. Plantarum 45: 249-254.
- Salt, D.E., Smith, R.D. et Raskin, I. (1998) : Phytoremediation. - Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 49 : 643-668.
- Sanchez-Martin, M.J., et Sanchez-Camazano, M. (1993): Adsorption and mobility as a consequence of sewage sludge disposaI. – J. Environ. QuaI. 22, 4:732-737.
- Sandalio, L., Dalurzo, H. C., Gomez, M., Romero-Puertas, M., del Rıo, L. A. (2001): Cadmium induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. – J Exp Bot 52: 2115–2126.
- Sanità di Toppi, L., Gabbrielli, R. (1999): Response to cadmium in higher plants. – Environ Exp Bot 41: 105-130
- Sauvé, S., Manna, S., Turmel, M.C., Roy, A.G., Courchesne, F. (2003): Solid-solution partitioning of Cd, Cu, Ni, Pb, and Zn in the organic horizons of a forest soil. – Environ Sci Technol 37: 5191-5196
- Sauvé, S., Norvell, W.A., McBride, M. et Hendershot ,W.(2003) : Speciation and complexation of cadmium in extracted soil solutions. – Environ. Sci. Technol. 34: 291-296.
- Savvas, D., Ntatsi, D., Moiras, N., Tsakalidis, A., Ropokis, A., Liopa- Tsakalidi, A. (2012): Impact of grafting and rootstock on the responses of cucumber to heavy metal stress. – Acta Horticul. 960: 49 56.
- Schafer, F. Q., Wang, H. P., Kelly, E. E. (2002): Comparing beta-carotene, vitamin E and nitric oxide as membrane antioxidants. – The Journal of Biological Chemistry 383: 671-681.

- Seregin, I. V., Ivanov, V. B. (2001): Physiological aspects of cadmium and lead toxic effects on higher plants. – Russ. J. Plant Physiol 48: 523-544.
- Seregin, I.V., Kozhevnikova, A.D. (2005): Distribution of cadmium, lead, nickel, and strontium in imbibing Maize Caryopses. – Russ J Plant Physiol 52(4): 565–569
- Seregin, I.V., Shpigun, L.K., Ivanov, V.B. (2004): Distribution and toxic effects of cadmium and lead on maize roots. – Russ. J. Plant Physiol. 51: 525–533.
- Serpaud, B., Al-Shukry, M., Casteigneau, M., Matejka, G. (1994) : Adsorption des métaux lourds (Cu, Zn, Cd et Pb) par les sédiments superficiels d'un cours d'eau: rôle du pH, de la température et de la composition du sédiment. – Revues des sciences de l'eau, 7 : 343-365.
- Seth, C.S., Misra, V., Chauhan, L.K.S., Singh, R.R.(2008): Genotoxicity of cadmium on root meristem cells of *Allium cepa*: cytogenetic and Comet assay approach. Ecotoxicol. – Environ. Saf. 71: 711–716.
- Shahid, M., Pinelli, E., Pourrut, B., Dumat, C. (2014d): Effect of organic ligands on lead-induced oxidative damage and enhanced antioxidant defense in the leaves of *Vicia faba* plants. – J Geochem Explor 144:282–289
- Shahid, M., Dumat, C., Silvestre, J., Pinelli, E. (2012c): Effect of fulvic acids on lead-induced oxidative stress to metal sensitive *Vicia faba* L. – plant. Biol Fertil Soils 48:689–697
- Sharma, S.S., Dietz, K.J. (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
- Sharma, V.K., Sohn, M. (2009): Aquatic arsenic: toxicity, speciation, transformations, and remediation. – Environ Int 35:743–759
- Shri, M., Kumar, S., Chakrabarty, D. (2009) :Effect of arsenic on growth, oxidative stress, and antioxidant system in rice seedlings. – Ecotoxicol Environ Saf 72:1102–1110
- Siddiqui, S., Meghvansi, M., Wani , M., Jabee, F.(2009) : Evaluating cadmium toxicity in the root meristem of *Pisum sativum* L. – Acta Physiol Plantarum 31: 531–536.
- Siedlecka, A., Krupa, Z. (1996): Interaction between cadmium and iron and its effect on photo synthetic capacity of primary leaves of *Phaseolus vulgaris*. - Plant Physiol. Biochem 34: 833–841.
- Simonneau, D., Crosson, Ph., Taupin, P., Bouttet, D, Chaillet, I. (2012) : Bulletin Vigicultures : mode opératoire observations féveroles parcelles fixes. n°5 : 14p.
- Singh, P. et Shah, K. (2014): Evidences for reduced metal-uptake and membrane injury upon application of nitric oxide donor in cadmium stressed rice seedlings. –Plant Physiol. Biochem.

83: 180–184.

- Singh, S., Parihar, P., Singh, R., Singh, V.P., Prasad, S.M. (2016): Heavy metal tolerance in plants: role of transcriptomics, proteomics, metabolomics, and ionomics review Front. – Plant Sci
- Sipos, G., Solti, A., Czech, V., Vashegyi, I., Toth, B., Cseh, E., Fodor, F. (2013): Heavy metal accumulation and tolerance of energy grass (*Elymus elongatus* subsp. *ponticus* cv. Szarvasi-1) grown in hydroponic culture. – Plant Physiol Biochem. 68: 96–103
- Slatyer, RO. (1967). Plant-water Relationships. London: Academic Press.
- Smeets, K., Cuypers, A., Lambrechts, A., Semane, B., Hoet, P., Van Laere, A., Vangronsveld, J. (2005): Induction of oxidative stress and antioxidative mechanisms in *Phaseolus vulgaris* after Cd application. – Plant Physiology and Biochemistry 43: 437-444.
- SOGREAH. (2007) : Bilan des flux de contaminants entrant sur les sols agricoles de France métropolitaine. Bilan qualitatif de la contamination par les éléments traces métalliques et les composés traces organiques et application quantitative pour les éléments traces métalliques – Rapport final. ADEME. Angers: 330.
- Solomonson, L.P., Barber, M.J. (1990): Assimilatory nitrate reductase: functional properties and regulation. Annu. Rev. Plant Physiol. – Plant Mol. Biol. 4:225–253.
- Solti, A., Sarvari, E., Toth, B., Basa, B., Levai, L., Fodor, F. (2011) : Cd affects the translocation of some metals either Fe-like or Ca-like way in poplar. – Plant Physiol Biochem. 49: 494–498.
- Somashekaraiah, B. V., Padmaja, K., Prasad, A. R. K. (1992): Phytotoxicity of cadmium ions on germinating seedlings of mung bean (*Phaseolus vulgaris*): Involvement of lipid peroxides in chlorphyll degradation. – Physiol Plant. 85: 85-89.
- Stobart, A. K., Griffiths, W. T., Ameen-Bukhari, I., Sherwood, R. P. (1985): The effect of Cd^{2+} on the biosynthesis of chlorophyll in leaves of barley. – Physiol. Plant. 63: 293-298.
- Stoeva, N., Berova, M., Zlatev, Z. (2005): Effect of arsenic on some physiological parameters in bean plants. – Biol. Plant 49 (2): 293–296.
- Štolfa, I., Pfeiffer, T.Ž., Špoljarić, D., Teklić, T., Lončarić, Z., Lončarić, Z. (2015): Heavy metal-induced oxidative stress in plants: response of the antioxidative system. In: Gupta, D., Palma, J., Corpas, F., Francisco, J. (Eds.), Reactive Oxygen Species and Oxidative Damage in Plants under Stress. – Springer.
- Stolt, J.P., Sneller, F.E.C., Bryngelsson, T., Lundborg, T. et Schat, H. (2003): Phytochelatins and cadmium accumulation in wheat. – (QYLURQ_(S_%RW) 49: 21-28.

- Strizhov, N., Abraham, E., Okresz, L., Blickling, S., Zilberstein, A., Schell, J., Koncz, C., Szabados, L. (1997): Differential expression of two P5CS genes controlling proline accumulation during salt stress requires ABA and is regulated by ABA1, ABI1andAXR2in Arabidopsis. – PlantJ.12:557–569.
- Sulkowski, W.J., Rydzewski, B., Miarzynska, M. (2000): Smell impairment in workers occupationally exposed to cadmium. – Acta Otolaryngol. 120: 316–318.
- Sun, H., Xia, N., Liu, Z., Kong, F., Wang, S. (2019): Removal of copper and cadmium ion from alkaline solution using chitosan-tannin functional paper materials as adsorbents. – Chemosphere 236: 124370.
- Sun, J., Wang, R.G., Zhang X, Yu,Y.C., Zhao, R., Li, Z. Y., Chen, S. L. (2013): Hydrogen sulfide alleviates cadmium toxicity through regulations of cadmium transport across the plasma and vacuolar membranes in *Populus euphratica* cells. – Plant Physiol Biochem. 65: 67–74.
- Swain, T., Hillis, W. E. (1959): The phenolics constituants of *Prunus domestica*-I. The quantitative analysis of phenolics constituents. – Journal of the Science of Food and Agriculture 10: 13.
- Szőllősi, R., Varga,I.S., Erdei , L., Mihalik, E. (2009): Cadmium-induced oxidative stress and antioxidative mechanisms in germinating Indian mustard (*Brassica juncea* L.) seeds.– Ecotoxicol Environ Saf 72: 1337-1342
- Taïbi, K ., Taïbi, F., Ait Abderrahima, L., Ennajahb, A.,Belkhodja, M., Mulet, J.M. (2016): Effect of salt stress on growth, chlorophyll content, lipid peroxidation and antioxidant defence systems in *Phaseolus vulgaris* L. - South African Journal of Botany 105 : 306–312
- Tamas, L., Huttova, J., Zigova, Z. (1997): Accumulation of stress protein in intracellular spaces of barley leaves induced by biotic and abiotic factors. – Biol. Plant. 39: 387-394.
- The World Bank. (1999): Cadmium. In Pollution Prevention and Abatement Handbook. Washington -D.C.:212–214
- Tripathi, B.N., Gaur, J.P. (2004): Relation ship between copper-and zinc-induced oxidative stress and proline accumulation in *Scenedesmus* sp. – Planta 219: 397–404.
- Tsai, P. J., McInstosh, J., Pearce, P., Camden, B., Jordan, B. R. (2002): Anthocyanin and antioxidant capacity in Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) extract. – Food Res. Int. 35: 351-356.
- Ueno, D., Yamaji, N., Kono, I., Huang, C.F., Ando, T., Yano, M., and Ma, J.F. (2010): Gene limiting cadmium accumulation in rice. – Proc Natl Acad Sci USA 107:16500-16505.
- Vaculík, M., Konlechner, C., Langer, I., Adlassnig, W., Puschenreiter, A., Hauser, L. M. T. (2012): Root anatomy and element distribution vary between two *Salix caprea* isolates with

different Cd accumulation capacities. – Environmental Pollution 163: 117-126.

- Van Assche, F., Clijsters, H. (1990): Effects of metals on enzyme activity in plants. – Plant Cell Environ. 13: 195-206.
- Van Schoonhoven, A. et Voysest, O. (1991): Common beans: research for improvement. – CIAT, Cali, Colombia and CAB International, Wallingford, United Kingdom: 7–54.
- Vazquez, M. D., Poschenrieder, C., Barcelo, J. (1992): Ultrastructural effects and localization of low cadmium concentrations in bean roots. – New Phytologist 120: 215-226.
- Verbruggen, N., Hermans, C., Schat, H. (2009): Molecular mechanisms of metal hyperaccumulation in plants. – New Phytol 181: 759-77.
- Vernay, P., Gauthier-Moussard, C., Hitmi, A. (2007): Interaction of bioaccumulation of heavy metal chromium with water relation, mineral nutrition and photosynthesis in developed leaves of *Lolium perenne* L. – Chem 68 (8): 1563–1575.
- Vezza, M. E., Llanes, A., Travaglia, C., Agostinia, E., Talanoa, M. A. (2018): Arsenic stress effects on root water absorption in soybean plants: physiological and morphological aspects. – Plant Physiology and Biochemistry 123: 8-17.
- Volland, S., Bayer, E., Baumgartner, V., Andosch, A., Lutz, C. (2014): Rescue of heavy metal effects on cell physiology of the algal model system Micrasterias by divalent ions. – J. Plant Physiol. 171: 154-163.
- Vollenweider, P., Cosio, C., G€unthardt-Goerg, M.S., Keller, C. (2006): Localization and effects of cadmium in leaves of a cadmium-tolerant willow (*Salix viminalis* L.). Part II microlocalization and cellular effects of cadmium. – Environ. Exp. Bot 58: 25–40.
- Vollmannova, A., Musilova, J., Toth, T., Arvay, J., Bystrick, J., Medvecky, M., Daniel, J. (2014): Phenolic compounds, antioxidant activity and Cu, Zn, Cd and Pb content in wild and cultivated cranberries and blue berries Intern. – J. Environ. Anal. Chem 94: 1445-1451.
- Wan, Y., Luo, S., Chen, J., Xiao, X., Chen, L., Liu, C., He, Y. (2012): Effect of endophyte-infection on growth parameters and Cdinduced phytotoxicity of Cd-hyperaccumulator *Solanum ni- grum* L.:- Chemosphere. 89: 743–750.
- Wang ,M., Zou, J. H., Duan, X. C, Jiang, W. S, Liu, D H.(2007): Cadmium accumulation and its effects on metal uptake in maize (*Zea mays* L.). – Bioresource Technol. 98: 82–88.
- Wang, H.C., Wu, J.S., Chia, J.C., Yang, C.C., Wu, Y.J., Juang, R.H. (2009): Phytochelatin synthase is regulated by protein phosphorylation at a threonine residue near its catalytic site. –J. Agric. Food Chem. 57: 7348–7355.

- Wang, W., Keturi, P. H. (1990): Comparative seed germination tests using ten plant species for toxicity assessment of metals engraving effluent sample. – Water, Air, Soil Pollut. 52: 369-376.
- Wei, S., Li, Y., Zhan, J., Wang, S., Zhu, J. (2012): Tolerant mechanisms of *Rorippa globosa* (Turcz.) Thell. hyperaccumulating Cd explored from root morphology. – Bioresource Technol. 118: 455–459.
- White, P.J. (2000): Calcium channels in higher plants. – BBA-Bio- membranes. 1465: 171–189.
- Wittman, R. et Hu, H. (2002): Cadmium exposure and nephropathy in a 28-year-old female metals worker. Environ. – Health Perspect. 110: 1261–1266.
- Xin, J., Huang, B., Yang, Z., Yuan, J., Zhang, Y. (2013) : Comparison of cadmium subcellular distribution in different organs of two water spinach (Ipomoea aquatic Forsk.) cultivars. – Plant Soil
- Xu, D., Chen, Z., Sun, K., Yan, D., Kang, M., Zhao, Y. (2013): Effect of cadmium on the physiological parameters and the subcellular cadmium localization in the potato (*Solanum tuberosum L.*). – Ecotoxicol. Environ. Saf. 97: 147–153.
- Xue, Z. C., Gao, H. Y., Zhang, L. T. (2013): Effects of cadmium on growth, photosynthetic rate and chlorophyll content in leaves of soybean seedlings. – Biol Plant 57: 587-590.
- Yanai, J., Zhao, F.J., McGrath, S.P., Kosaki, T. (2006): Effect of soil characteristics on Cd uptake by the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. –Environ Pollut 139: 167-175
- Yazdi, M., Kolahi, M., MohajelKazemi, E., GoldsonBarnaby, A. (2019): Study of the contamination rate and change in growth features of lettuce (*Lactuca sativa* Linn.) in response to cadmium and a survey of its phytochelatin synthase gene. – Ecotoxicology and Environmental Safety 180: 295-308.
- Yoann, V. (2018) : Elaboration d'un modèle de prédiction de la phytodisponibilité du Cadmium dans les sols agricoles : application à la contamination cadliée du blé dur. Biodiversité et écologie. – Université de Bordeaux. France.
- Younis, M. E., Tourky, S. M. N., Elsharkawy, S. E. A. (2018b): Symptomatic parameters of oxidative stress and antioxidant defense system in *Phaseolus vulgaris* L. in response to copper or cadmium stress. – South African Journal of Botany 117: 207-214.
- Younis, M. E., Tourky, S. M. N., Elsharkawy,S. E. A. (2018a): Element content, growth and metabolic changes in Cu- and Cd stressed *Phaseolus vulgaris* plants. – Journal of Plant and Environmental Research 3: 9.

- Zemanova, V., Pavlík, M., Pavlíkova, D., Kyjakova, P. (2015): Changes in the contents of amino acids and the profile of fatty acids in response to cadmium contamination in spinach. – Plant Soil Environ 61: 285-290.
- Zhou, H., Zeng, M., Zhou, X., Liao, B.H., Peng, P.Q., Hu, M., Zhu, W., Wu, Y.J., Zou, Z.J. (2015): Heavy metal translocation and accumulation in iron plaques and plant tissues for 32 hybrid rice (*Oryza sativa L.*) cultivars. – Plant Soil 386: 317–329.
- Zhu, Y.L., Pilon-Smits, E.A.H., Jouanin, L., Terry, N. (1999): Overexpression of Glutathione Synthetase in Indian Mustard Enhances Cadmium Accumulation and Tolerance. –Plant physiol 119: 73-79
- Zorrig ,W., Rouached, A., Shahzad, Z., Abdelly, C., Davidian, J.C., Berthomieu ,P. (2010): Identification of three relationships linking cadmium accumulation to cadmium tolerance and zinc and citrate accumulation in lettuce. –J Plant Physiol 167: 1239-1247.
- Zouari, M., Ben Ahmed, Ch., Zorrig, W., Elloumi, N., Rabhi, M., Delmail, D., Ben Rouina, B., Labrousse, P., Ben Abdallaha, F. (2016): Exogenous proline mediates alleviation of cadmium stress by promoting photosynthetic activity, water status and antioxidative enzymes activities of young date palm (*Phoenix dactylifera* L.). – Ecotoxicology and Environmental Safety 128: 100-108.
- Zucca, E., Bertoletti, F., Wimmer, U., Ferrari, E., Mazzini, G., Khoronenkova, S., Grosse, N., van Loon, B., Dianov, G., Hubscher, U. (2013): Silencing of human DNA poly¬merase λ causes replication stress and is synthetically lethal with an impaired S phase checkpoint. Nucl-Acids Res. 41: 229–241.

ANNEXES

Annexe I : Courbes d'étalonnage pour le dosage des paramètres biochimiques

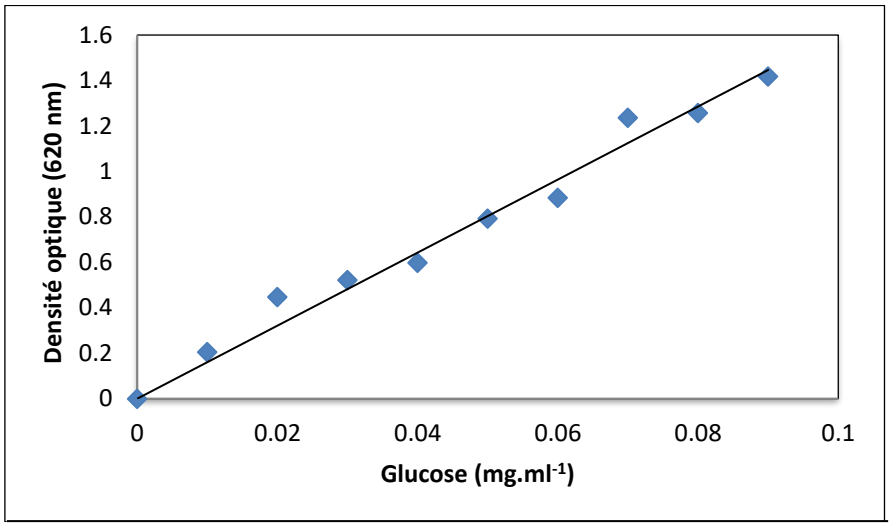


Fig.1 : Courbe d'étalonnage pour le dosage des sucres solubles

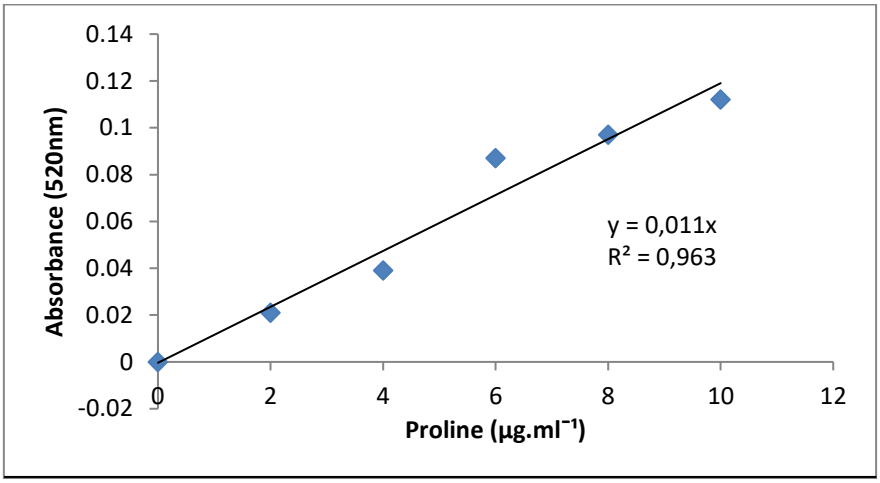


Fig.2 : Courbe d'étalonnage pour la proline

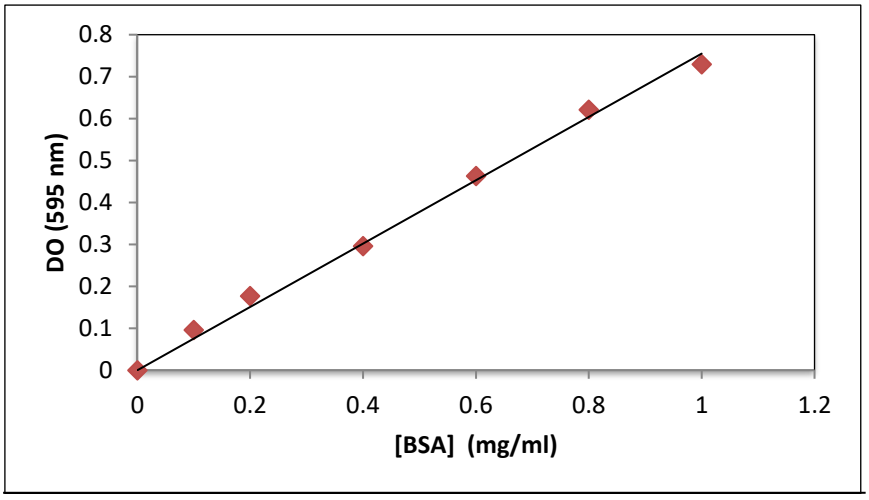


Fig.3 : Courbe d'étalonnage pour les protéines

Annexe II : Préparation des réactifs et solutions

Solutions pour le dosage des tanins

· SDS/TEA

Triéthanolamine (v/v) ……..…..… 5%

SDS (p/v) ……..…. 1%

pH ajusté à 9.4

· Solution BSA

BSA dissous dans le tampon acétate……..… 1mg/ml

· Tampon acétate

Acide acétique……...… 0.20M

NaCl ……..…. 170 mM

pH ajusté à 4.9

Annexe III. Courbes d'étalonnage pour le dosage des composés phénoliques

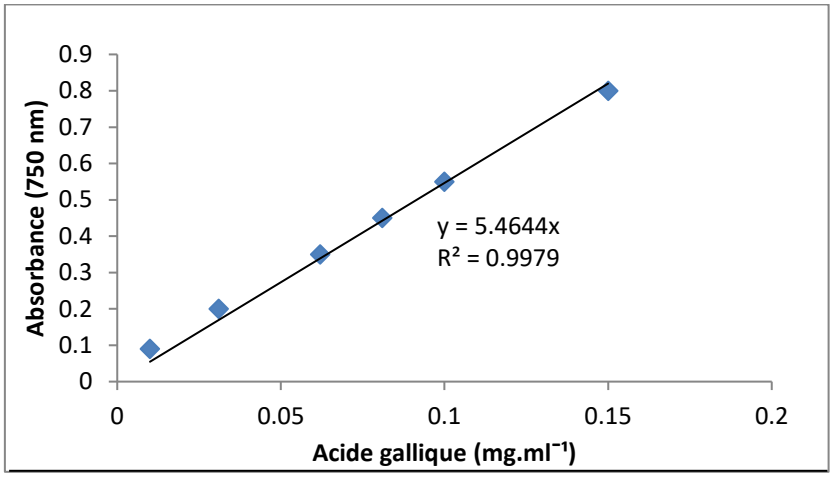


Fig.1 : Courbe d'étalonnage pour le dosage des polyphénols totaux

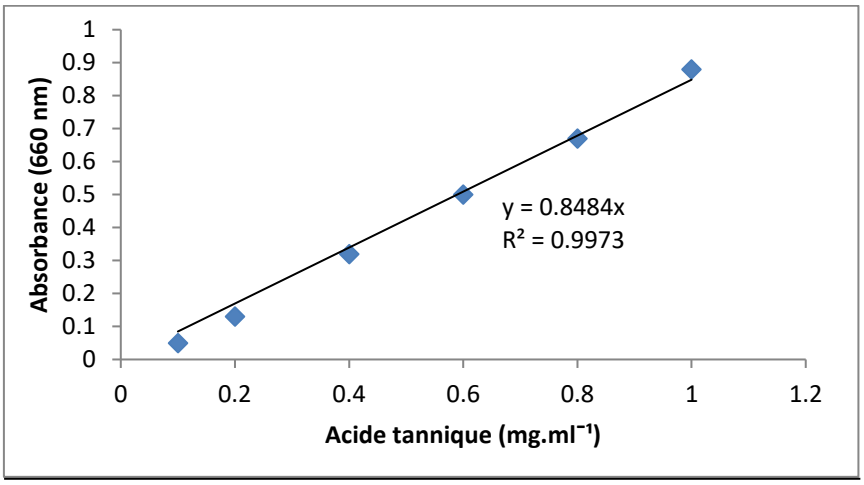


Fig. 2 : Courbe d'étalonnage pour le dosage des tanins hydrolysables

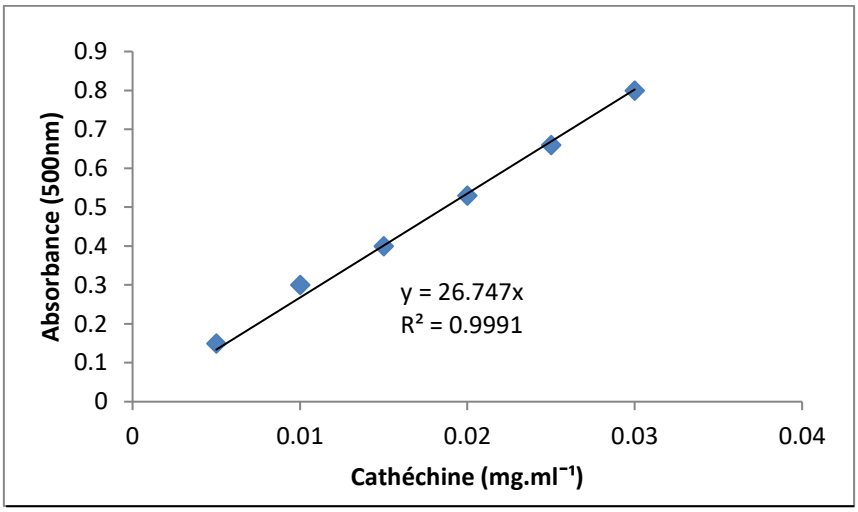


Fig. 3 : Courbe d'étalonnage pour le dosage des tanins condensés

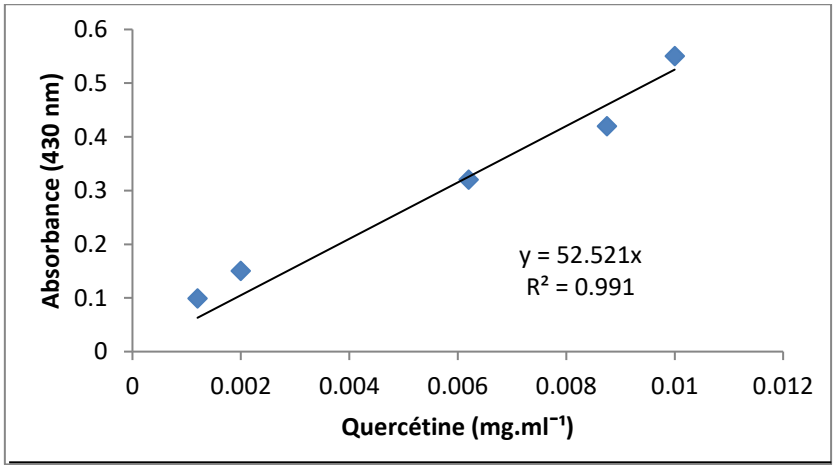


Fig.4 : Courbe d'étalonnage pour le dosage des flavonoïdes.

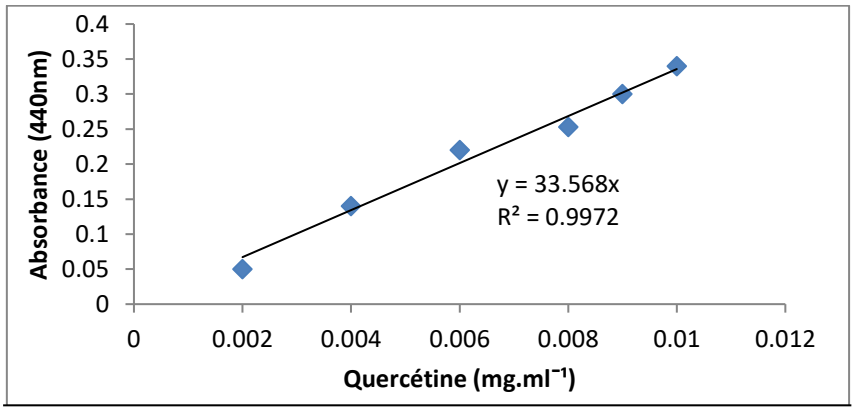


Fig.5 : Courbe d'étalonnage pour le dosage des flavonols

Annexe IV : Biosynthèse des composés phénoliques

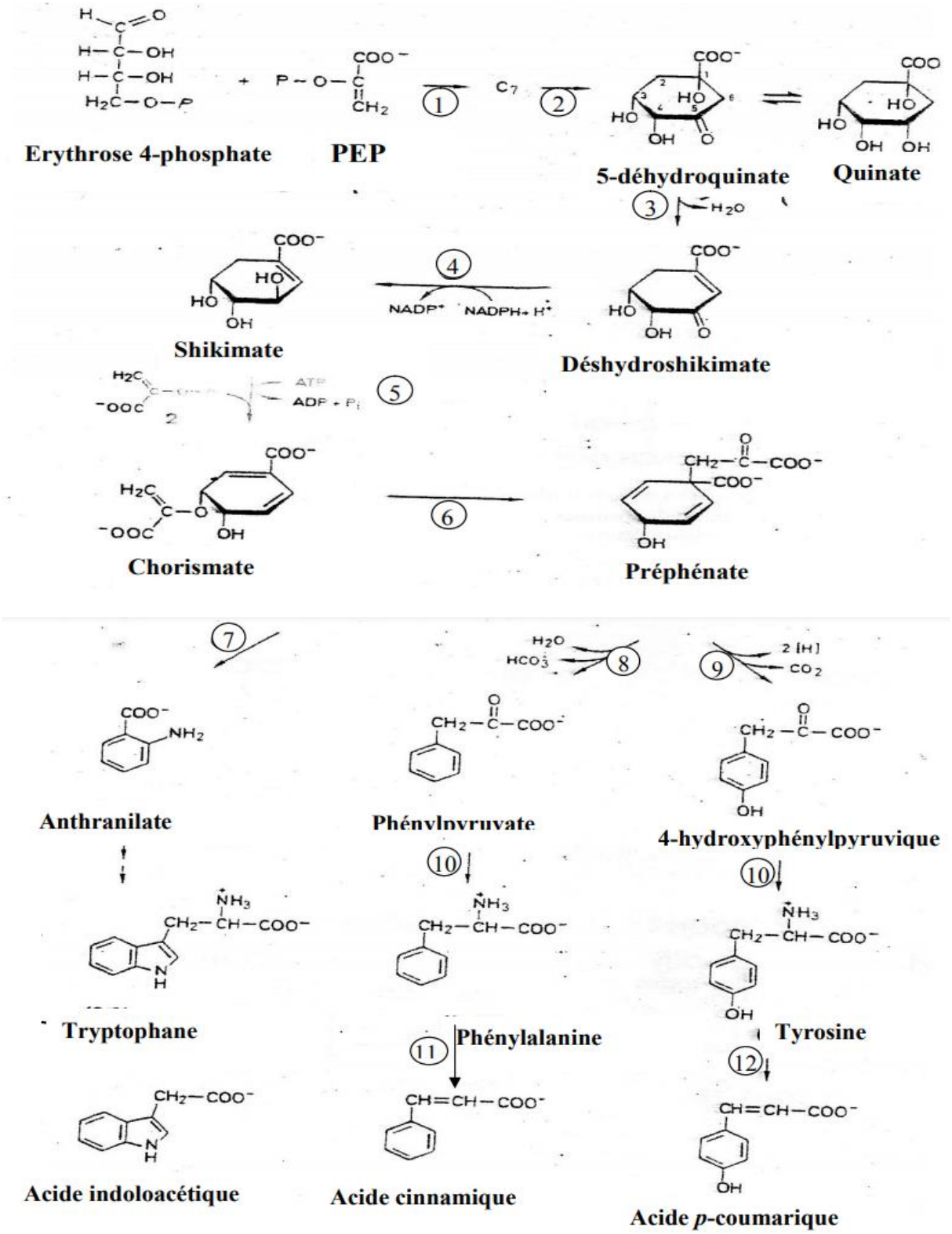


Figure 1 : Formation de composés phénoliques via la voie de l'acide shikimique
1- aldolase, 3-désoxy-D arabinoheptulosonate, 7- phosphate synthase ou DHAP synthase, 2-déshydroquinate synthase ; 3- déshydroquinate déshydratase ; 4-shikimate déshydrogenase ; 5-complexe shikimate kinase ; 6-chorismate kinase ; 7-anthralinate synthase ; 8-préphénate déshydratse ; 9-préphénate déshydrogénase ; 10-aminotransférases ; 11-phénylalanine ammonia-lyase ; 12- tyrosine ammonia-lyase (Bruneton, 1999).

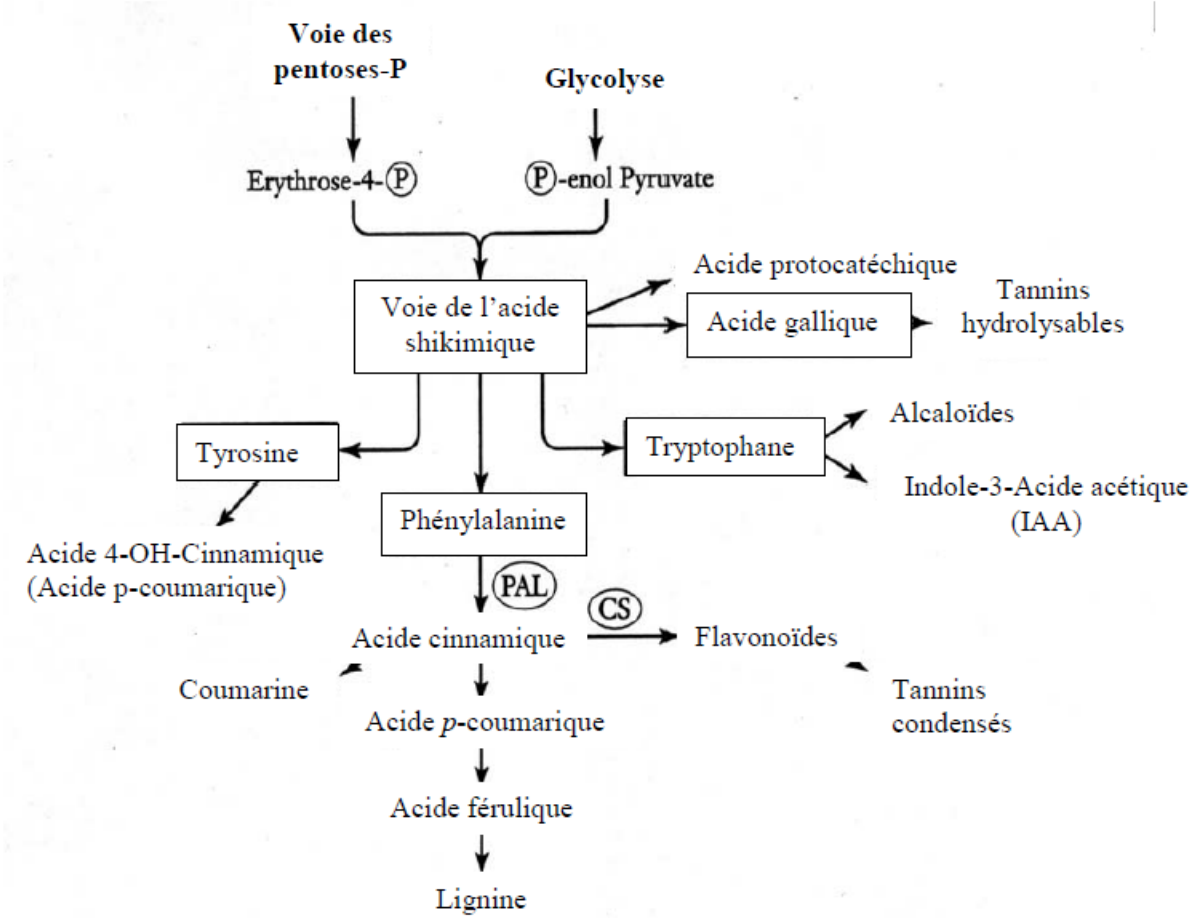


Figure 2 : Le rôle central de la voie de l'acide shikimique dans la synthèse de différents métabolites primaires et secondaires. PAL = phénylalanine ammonia lyase. CS= chalcone synthase (Kovácik *et al*.2006)

Annexe V : La production nationale du haricot et de la fève

Tableau 1. *La production nationale du haricot (FAOSTAT, 2017)*

Haricot frais				haricot sec		
Années	Superficie récoltée (ha)	Rendement (hg/ha)	Production (tonne)	Superficie récoltée (ha)	Rendement (hg/ha)	Production (tonne)
2008	8622	46533	40121	1040	5231	544
2009	8918	50567	45096	1616	7172	1159
2010	9599	55721	53487	1214	6960	845
2011	9197	59347	54581	1218	7824	953
2012	10707	56773	60787	1573	6510	1024
2013	11594	61870	71732	1427	9544	1362
2014	11456	69457	79570	1633	8224	1343
2015	11276	70515	79513	1788	7947	1421
2016	10700	73924	79099	1310	6679	875
2017	11434	85712	98003	1902	7781	1480

Tableau 2 : *La production nationale de la fève (FAOSTAT, 2017)*

Fève sèche			
Années	Superficie récoltée (ha)	Rendement (hg/ha)	Production (tonne)
2008	30688	7665	23521
2009	32278	11306	36495
2010	34210	10706	36625
2011	37090	10240	37982
2012	36835	10997	40507
2013	37668	11253	42386
2014	37499	11037	41389
2015	39977	11208	44807
2016	35813	10624	38048
2017	40361	11609	46856

Annexe VI :

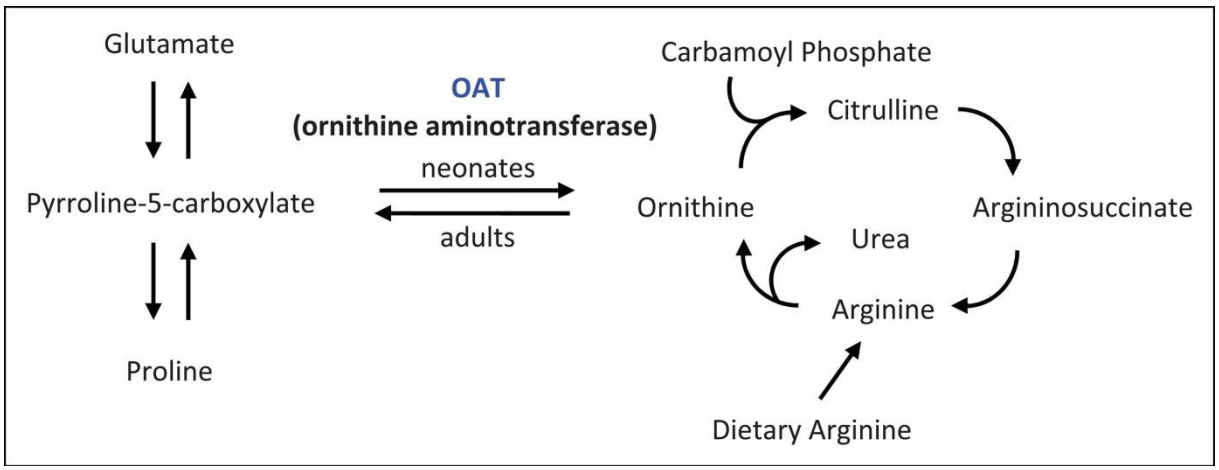


Figure 1 : Biosynthèse de la proline (Li *et al*.2013)

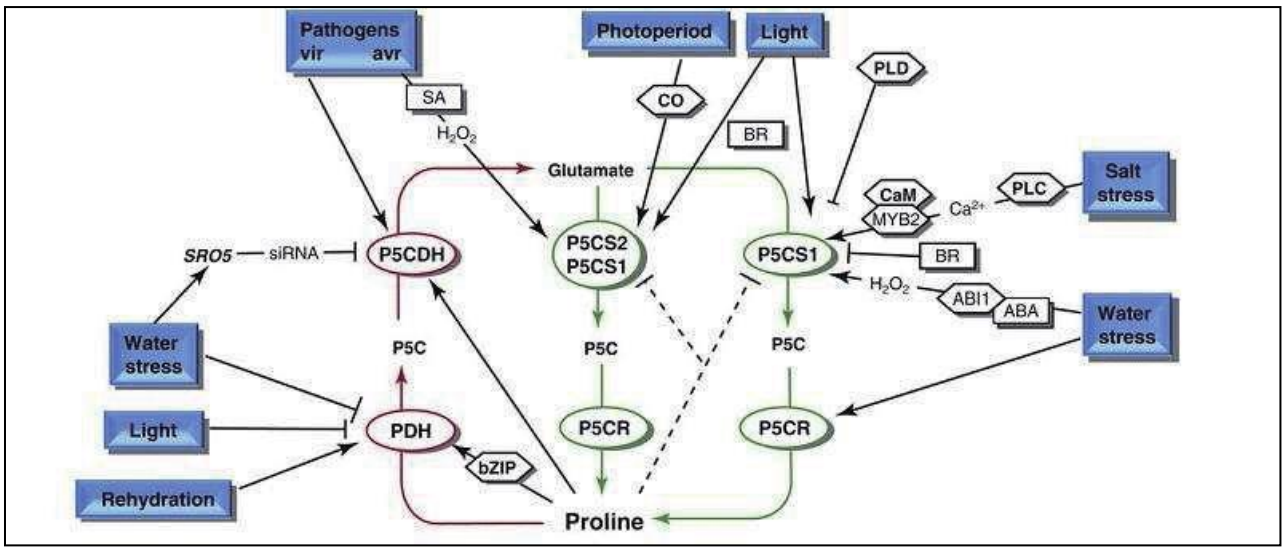


Figure 2 : Catabolisme de la proline (Li *et al*.2013)

PRODUCTION SCIENTIFIQUE

EFFECT OF CADMIUM STRESS ON THE POLYPHENOL CONTENT, MORPHOLOGICAL, PHYSIOLOGICAL, AND ANATOMICAL PARAMETERS OF COMMON BEAN (*PHASEOLUS VULGARIS* L.)

BENHABILES AIT EL HOCINE, K.[1,2*] – BELLOUT, Y.[1] – AMGHAR, F.[1,2]

[1]*Department of Biology, Faculty of Sciences, University Mhamad Bougara, Boumerdes, Algeria*

[2]*Laboratory of Biodiversity, Biotechnology, Environment and Sustainable Development, University Mhamad Bougara, Boumerdes, Algeria*

**Corresponding author*
e-mail: k.benhabiles@univ-boumerdes.dz; phone: +213-671-172-603; fax: +213-24-799-012

(Received 9th Dec 2019; accepted 24th Mar 2020)

Abstract. Cadmium (Cd) is one of the most notable heavy metals because of its high mobility and toxicity towards plants. In the present study, we aimed to evaluate the effect of cadmium on growth, physiological parameters, anatomical changes and phenolic compounds content in *Phaseolus vulgaris* L plant. Seedlings were exposed to cadmium at 0.25; 0.5 and 1 $g.l^{-1}$ for 21 days. Results indicated that cadmium significantly decreased percent seed germination, embryonic radical elongation, plant dry weight, stem/root length and numbers of leaves and lateral roots. Cadmium also induced a decrease in chlorophyll and protein content with all treatments; however, sugar and proline increased significantly with 1 $g.l^{-1}$. Total phenolic content increased by around 43% and 32% in the above ground part and roots respectively. Flavonoids, flavonols, hydrolysable tannins and condensed tannins showed a significant increase with higher cadmium concentration. Cadmium also changed plant root and stem anatomy; a decrease in both number and size of xylem vessels and a delay in xylem differentiation were observed.
Keywords: *cadmium, Phaseolus vulgaris L., growth, histological changes, phenolic compounds*

Introduction

Modern agro-ecosystems have continually received ever-increasing cadmium (Cd) pollution from several domestic and industrial activities, as well the agricultural application of phosphate fertilizers, sewage sludge and irrigation water contaminated with this element; leading to soil Cd contamination and increased Cd uptake by plants grown in those mediums (McLaughlin et al., 2006; Escudey et al., 2007). Cadmium can be found in soils, reaching levels of approximately 1 $mg.kg^{-1}$ for most of surface soils (Kabata-Pendias, 2000). It is relatively easily available for plant uptake because it is predominantly found in soil solution or bound to solid phase systems (Verbruggen et al., 2009).

In plants, exposure to cadmium induces phytotoxicity symptoms, such as biomass reduction, inhibition of root elongation (Gratao et al., 2009) and causes a reduction of several physiological processes including photosynthesis, respiration and transpiration (Seregin and Ivanov, 2001; He et al., 2017; Yazdi et al., 2019), seed germination (Chugh et al., 1995; Fattahi et al., 2019) and interferes with uptake, transport, and distribution of essential and non-essential mineral elements, especially in the form of Cd^{2+}(He et al., 2017). Cd toxicity triggers the over-accumulation of reactive oxygen

http://www.aloki.hu ● ISSN 1589 1623 (Print) ● ISSN 1785 0037 (Online)
DOI: http://dx.doi.org/10.15666/aeer/1802_37573774
© 2020, ALÖKI Kft., Budapest, Hungary

species, ultimately resulting in oxidative stress in plants (Cuypers et al., 2011; Anjum et al., 2015; Gupta et al., 2017)

Antioxidant molecules produced by plants as a response to Cd uptake, are considered a defense mechanism to metal stress. In this context, many studies have shown the radical scavenging properties of phenols, mainly by yielding electrons (Michalak, 2010; Cruces et al., 2015; Manquián-Cerda et al., 2016). Plants exposed to heavy metal stress have been observed to exude high levels of phenolic compounds (Posmyk et al., 2009; Mongkhonsin et al., 2016; Manquián-Cerda et al., 2018).

The harmful effects of Cd in soils include also anatomical changes such as variation in root tissues organization, development of apoplastic barriers (Vaculík et al., 2012), structural changes in plant's vascular system (Barcelo et al., 1988).

Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is one of the most important grain legumes worldwide; it is a valuable food source for humans around the world and accounts for higher consumption and economic importance. This crop is potentially exposed to Cd due to a component of fungicide and fertilizer formulations and amendment that is commonly used in agriculture throughout the word.

The purpose of this study was to evaluate Cd effect on: (i) morphological and physiological parameters, (ii) polyphenol accumulation in seedlings, (iii) root and stem structure in order to obtain detailed picture of Cd-induced structural disorders in vessels. It should help to explain responses of common bean to Cd stress.

Materials and methods

Plant material, treatments and growth conditions

Study was done in Algeria northern Africa under laboratory conditions. Common bean (*Phaseolus vugaris* L.) Djadida genotype commonly cultivated there was used. Seeds were selected, surface-disinfected using 0.1% sodium hypochlorite (NaClO) for 10 min, rinsed and soaked in distilled water at room temperature for 12 h. Seeds were then germinated in sealed plastic dishes with moistened filter paper at 25 °C in dark for 3 days. Uniform seedlings were selected and transplanted to pots containing mould with 16 h light and 8 h dark cycle at average day/night temperature of 25 °C/20 °C and average relative humidity of 75%, watered as needed according to field capacity calculated in gram of water per gram of soil and afterwards, till the end of the experiment for 21 days. The following treatments were considered: (1) 0.25 $g.l^{-1}$ of Cd, (2) 0.5 $g.l^{-1}$ of Cd, (3) 1 $g.l^{-1}$ of Cd. The Cd concentration was supplied us $CdCl_2$ water solution. For control experiment, Cd was omitted.

Seed germination and root elongation test

This test serves to verify the effect of cadmium on seeds germination. After selection and disinfection, seeds were placed in boxes containing filter paper moistened with cadmium solution at different concentrations 0.25 $g.l^{-1}$, 0.5 $g.l^{-1}$, 1 $g.l^{-1}$ and control moistened with distilled water. In each box 50 seeds were putted at 25 °C temperature in dark, with three repetitions for each concentration. Seeds were watered as needed by distilled water during 7 days.

To calculate the germination rate, we counted seeds sprouted per box every day until the seventh day, knowing that germination is positive when its radical reaches 5 mm in

http://www.aloki.hu ● ISSN 1589 1623 (Print) ● ISSN 1785 0037 (Online)
DOI: http://dx.doi.org/10.15666/aeer/1802_37573774
© 2020, ALÖKI Kft., Budapest, Hungary

length. After the seventh day of seed germination, radical's length of germinated seeds was measured on cm.

To obtain percentage of germination, we used the formula:

$$G(\%) = (\text{number of germinated seeds} / \text{total number of seeds}) \times 100$$

Morphological parameters

The different studied parameters are: Stem height and root length measured in cm; number of leaves and lateral roots. After sampling, roots were separated from above-ground part of plants and dried at 80 °C temperature for 48 h and weighed until we obtained a fixed weight in order to have the dry matter yield per pot.

Determination of tolerance index

Tolerance index (TI) was calculated as a ratio of the mean dry weight of plants grown in presence of Cd and mean dry weight of control plants. TI values lower than 1 suggests that plants are stressed due to metal pollution. Whereas, TI values equal to 1 indicate no difference relative to control treatments. Also, TI values higher than 1 indicate that plant is a hyper accumulator (Audet and Charest, 2007).

Biochemical and physiological parameters

Photosynthetic pigments determination

For photosynthetic pigments (chlorophyll *a* and *b*, carotenoids) analysis, fully developed trifoliate leaves were extracted with 80% acetone. Pigments contents were determined spectrophotometrically (spectrophotometer Shimadzu UV 1800) at following wavelengths: 663, 646 and 470 nm and calculated according to Lichtenthaler and Wellburn (1983).

Total soluble sugars

Leaves were used for soluble sugar determination; extraction was done with 80% (v/v) ethanol. Sugar content of resulting solution was determined following to Dische (1962) using anthrone reagent. Absorbance was measured at 620 nm. Standards of glucose were prepared and analyzed in the same way to obtain a calibration curve. Soluble sugars content was calculated as mg glucose equivalent g^{-1} FW.

Total protein content

The protein content in leaf tissue was determined according to Bradford (1976), Fresh leaves were homogenized and extracted with 5 mM buffer Tris-HCl, pH 7.2, 0.25 M sucrose and 1 mM $MgCl_2$. The extract was incubated with Bradford reagent in darkness. Absorbance was measured at 595 nm and the amount of proteins was expressed in equivalents of BSA bovin serum albumin (mg eq. BSA g^{-1} FW), used as standard.

Proline content

Proline content was determined following to Bates et al. (1973), using ninhydrin reagent. The absorbance was measured at 520 nm. Reference standards of proline were

http://www.aloki.hu ● ISSN 1589 1623 (Print) ● ISSN 1785 0037 (Online)
DOI: http://dx.doi.org/10.15666/aeer/1802_37573774
© 2020, ALÖKI Kft., Budapest, Hungary

prepared and analyzed in the same way to obtain a calibration curve. Results were expressed on $\mu g.g^{-1}$ DW.

Estimation of phenolic compounds

Phenolic compounds were extracted from shoot and roots dried samples of *Phaseolus vulgaris* L. The amount of total phenolics in the extract was determined using Folin Ciocalteu reagent as described by Meyers et al. (2003). Absorbance was measured at 750 nm and the results expressed in equivalents of gallic acid (mg eq. GA g^{-1} DW), used as standard.

Colorimetric aluminum chloride method was used for flavonoids and flavonols determination, using optimized protocols established by Bahorun et al. (1996); Kumaranand Karunakaran (2007a, b), respectively. Absorbance was measured at 430 and 440 nm respectively, and the amount of flavonoids and flavonol were expressed in equivalents of Quercetin (mg eq. Q g^{-1} DW), used as standard.

Hydrolysable tannins content was determined as described by Mole and Waterman (1987) and was quantified according to standard curve prepared for tannic acid. Results were expressed in equivalent of tannic acid (mg eq. TA g^{-1} DW).

Condensed tannins contents were determined following the method described by Swain and Hillis (1959). The absorbance was measured at 500 nm. The amount of condensed tannins was expressed in equivalents of catéchin (mg eq. CAg^{-1} DW), used as standard.

Anatomical study

At day 21 from sowing, samples were taken for light microscopy study. Sections were performed on fresh plants. Cross sections were made on the main root (1 cm of the collar; area of lateral roots), and those of stem are represented between first and second internodes. Samples were cut with a vibratome in order to obtain 100-µm transverse sections; fresh sections were collected and stained with iodine green carmine as described in Locquin and Langeron (1978).

Specimens were analyzed using a light microscope (optika B-350, Italy) using ×100 and × 400 magnifications, light micrographs were acquired by a digital camera and the images were processed and archived with TS view software version 6.2.4.5, tucsen imagin technology.

Statistical analyses

All data presented are the mean values of tree replicates ± standard deviation (SD). Statistical analysis was carried out by student analysis at 5%, 1% and 0.1% significance level, using statistical software package STATISTICA version 8.0

Results

Effect of Cd on germination and root elongation

Smaller number of seeds germinated in comparison with control variant was identified when Cd was added. Percent seeds germination was affected by different cadmium concentrations, it was lowered by about 68% with 0.25 $g.l^{-1}$ of metal, 84% with 0.5 $g.l^{-1}$ and 98% with 1 $g.l^{-1}$ Cd concentration ($p < 0.05$*) in contrast to control (*Fig. 1A*).

http://www.aloki.hu ● ISSN 1589 1623 (Print) ● ISSN 1785 0037 (Online)
DOI: http://dx.doi.org/10.15666/aeer/1802_37573774
© 2020, ALÖKI Kft., Budapest, Hungary

However, elongation of embryonic radical was impaired by about 70%, 87%, 91% (*Fig. 1B*) by 0.25; 0.5 g.l^{-1} and 1 g.l^{-1} Cd respectively ($p<0.01$**) compared to control.

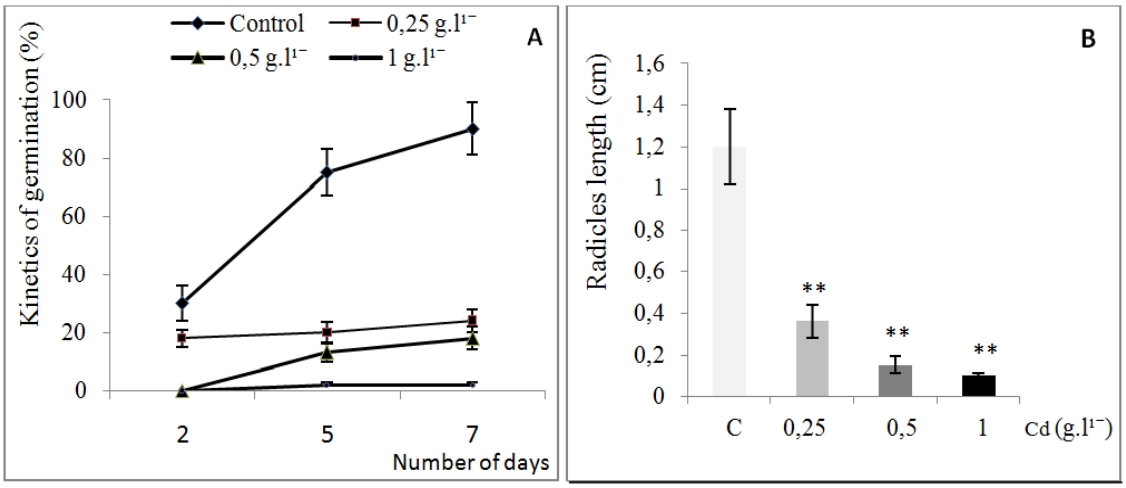


Figure 1. *Effects of cadmium (Cd) on (A) germination kinetics, (B) radicles length of common bean seeds (Phaseolus vulgaris L.). Results represent the mean ± SE (n = 3) (*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 according to Student test)*

Effect of Cd on plant growth

Morphological changes in *Phaseolus vulgaris* L. plants treated with concentrations of Cd showed leaf chlorosis, growth inhibition; stem weakening and dark brown root tips. We noted that 21-day-old, bean seedlings on polluted soil developed all aerial organs but shorter compared to control plants. Dark brown root tips and reduced growth are the most common physiological effects of heavy metal exposure in plants (Ovečka and Takáč, 2014). Stem and main root length is 68.58% and 71.43% shorter respectively in bean plants grown in 1 g.l^{-1} Cd concentration compared with those of controls (*Fig. 2A*); in this same concentration, bean plants had 50% fewer leaves and 20% fewer lateral roots per plant (*Fig. 2B*). The above ground part-roots dry weight and TI which represent relative plant growth were adversely affected by Cd concentrations; they decreased gradually with increase of Cd concentrations. This decrease was around 77.27% in above ground part length, and 47.97% in roots length comparing to their respective control under 1 g.l^{-1} Cd (*Fig. 2C*). According to results shown in *Table 1*, Tolerance Index of bean plants is less than 1 for all Cd concentrations in both part of plant, this confirmed a net decrease in biomass and suggests that *Phaseolus vulgaris* L. plants are stressed.

Treatment with 0.5 and 1 g.l^{-1} of Cd elicited significant decrease in all growth parameters as compared with control value ($P<0.05$ *), except for lateral roots number and roots dry weight; no changes were observed.

Table 1. *Value of tolerance index of bean plants according to Cd concentrations*

	Cadmium treatments		
TI	0.25 g.l^{-1} Cd	0.5 g.l^{-1} Cd	1 g.l^{-1} Cd
Above ground part	0.65	0.34	0.22
Roots	0.82	0.58	0.52

http://www.aloki.hu ● ISSN 1589 1623 (Print) ● ISSN 1785 0037 (Online)
DOI: http://dx.doi.org/10.15666/aeer/1802_37573774
© 2020, ALÖKI Kft., Budapest, Hungary

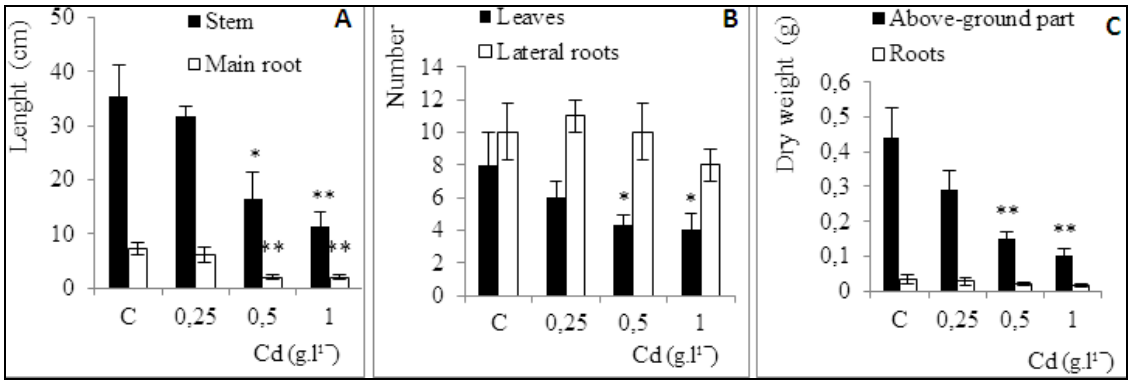


Figure 2. *Effects of cadmium (Cd) on (A) stem and main root length, (B) leaves and lateral roots number, and (C) dry weight of common bean seedling (Phaseolus vulgaris L.). Results represent mean ± SE (n = 3) (*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 according to Student test)*

Biochemical and physiological parameters

Cd treatment results in decline in chlorophyll content with increasing Cd concentrations. Chl *a* decreased significantly (P<0.01**) under all treatments till 56.87% compared to control. However, Chl *b* decrease was significant only under 1 g.l^{-1} Cd (p<0.05*) till 31.19% compared to control (*Fig. 3A*). When total carotenoids content showed a decrease reaching their lowest value under 1 g.l^{-1} Cd treatment (p<0.05*) in contrast to control (*Fig. 3B*).

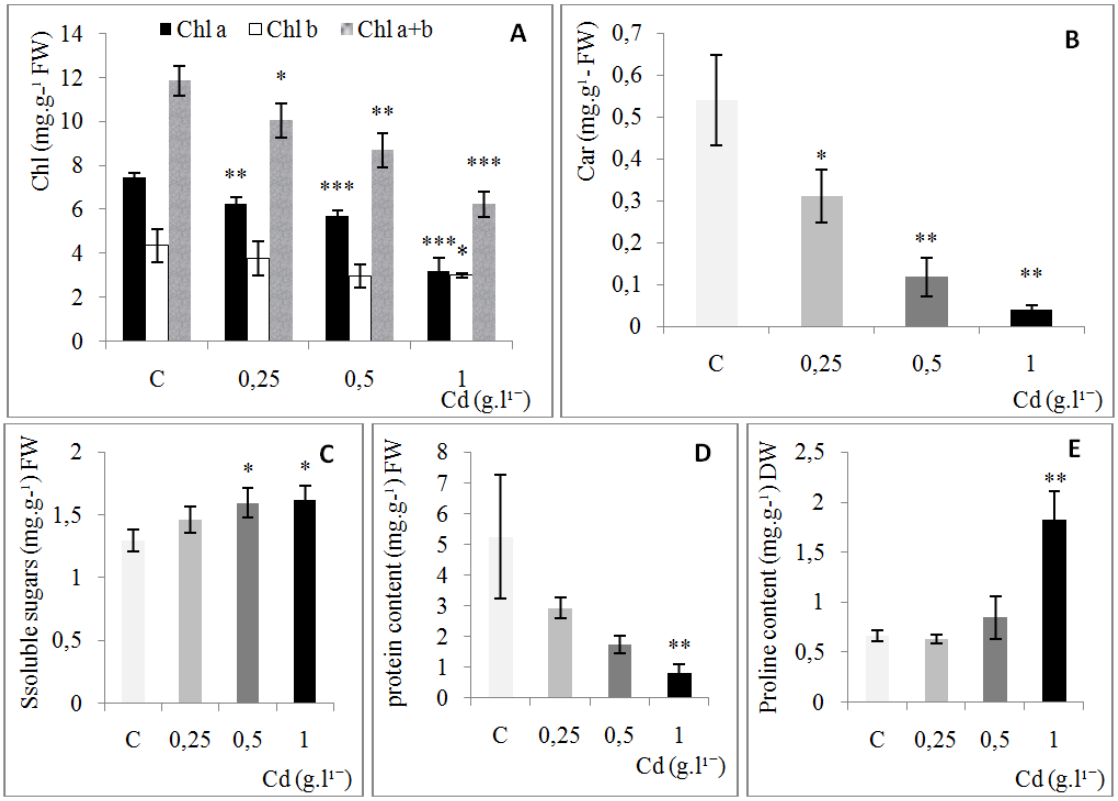


Figure 3. *Effects of cadmium (Cd) on biochemical parameters of common bean seedling (Phaseolus vulgaris L.). Results represent the mean ± SE (n = 3) (*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 according to Student test)*

http://www.aloki.hu ● ISSN 1589 1623 (Print) ● ISSN 1785 0037 (Online)
DOI: http://dx.doi.org/10.15666/aeer/1802_37573774
© 2020, ALÖKI Kft., Budapest, Hungary

It is obvious from *Figure 3C* that total soluble sugars content, appeared to increase under Cd treatment; increase was significant under 0.5 and 1 $g.l^{-1}$ Cd ($p<0.05$*) as compared with control value, it reached 24.80%.

Bean plants exhibited a significant decrease in proteins content with 1 $g.l^{-1}$ Cd concentration ($p<0.01$**) reaching 84.67% compared to control (*Fig. 3D*) when proline appeared to increase progressively with increase of Cd concentrations till 63.80% with 1 $g.l^{-1}$ Cd concentration ($P<0.01$*) (*Fig. 3E*).

Changes in phenolic compounds

Phenolic content in *Phaseolus vulgaris* L. extract is shown in *Figure 4*. Increasing levels of Cd markedly increased synthesis of these metabolites in all treatments in both above ground part and roots ($p<0.05$*) in contrast to control, aside from roots hydrolysable tannins. The rates of increase were till 43, 63, 58, 106, 239% in above ground part, and till 32, 34, 65, 31 and 20% in roots for total phenolics, flavonoids, flavonols, hydrolysable tannins and condensed tannins respectively.

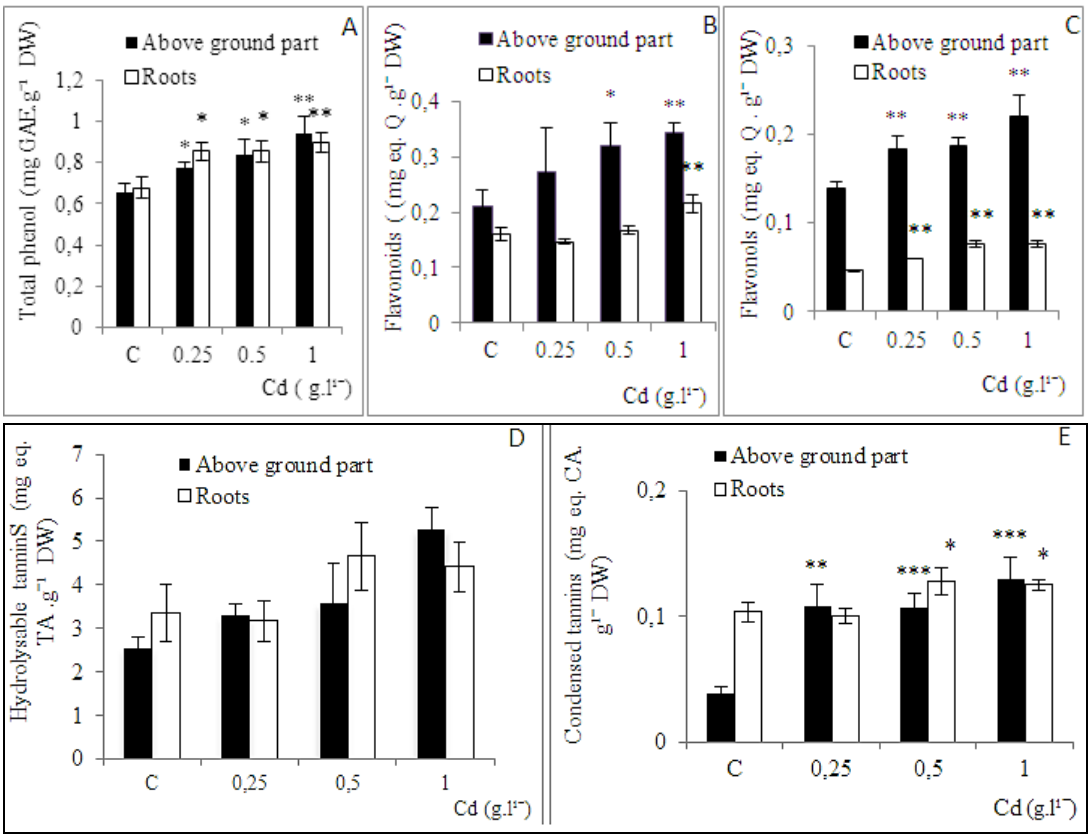


Figure 4. *Effects of cadmium (Cd) on phenolic compounds content of comman bean seedling (Phaseolus vulgaris L.). Results represent the mean ± SE (n = 3) (*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 according to Student test)*

Anatomical study

Our results showed that stem (*Fig. 5A, B, C, D*) and root (*Fig. 6A, B, C, D*) diameter sections were similar in control and all Cd treatment plant samples, with slight flattening of stem section. Cortex cells are similar in size in all samples; however, there

http://www.aloki.hu ● ISSN 1589 1623 (Print) ● ISSN 1785 0037 (Online)
DOI: http://dx.doi.org/10.15666/aeer/1802_37573774
© 2020, ALÖKI Kft., Budapest, Hungary

was a slight enlargement of cortex zone in primary roots and stem that had been exposed to Cd. At high magnification (*Figs. 5E, F, G, H, 6E, F, G, H*), a decrease of both number and size of xylem vessels in root and stem sections was observed and xylem differentiation appears retarded in plants grown in presence of Cd. which probably led to a decrease in raw sap flow.

Development of plant led to progressive disappearance of cortical parenchyma resulting to medular lacunae formation in plants stem; our results showed that medular lacunae diameter decreased with increase of Cd concentration till its disappearance with 1 $g.l^{-1}$ Cd concentration (*Fig. 5*), which suggests a delay in development of bean plant. In addition, sections showed appearance of secondary tissues in control, in contrast these tissues were retarded in plants grown with Cd treatment with a high number of cambial cells (*Figs. 5E, F, G, H, 6E, F, G, H*).

In root, higher Cd concentrations can result in rhizodermis disintegration in some location of root, but lateral root initiation was observed in all samples (*Fig. 6A, B, C, D*).

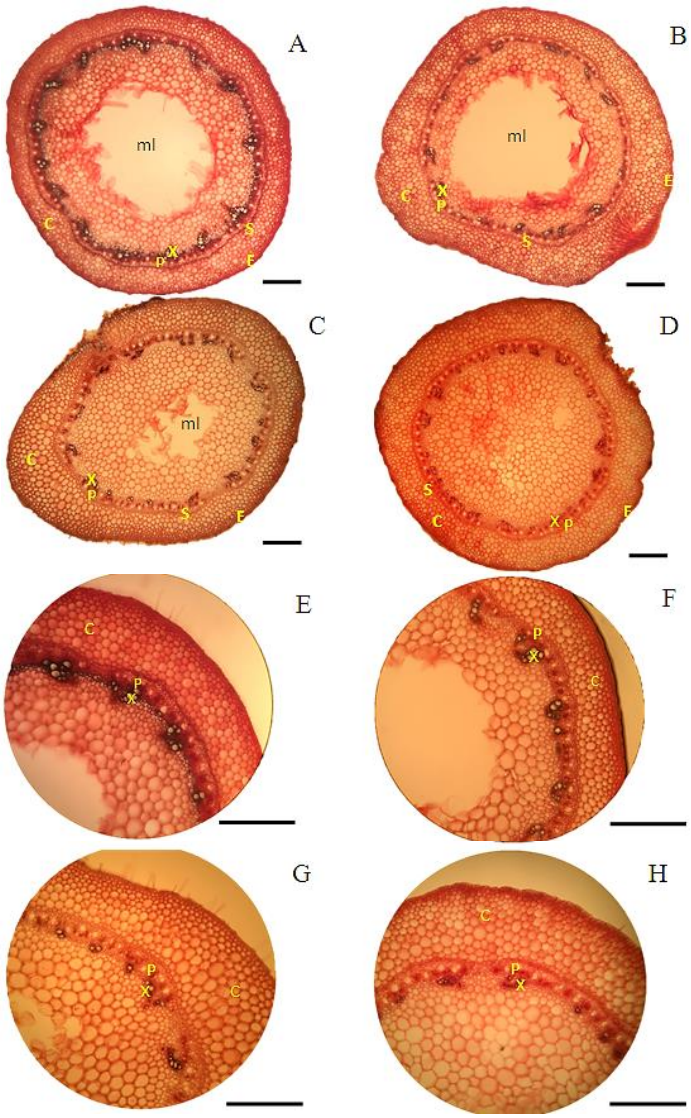


Figure 5. *Light micrographs of control (A, E) and Cd-treated plants: 0.25 $g.l^{-1}$ (B, F); 0.5 $g.l^{-1}$ (C, G); 1 $g.l^{-1}$ (D, H) showing transversal stem sections. C: cortex, X: xylem, P: phloem, S: sclerenchyma, E: epidermis, ml: medular lacunae; Scale bar, 500 µm*

http://www.aloki.hu ● ISSN 1589 1623 (Print) ● ISSN 1785 0037 (Online)
DOI: http://dx.doi.org/10.15666/aeer/1802_37573774
© 2020, ALÖKI Kft., Budapest, Hungary

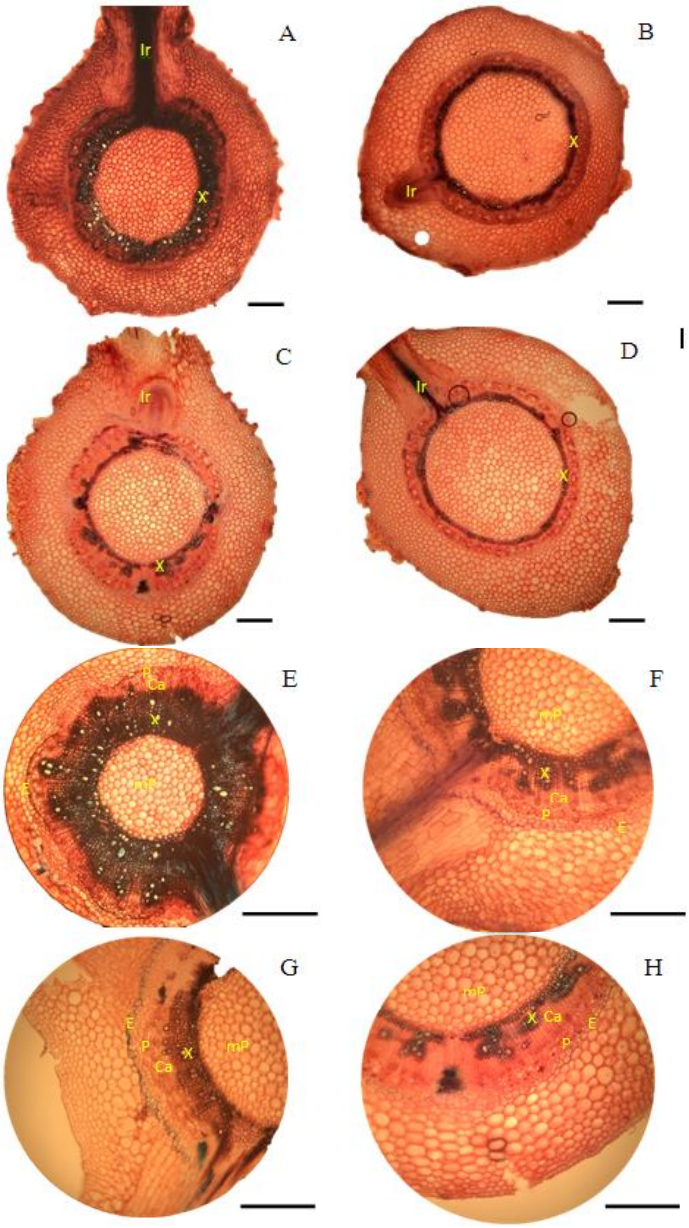


Figure 6. *Light micrographs of control (A, E) and Cd-treated plants: 0.25 g.l^{-1} (B, F); 0.5 g.l^{-1} (C, G); 1 g.l^{-1} (D, H) showing transversal root sections. C: cortex, X: xylem, P: phloem, E: endodermis, Ca: cambium; lr: lateral root; mP: medular parenchyma; Scale bar, 500 µm*

Discussion

Effect of Cd on germination and root elongation

Seed germination and root elongation tests are frequently used for assessing heavy metal phytotoxicity (Wang and Keturi, 1990; Munzuroglu and Geckil, 2002). Our results indicated significant inhibition of seed germination and root elongation under Cd stress which is in agreement with previous results of Li et al. (2005) on *Arabidopsis thaliana*. Hsu and Chang-Hung Chou (1992) reported that among heavy metals tested, Cd showed more toxicity to seed germination of *Miscanthus*, Fattahi et al. (2019) also

http://www.aloki.hu ● ISSN 1589 1623 (Print) ● ISSN 1785 0037 (Online)
DOI: http://dx.doi.org/10.15666/aeer/1802_37573774
© 2020, ALÖKI Kft., Budapest, Hungary

indicated that the increase in Cd concentrations led to an increase in germination time and a reduction in germination percentage.

According to Kranner and Colville (2011), Cd hamper water uptake inhibiting seed germination, and prolonged their dormancy under room temperature, Munzuroğlu et al. (2008) demonstrate that the inhibition of germination was related with abscisic acid accumulation in seeds. In addition, starch is the most abundant stored material in seeds used in germination after being degraded by enzymes such as amylase; so, inhibition of specific enzymatic reactions by heavy metals causes a negative effect on germination (Ko et al., 2012).

Effect of Cd on plant growth

Plant growth is one of the best indicators to evaluate plant response to environmental stress. Cadmium stress is a major environmental factor which induces various phytotoxicity symptoms such as stunted growth, root browning, chlorosis, necrosis and cell apoptosis (Chang et al., 2013; Zemanová et al., 2015; Younis et al., 2018a).

Our experimental data revealed that cadmium stress inhibited the growth of bean plants; similar behavior was reported by Yazdi et al. (2019), who found that seedlings of lettuce treated with low doses of Cd (100, 200, and 300 $\mu g.g^{-1}$ perlite) had phytotoxic effects. In addition, Younis et al. (2018a) reported that (*Phaseolus vulgaris*) treated with (10^{-6}, 10^{-3}M Cd) showed a significant decrease in growth parameters. The same result was observed in research conducted on three Miscanthus species (Guo et al., 2016). Growth inhibition could be attributed to inhibiting photosynthesis, respiration, water and nutrient uptake by Cd (Dias et al., 2013; Xue et al., 2013). The production of various forms of reactive oxygen species under inductive oxidative stress due to heavy metals presence, results in retardation of plant growth that could eventually led to plant death (Loi et al., 2018). It has been proposed that inhibition of root and shoot growth in presence of heavy metals may be mainly due to abnormal cell division as well as interference of heavy metals with cofactors that play a vital role in photosynthesis, respiration and protein synthesis in root and shoot of plants (Volland et al., 2014).

Biochemical and physiological parameters

Cadmium treatments cause a decrease in pigmentation of common bean shoots wich is in accordance with results of Molnarova et al. (2012) on *Sinapis alba* shoots., Younis et al. (2018a) on *P. vulgaris* L., Yazdi et al. (2019) on *Lactuca sativa* Linn. and Chen et al. (2019) on *Kandelia obovata*.

Decrease in chlorophyll content is attributed to inhibition of chlorophyll synthesis either by affecting key enzymes synthesis such as d-aminolevulinic acid dehydratase (ALA-dehydratase) and proto-chlorophyllide reductase (Stobart et al., 1985; Van Assche and Clijsters,1990), or indirectly by induction of Fe deficiency by inhibiting Fe(III) reductase and seriously affecting photosynthesis (Alkantara et al., 1994; Lang et al.,1995; He et al., 2017). Cd is also known to enhance chlorophyll enzymatic degradation (Somashekaraiah et al., 1992).

Sugars are involved in many mechanisms of biotic or abiotic stress response, their action in abiotic stress is very wide, they can act as an osmoprotectants by stabilising cellular membranes and maintaining turgor (Peshev and Ende, 2013) or as antioxidant molecules (Keunen et al., 2013).

http://www.aloki.hu ● ISSN 1589 1623 (Print) ● ISSN 1785 0037 (Online)
DOI: http://dx.doi.org/10.15666/aeer/1802_37573774
© 2020, ALÖKI Kft., Budapest, Hungary

Our results indicate that Cd treatment led to an increase in total soluble sugars content in common bean. Similar results have been reported by Li et al. (2013) on wheat plants and Vezza et al. (2018) on soybean plants under Zn and As stress, respectively. Contrary to these results, reducing sugar content was observed in *Phaseolus vulgaris L*. under Pb and Cd stress (Bhardwaj et al., 2009; Younis et al., 2018a). In fact, cadmium induced perturbation in metabolism of carbohydrates by modulating their enzymes activities and causes sugar accumulation (Devi et al., 2007; Mishra and Dubey, 2013)

Protein content is inversely proportional to Cd concentrations, it decreases with Cd increasing. This is may be due to enhanced protein hydrolysis either by increased protease activity (Palma et al., 2002; Melnichuk et al., 1982) or by fragmentation of proteins due to toxic effects of reactive oxygen species. In fact, denaturant ion of functional and structural proteins is known as a result of reactive oxygen species (ROS) production in cells under stress conditions (Davies et al., 1987; Bowler et al., 1992). Moreover, decrease in protein content can also be attributed to their slowdown biosynthesis due to a decrease in nitrate reductase activity (Fresneau et al., 2007). Similar effects have been showed in several other plant species under Cd stress (Tamas et al., 1997; John et al., 2008; Aslam et al., 2014) or in *Phaseolus vulgaris* L. Plant (Bhardwaj et al., 2009; Younis et al., 2018a).

Proline has always been considered as a biomarker of drought or salt stress. Actually, several studies associated its accumulation with heavy metal stress (Alia and Pardha, 1991; Choudhary et al., 2007; Vezza et al., 2018; Younis et al., 2018a). Proline promotes photosynthetic activity, water status, antioxidative enzymes activities (Zouari et al., 2016) and assures osmotic adjustment at cellular level (Kasai et al., 1998). According to Alia and Pardha (1991), increase in proline level could be either due to its fresh synthesis and/or due to decrease in its utilization in stressed plants. Li et al. (2013) reported that accumulation of proline is due to ornithine pathway involving in OAT (ornithine d-aminotransferase) stimulation a biosynthesis enzyme of proline; on the other hand, a decrease in GK (glutamate kinase) and PDH (proline dehydrogenase) activities involved in catabolism of proline.

Changes in phenolic compounds

Oxidative stress is an important mechanism of cadmium toxicity (Smeets et al., 2005). Plants use a complex antioxidant defense system to prevent oxidative damage and keep reactive oxygen species concentrations within a narrow functional range (Ozgur et al., 2013). The primary components of this system include non-enzymatic radical scavengers among them carotenoids, flavonoides, and phenolic compounds. These components keep plant cells away from oxidative damage by scavenging ROS (Schafer et al., 2002). A better understanding of underlying antioxidant mechanisms mediated by phenolic compounds is necessary to develop strategies for contaminated crop soil.

Phaseolus vulgaris L. grown under Cd treatments showed a significant increase of phenolic compounds and total flavonoids contents in both parts of plant. Under heavy metal stress, phenolic compounds can act as transition metal ions chelators, ROS scavengers (Vollmannova et al., 2014; Manquian-Cerda et al., 2016) and can suppress lipid peroxidation by breaking radical chain reactions during lipid peroxidation (Arora et al., 2000; Sakihama and Yamasaki, 2002).

Chen et al. (2019) reported that the activity of Shikimate dehydrogenase (SKDH), cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD), and polyphenol oxidase (PPO) increased at the

http://www.aloki.hu ● ISSN 1589 1623 (Print) ● ISSN 1785 0037 (Online)
DOI: http://dx.doi.org/10.15666/aeer/1802_37573774
© 2020, ALÖKI Kft., Budapest, Hungary

meantime when total phenolic compounds increase in *Kandelia obovata* exposed to higher concentrations of cadmium (Cd) and zinc (Zn), which indicate that Cd and Zn play a previously unrecognized but major role in phenolic compounds synthesis, transport, and metabolism. Kovácik et al. (2006) affirmed that activation of the phenylalanine ammonia-Liaza (PAL) enzyme is the main cause of increase in the phenolic metabolits concentration, since it is the main biosynthetic pathway of phenolic compounds. Increase of total phenolic compounds under Cd pollution has been reported in several plants, including *P. vulgaris* (Manquian-Cerda et al., 2016; Mongkhonsin et al., 2016; Younis et al., 2018b; Chen et al., 2019).

Flavonoids are frequently induced by abiotic stress especially by heavy metals and promote roles in plant protection (Grace and Logan, 2000; Dai et al., 2006). Biological and antioxidant activities of flavonols, among others quercetin, have been proven (Tsai et al., 2002). Posmyk et al. (2009) reported that at 0.5 mM Cu^{2+} stress, anthocyanins concentration increased and that anthocyanins synthesis was the effective strategy against ROS generated by Cu^{2+} stress. Flavonoids are known that are inhibitors of lipoxygenase enzyme, which converts polyunsaturated fatty acids to oxygen-containing derivatives (Nijveldt et al., 2001).

Posmyk et al. (2009), Mongkhonsin et al. (2016) and Younis et al. (2018b) examined common bean plant treated with metals such as Cu and Cd, and reported an increase in flavonoids concentration in both shoots and roots.

In the present study, Cd led to a marked increase of tannins. Tannins have great anti-oxidant capacities due to their phenol nuclei. According to Bruneton (1999), hydrolysable tannins are ROS and superoxide anion scavengers and are very good proton donors to ROS produced during peroxidation, resulting in more stable tannic radical formation. Tannins are known to remove heavy metals from solutions using green technology (Sun et al., 2019). Oo (2009) reported that the metal ions could interact with hydroxyl groups of mangrove tannins through an ion exchange and/or complexation process.

Anatomical changes

Plant anatomy is known to be sensitive to physical and chemical conditions, like Cd pollution area. Anatomical changes in response to Cd have been long reported (Barcelo et al., 1988; Lux et al., 2011; Pereira et al., 2018) on *Phaseolus vulgaris, Zea mays L.* and, *Solidago chilensis* respectively.

Presence of Cd in soil causes a decrease of both number and size of xylem vessels and a slight enlargement of cortex zone. As mentioned by Maksimovic et al. (2007), the enlargement of cortical tissues had a functional role by decreasing radial flows of water and solutes showed in maize with Cd and Ni pollution. Little information is available on development of central cylinder cells and tissues under Cd stress; this topic requires more attention, especially considering the importance of xylem translocation in regulating cadmium movement from roots to aerial tissues (Lux et al., 2011).

Our result were in accord with Aloni (1987), Barcelo et al. (1988) and Vazquez et al. (1992) who reported that Cd reduces cell division and differentiation in vascular cylinder of Cd-treated bean plants, which seems essential for both production of cambium and cambium cells differentiation into vessels and fibers leading to poor development of vascular bundles. Moreover, the differentiation of cambium to these conducting elements depends on phytohormones like auxins and cytokinins (Aloni, 1987; Bhalerao et Bennett, 2003). Lower auxin concentrations, result in slower differentiation and therefore fewer

http://www.aloki.hu ● ISSN 1589 1623 (Print) ● ISSN 1785 0037 (Online)
DOI: http://dx.doi.org/10.15666/aeer/1802_37573774
© 2020, ALÖKI Kft., Budapest, Hungary

vessels (Aloni, 1988). It seems that Cd stimulates Auxin degradation (Chaoui et al., 2005). Cytokinins seem crucial for formation and maintenance of cambial cells (Fukuda, 2004), furthermore Cd may decrease cambium size and fiber differentiation in stems by inhibiting cytokinin export from roots (Aloni, 1982).

Cd exposure had not any effect on diameters of bean roots, which is in concordance with Vázquez et al. (1992). However, higher Cd concentrations can result in rhizodermis disintegration in some location of root, similar abnormal effects have been also described in tomato (Gratão et al., 2009).

Conclusion

The present study showed clearly that Cd had negative impact on seed germination, plant growth and caused several physiological and biochemical modifications in *Phaseolus vulgaris* L. Furthermore, it resulted in noticeable effects on phenolic compounds contents as antioxidant response to Cd. It is supposed that the revealed anatomical changes in xylem under Cd impact hamper fluid movement from root to shoot and are one of the reasons of nutrients decrease and pollutants translocation from roots to shoots. It might be a tolerance to abiotic stress limiting Cd impact on plant.

For future studies, evaluation of Cd effect on phenolic compounds profile and non-enzymatic antioxidants seems to be important.

REFERENCES

[1] Alia, P., Pardha, S. (1991): Proline accumulation under heavy metal stress. – Journal of Plant Physiology 138: 554-558.

[2] Alkantara, E., Romerza, F. J., Canett, M., De LaGuardia, M. D. (1994): Effect of heavy metals on both induction and function of root Fe (III) reductase in Fe-deficient cucumber (*Cucumis sativus* L.). plants. – J. Exp. Bot. 45: 1893-1898.

[3] Aloni, R. (1982): Role of cytokinin in differentiation of secondary xylem fibers. – Plant Physio. 70: 1631-1633.

[4] Aloni, R. (1987): Differentiation of vascular tissues. – Ann. Rev. Plant Physio. 38: 179-204.

[5] Aloni, R. (1988): Vascular Differentiation of within Plants. – In: Roberts, L. W., Mahan, P. B., Aloni, R. (eds.) Vascular Differentiation and Plant Growth Regulators. Springer-Verlag, Berlin, pp. 39-59.

[6] Anjum, S. A., Tanveer, M., Hussain, S., Bao, M., Wang, L., Khan, I., Shahzad, B. (2015) Cadmium toxicity in Maize (*Zea mays L.*): consequences on antioxidative systems, reactive oxygen species and cadmium accumulation. – Environ SciPollut Res 22: 17022-17030.

[7] Arora, A., Byrem, T. M., Nair, M. G., Strasburg, G. M. (2000): Modulation of liposomal membrane fluidity by flavonoids and isoflavonoids. – Archives of Biochemistry and Biophysics 373: 102-109.

[8] Aslam, R., Ansari, M. Y. K., Choudhary, S., Bhat, T. M., Jahan, N. (2014): Genotoxic effects of heavy metal cadmium on growth, biochemical, cyto-physiological parameters and detection of DNA polymorphism by RAPD in *Capsicum annuum* L. - an important spice crop of India. – Saudi Journal of Biological Sciences 21: 465-472.

[9] Audet, P., Charest, C. (2007): Heavy metal phytoremediation from a meta-analytical perspective. – Environ. Pollut. 147: 2337.

[10] Bahorun, T., Gressier, B., Trotin, F., Brunet, C., Dine, T., Luyckx, M., Vasseur, J., Cazin, M., Cazin, J. C., Pinkas, M. (1996): Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. – Arzneim Forsch 46: 1086-1108.

http://www.aloki.hu ● ISSN 1589 1623 (Print) ● ISSN 1785 0037 (Online)
DOI: http://dx.doi.org/10.15666/aeer/1802_37573774
© 2020, ALÖKI Kft., Budapest, Hungary

[11] Barcelo, J., Vazquez, M. D., Poschenrieder, C. (1988): Structural and ultrastructural disorders in cadmium-treated bush bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.). – New Phytol 108: 37-49.
[12] Bates, L. S., Waldren, R. P., Teare, I. D. (1973): Rapid determination of free proline for water stress studies. – Plant Soil 39: 205-207.
[13] Bhalerao, R., Bennett, M. (2003): The case for morphogens in plants. – Nature Cell Biology 5: 939-943.
[14] Bhardwaj, P., Chaturvedi, A. K., Prasad, P. (2009): Effect of enhanced lead and cadmium in soil on physiological and biochemical attributes of *Phaseolus vulgaris* L. – Nat. Sci 7: 63-75.
[15] Bowler, C., Van Montagu, M., Inze, D. (1992): Superoxide dismutase and stress tolerance. – Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 43: 83-116.
[16] Bradford, M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. – Anal. Biochem 72: 248-254.
[17] Bruneton, J. (1999): Pharmacognosie, phytochimie, plantes médcinales. – Thechnique et Documentation. Ed. Lavoisier., Paris, pp. 227-401.
[18] Chang, Y. S., Chang, Y. J., Lin, C. T., Lee, M. C., Wu, C. W., Lai, Y. H. (2013): Nitrogen fertilization promotes the phytoremediation of cadmium in *Pentas lanceolata*. – Int Biodeter Blodegr. 85: 709-714.
[19] Chaoui, A., El Ferjani, E. (2005): Effects of cadmium and copper on antioxidant capacities, lignification and auxin degradation in leaves of pea (*Pisum sativum* L.) seedlings. – C R Biol. 328: 23-31.
[20] Chen, S., Wang, Q., Lu, H., Li, J., Yang, D., Liu, J., Yan, C. (2019): Phenolic metabolism and related heavy metal tolerance mechanism in *Kandelia obovata* under Cd and Zn stress. – Ecotoxicology and Environmental Safety 169: 134-143.
[21] Choudhary, M., Jetley, U. K., Abash, M., Zutshi, K. S., Fatma, T. (2007): Effect of heavy metal stress on proline, malondialdehyde, and superoxide dismutase activity in the *cyanobacterium spirulina* platensis-S5. – Ecotoxicology and Environmental Safety 66: 204-209.
[22] Chugh, L. K., Sawhney, S. K. (1995): Effect of cadmium on germination, amylases and rate of respiration of germinating pea seeds. – Environmental Pollution 92: 1-5.
[23] Cruces, E., Rojas-Lillo, Y., Ramirez-Kushel, E., Atala, E., López-Alarcón, C., Lissi, E., Gómez, I. (2015): Comparison of different techniques for the preservation and extraction of phlorotannins in the kelp *Lessonia spicata* (Phaeophyceae): assays of DPPH, ORAC-PGR, and ORAC-FLas testing methods. – J. Appl. Phycol. 28: 573-580.
[24] Cuypers, A., Smeets, K., Ruytinx, J., Opdenakker, K., Keunen, E., Remans, T., Horemans, N., Vanhoudt, N., Van Sanden, S., Van Belleghem, F. (2011): The cellular redox state as a modulator in cadmium and copper responses in *Arabidopsis thaliana* seedlings. – J. Plant Physiol 168: 309-316.
[25] Dai, L. P., Xiong, Z. T., Huang, Y., Li, M. J. (2006): Cadmium-induced changes in pigments, total phenolics, and phenylalanine ammonialyase activity in fronds of *Azolla imbricate*. – Environ. Toxicol. 21: 505-512.
[26] Davies, C. S., Nielsen, S. S., Nielsen, N. C. (1987): Flavor improvement of soybean preparations by genetic removal of lipoxygenase-2. – J. Am. Oil Chem. Soc 64: 1428-1433.
[27] Devi, R., Munjral, N., Gupta, A. K., Kaur, N. (2007): Cadmium induced changes in carbohydrate status and enzymes of carbohydrate metabolism, glycolysis and pentose phosphate pathway in pea. – Environ. Exp. Bot. 61: 167-174.
[28] Dias, M. C., Monteiro, C., Moutinho-Pereira, J., Correia, C., Gonçalves, B., Santos, C. (2013): Cadmium toxicity affects photosynthesis and plant growth at different levels. – ActaPhysiol Plant 35: 1281-1289.
[29] Dische, Z. (1962): Color Reactions of Hexoses. – In: Whistler, R. L., Wolfrom, M. L. (eds.) Methods in Carbohydrate Chemistry. Vol. 1. Academic Press, New York, pp. 488-490.

http://www.aloki.hu ● ISSN 1589 1623 (Print) ● ISSN 1785 0037 (Online)
DOI: http://dx.doi.org/10.15666/aeer/1802_37573774
© 2020, ALÖKI Kft., Budapest, Hungary

[30] Escudey, M., Forster, J. E., Becerra, J. P., Quinteros, M., Torres, J., Arancibia, N., Galindo, G., Chang., A. C. (2007): Disposal of domestic sludge and sludge ash on volcanic soils. – J. Hazard. Mater. 139: 550-555.
[31] Fattahi, B., Arzani, K., Souri, M. K., Barzegar, M. (2019): Effects of cadmium and lead on seed germination, morphological traits, and essential oil composition of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). – Industrial Crops & Products 138: 111584.
[32] Fresneau, C., Ghashghaie, J., Cornic, G. (2007): Drought effect on nitrate reductase and sucrose phosphate synthase activities in wheat (*Triticum durum* L.): role of leaf internal CO2. – Journal of Experimental Botany 58: 2983-2992.
[33] Fukuda, H. (2004): Signals that control plant vascular cell differentiation. – Nature Reviews Molecular Cell Biology 5: 379-391.
[34] Grace, S. C., Logan, B. A. (2000): Energy dissipation and radical scavenging by the plant phenyl propanoid pathway. – Philosophical Transactions of the Royal Society B 355: 149510.
[35] Gratao. P. L., Monteiro, C. C., Rossi. M. L., Martinelli, A. P., Peres, L. E. P., Medici, L. O., Lea, P. J., Azevedo, R. A. (2009): Differential ultrastructural changes in tomato hormonal mutants exposed to cadmium. – Environ Exp Bot 67: 387-394.
[36] Guo, H., Hong, C., Chen, X., Xu, Y., Liu, Y., Jiang, D. (2016): Different growth and physiological responses to cadmium of the three Miscanthus species. – PLoS One 11: 0153475.
[37] Gupta, D. K., Pena, L. B., Romero-Puertas, M. C., Hernández, A., Inouhe, M., Sandalio, L. M. (2017): NADPH oxidases differentially regulate ROS metabolism and nutrient uptake under cadmium toxicity. – Plant Cell Environ 40: 509-526.
[38] He, S. Y., Yang, X. E., He, Z., Baligar, V. C. (2017): Morphological and physiological responses of plants to cadmium toxicity: a review. – Pedosphere 27: 421-438.
[39] Hsu, F. H., Chang-Hung Chou (1992): Inhibitory effects of heavy metals on seed germination and seedling growth of Miscanthus species. – Bot. Bull. Acad. Sin. 33: 3342.
[40] John, R., Ahmad, P., Gadgil, K., Sharma, S. (2008): Effect of cadmium and lead on growth, biochemical parameters and uptake in *Lemna polyrrhiza* L. – Plant Soil Environ. 54: 262-270.
[41] Kabata-Pendias, A. (2000): Trace Elements in Soils and Plants. 3rd Ed. – CRC Press, Boca Raton.
[42] Kasai, Y., Kato, M., Aoyama, J., Hyodo, H. (1998): Ethylene production and increase in 1 aminocyclopropane-1 carboxylate oxidase activity during senescence of broccoli florets. – Acta Horticulturae 464: 153-157.
[43] Keunen, E., Peshev, D., Van gronsveld, J., Van den ende, W. (2013): Plant sugars are crucial players in the oxidative challenge during abiotic stress: extending the traditional concept. – Plant, Cell & Environment 36: 1242-1255.
[44] Ko, K. S., Lee, P. K., Kong, I. C. (2012): Evaluation of the toxic effects of arsenite, chromate, cadmium, and copper using a battery of four bioassays. – Appl Microbiol Biotechnol 95: 1343-1350.
[45] Kovcik, J., Tomko, J., Backor, M., Repcak, M. (2006): *Matricaria chamomilla* is not a hyperaccumulator, but tolerant to cadmium stress. – Plant Growth Regul 50: 239-247.
[46] Kranner, I., Colville, L. (2011): Metals and seeds: biochemical and molecular implications and their significance for seed germination. – Environ. Exp. Bot. 72: 93-105.
[47] Kumaran, A., Karunakaran, R. J. (2007a): Activity-guided isolation and identification of free radical-scavenging components from an aqueous extract of *Coleus aromaticus*. – Food Chemistry 100: 356-361.
[48] Kumaran, A., Karunakaran, R. J. (2007b): In vitro antioxidant activities of methanol extracts of Phyllanhtus species from India. – Lebens-Wiss Technol 40: 344-352.
[49] Lang, F., Sarvari, E., Szigeti, Z., Fodor, F., Cseh, E. (1995): Effects of Heavy Metals on the Photosynthetic Apparatus in Cucumber. – In: Mathis, P. (ed.), Photosynthesis: From Light to Biosphere. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 533-536.

http://www.aloki.hu ● ISSN 1589 1623 (Print) ● ISSN 1785 0037 (Online)
DOI: http://dx.doi.org/10.15666/aeer/1802_37573774
© 2020, ALÖKI Kft., Budapest, Hungary

[50] Li, W., Khan, M. A., Yamaguchi, S., Kamiya, Y. (2005): Effects of heavy metals on seed germination and early seedling growth of *Arabidopsis thaliana*. – Plant Growth Regulation 46: 45-50.
[51] Li, X., Yang, Y., Jia, L., Chen, H., Wei, X. (2013): Zinc-induced oxidative damage, antioxidant enzyme response and proline metabolism in roots and leaves of wheat plants. – Ecotoxicol. Environ. Saf. 89: 150-157.
[52] Lichtenthaler, H. K., Wellburn, A. R. (1983): Determinations of total carotenoids and chlorophylls *a* and *b* of leaf extracts in different solvents. – Biochem Society Transactions 11: 591-592.
[53] Locquin, M., Langeron, M. (1978): Manuel de microscopie. – Ed. Masson, France.
[54] Loi, N. N., Sanzharova, N. I., Shchagina, N. I., Mironova, M. P. (2018): The effect of cadmium toxicity on the development of lettuce plants on contaminated sod-podzolic soil. – Russ. Agric. Sci. 44: 49-52.
[55] Lux, A., Martinka, M., Vaculık, M., White, P. J. (2011): Root responses to cadmium in the rhizosphere: a review. – J. Exp. Bot. 62: 21-37.
[56] Maksimovic, I., Kastori, R., Krstic, L., Lukovic, J. (2007): Steady presence of cadmium and nickel affects root anatomy, accumulation and distribution of essential ions in maize seedlings. – Biologia Plantarum 51: 589-592.
[57] Manquián-Cerda, K., Escudey, M., Zúñiga, G., Arancibia-Miranda, N., Molina, M., Cruces, E. (2016): Effect of cadmium on phenolic compounds, antioxidant enzyme activity and oxidative stress in blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) plantlets grown in vitro. – Ecotoxicol. Environ. Saf. 133: 316-326.
[58] Manquián-Cerda, K., Cruces, E., Escudey, C., Zúñiga, G., Calderon, R. (2018): Interactive effects of aluminum and cadmium on phenolic compounds, antioxidant enzyme activity and oxidative stress in blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) plantlets cultivated in vitro. – Ecotoxicology and Environmental Safety 150: 320-326.
[59] McLaughlin, M. J., Whatmuff, M., Warne, M., Heemsbergen, D., Barry, G., Bell, M., Nash, D., Pritchardet, D. (2006): A field investigation of solubility and food chain accumulation of biosolid-cadmium across diverse soil types. – Environ Chem: 3428-432.
[60] Melnichuk Yu, P., Lishko, A. K., Kalinin, F. L. (1982): Cd effect on free amino acid content in germs of pea seeds at early germination stages. – Fiziologiya biokhimiya kulturnyh Rasstenii 14: 383-385.
[61] Meyers, K. J., Watkins, C. B., Pritts, M. P., Liu, R. H. (2003): Antioxydant and antiproliferative activities of strawberries. – Journal of Agricultural and Food Chemistry 51: 6887-6892.
[62] Michalak, A., 2010. Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. – Pol. J. Environ. Stud.15: 523-530.
[63] Mishra, P., Dubey, R. S. (2013): Excess nickel modulates activities of carbohydrate metabolizing enzymes and induces accumulation of sugars by up regulating acid invertase and sucrose synthase in rice seedlings. – Biometals 26: 97-111.
[64] Mole, S., Waterman, P. G. (1987): A critical analysis of techniques for measuring tannins in ecological studies. II. Techniques for biochemically defining tannins. – Oecologia 72: 148-156.
[65] Molnarova, M., Fargasova, A. (2012): Relationship between various physiological and biochemical parameters activated by cadmium in *Sinapisalba* L. and *Hordeum vulgare* L. – Ecological Engineering 49: 62.
[66] Mongkhonsin, B., Nakbanpote, W., Hokura, A., Nuengchamnon, N., Maneechai, S. (2016): Phenolic compounds responding to zinc and/or cadmium treatments in *Gynura pseudochina* (L.) DC. Extracts and biomass. – Plant Physiol. Biochem. 109: 549-560.
[67] Munzuroglu, O., Geckil, H. (2002): Effects of metals on seed germination, root elongation, and coleoptile and hypocotyl growth in *Triticuma estivum* and *Cucumis sativus*. – Bull. Environ. Contam. Toxicol. 43: 203-213.

http://www.aloki.hu ● ISSN 1589 1623 (Print) ● ISSN 1785 0037 (Online)
DOI: http://dx.doi.org/10.15666/aeer/1802_37573774
© 2020, ALÖKI Kft., Budapest, Hungary

[68] Munzuroğlu, O., Zengin, F. K., Yahyagil, Z. (2008): The abscisic acid levels of wheat (*Triticuma estivum* L. Cv. Cakmak 79) seeds that were germinated under heavy metal (Hg^{++}, Cd^{++}, Cu^{++}) stress. – J. Fac. Pharm. Gazi. 21: 1-7.
[69] Nijveldt, R. J., Van Nood, E., Van Hoorn, D. E. C., Boelens, P. G., Van Norren, K., Van Leeuwen, P. A. M. (2001): Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. – American Society for Nutrition 74: 418-425.
[70] Oo, C. W., Kassima, M. J., Pizzib, A. (2009): Characterization and performance of *Rhizophora apiculata* mangrove polyflavonoid tannins in the adsorption of copper (II) and lead (II). – Industrial Crops and Products 30: 152-161.
[71] Ovecka, M., Takac, T. (2014): Managing heavy metal toxicity stress in plants: biological and biotechnological tools. – Biotechnol. Adv. 32: 73-86.
[72] Ozgur, R., Uzilday, B., Sekmen, A. H., Turkan, I. (2013): Reactive oxygen species regulation and antioxidant defence in halophytes. – Functional Plant Biology 40: 832-847.
[73] Palma, J. M., Sandalio, L. M., Javier Corpas, F., Romero-Puertas, M. C., McCarthy, I., del Rio, L. A. (2002): Plant proteases protein degradation and oxidative stress: role of peroxisomes. – Plant Physiol. Biochem 40: 521-530.
[74] Pereira, L. S., Pereira de Araújob, R., Souza de Oliveirac, P., Dias da Silvac, L., CasaesAlvesa, P. A., Fernandesd, V. F., Gross, E. (2018): Cadmium induced changes in *Solidago chilensis Meyen* (Asteraceae) grown on organically fertilized soil with reference to mycorrhizae, metabolism, anatomy and ultrastructure. – Ecotoxicology and Environmental Safety 150: 75.
[75] Peshev, D., Van den Ende, W. (2013): Sugars as Antioxidants in Plants. – In: Tuteja, N., Gill, S. S. (eds.) Crop Improvement under Adverse Conditions. Springer-Verlag, Berlin.
[76] Posmyk, M. M., Kontek, R., Janas, K. M. (2009) Antioxidant enzymes activity and phenolic compounds content in red cabbage seedlings exposed to copper stress. – Ecotoxicology and Environmental Safety 72: 596-602.
[77] Sakihama, Y., Yamasaki, H. (2002): Lipid peroxidation induces by phenolics in cinjunction with aluminium ions. – Biol. Plantarum 45: 249-254.
[78] Schafer, F. Q., Wang, H. P., Kelly, E. E. (2002): Comparing beta-carotene, vitamin E and nitric oxide as membrane antioxidants. – The Journal of Biological Chemistry 383: 671-681.
[79] Seregin, I. V., Ivanov, V. B. (2001): Physiological aspects of cadmium and lead toxic effects on higher plants. – Russ. J. Plant Physiol 48: 523-544.
[80] Smeets, K., Cuypers, A., Lambrechts, A., Semane, B., Hoet, P., Van Laere, A., Vangronsveld, J. (2005): Induction of oxidative stress and antioxidative mechanisms in *Phaseolus vulgaris* after Cd application. – Plant Physiology and Biochemistry 43: 437-444.
[81] Somashekaraiah, B. V., Padmaja, K., Prasad, A. R. K. (1992): Phytotoxicity of cadmium ions on germinating seedlings of mung bean (*Phaseolus vulgaris*): Involvement of lipid peroxides in chlorphyll degradation. – Physiol Plant. 85: 85-89.
[82] Stobart, A. K., Griffiths, W. T., Ameen-Bukhari, I., Sherwood, R. P. (1985): The effect of Cd^{2+} on the biosynthesis of chlorophyll in leaves of barley. – Physiol. Plant. 63: 293-298.
[83] Sun, H., Xia, N., Liu, Z., Kong, F., Wang, S. (2019): Removal of copper and cadmium ion from alkaline solution using chitosan-tannin functional paper materials as adsorbents. – Chemosphere 236: 124370.
[84] Swain, T., Hillis, W. E. (1959): The phenolics constituants of *Prunus domestica*-I. The quantitative analysis of phenolics constituents. – Journal of the Science of Food and Agriculture 10: 13.
[85] Tamas, L., Huttova, J., Zigova, Z. (1997): Accumulation of stress protein in intracellular spaces of barley leaves induced by biotic and abiotic factors. – Biol. Plant. 39: 387-394.
[86] Tsai, P. J., McInstosh, J., Pearce, P., Camden, B., Jordan, B. R. (2002): Anthocyanin and antioxidant capacity in Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) extract. – Food Res. Int. 35: 351-356.

http://www.aloki.hu ● ISSN 1589 1623 (Print) ● ISSN 1785 0037 (Online)
DOI: http://dx.doi.org/10.15666/aeer/1802_37573774
© 2020, ALÖKI Kft., Budapest, Hungary

[87] Vaculík, M., Konlechner, C., Langer, I., Adlassnig, W., Puschenreiter Alexander., Hauser, L. M. T. (2012): Root anatomy and element distribution vary between two *Salix caprea* isolates with different Cd accumulation capacities. – Environmental Pollution 163: 117-126.
[88] Van Assche, F., Clijsters, H. (1990): Effects of metals on enzyme activity in plants. – Plant Cell Environ. 13: 195-206.
[89] Vazquez, M. D., Poschenrieder, C., Barcelo, J. (1992): Ultrastructural effects and localization of low cadmium concentrations in bean roots. – New Phytologist 120: 215-226.
[90] Verbruggen, N., Hermans, C., Schat, H. (2009): Molecular mechanisms of metal hyperaccumulation in plants. – New Phytol 181: 759-77.
[91] Vezza, M. E., Llanes, A., Travaglia, C., Agostinia, E., Talanoa, M. A. (2018): Arsenic stress effects on root water absorption in soybean plants: physiological and morphological aspects. – Plant Physiology and Biochemistry 123: 8-17.
[92] Volland, S., Bayer, E., Baumgartner, V., Andosch, A., Lutz, C., et al. (2014): Rescue of heavy metal effects on cell physiology of the algal model system Micrasterias by divalent ions. – J. Plant Physiol. 171: 154-163.
[93] Vollmannova, A., Musilova, J., Toth, T., Arvay, J., Bystrick, J., Medvecky, M., Daniel, J. (2014): Phenolic compounds, antioxidant activity and Cu, Zn, Cd and Pb content in wild and cultivated cranberries and blue berries Intern. – J. Environ. Anal. Chem 94: 1445-1451.
[94] Wang, W., Keturi, P. H. (1990): Comparative seed germination tests using ten plant species for toxicity assessment of metals engraving effluent sample. – Water, Air, Soil Pollut. 52: 369-376.
[95] Xue, Z. C., Gao, H. Y., Zhang, L. T. (2013): Effects of cadmium on growth, photosynthetic rate and chlorophyll content in leaves of soybean seedlings. – Biol Plant 57: 587-590.
[96] Yazdi, M., Kolahi, M., MohajelKazemi, E., GoldsonBarnaby, A. (2019): Study of the contamination rate and change in growth features of lettuce (*Lactuca sativa* Linn.) in response to cadmium and a survey of its phytochelatin synthase gene. – Ecotoxicology and Environmental Safety 180: 295-308.
[97] Younis, M. E., Tourky, S. M. N., Elsharkawy. E. A. (2018a): Element content, growth and metabolic changes in Cu- and Cd stressed *Phaseolus vulgaris* plants. – Journal of Plant and Environmental Research 3: 9.
[98] Younis, M. E., Tourky, S. M. N., Elsharkawy, S. E. A. (2018b): Symptomatic parameters of oxidative stress and antioxidant defensesystem in *Phaseolus vulgaris* L. in response to copper or cadmium stress. – South African Journal of Botany 117: 207-214.
[99] Zemanova, V., Pavlík, M., Pavlíkova, D., Kyjakova, P. (2015): Changes in the contents of amino acids and the profile of fatty acids in response to cadmium contamination in spinach. – Plant Soil Environ 61: 285-290.
[100] Zouari, M., Ben Ahmed, Ch., Zorrig, W., Elloumi, N., Rabhi, M., Delmail, D., Ben Rouina, B., Labrousse, P., Ben Abdallaha, F. (2016): Exogenous proline mediates alleviation of cadmium stress by promoting photosynthetic activity, water status and antioxidative enzymes activities of young date palm (*Phoenix dactylifera L.*). – Ecotoxicology and Environmental Safety 128: 100-108.

http://www.aloki.hu ● ISSN 1589 1623 (Print) ● ISSN 1785 0037 (Online)
DOI: http://dx.doi.org/10.15666/aeer/1802_37573774
© 2020, ALÖKI Kft., Budapest, Hungary

ملخص

من أهم الملوثات الناتجة عن الأنشطة البشرية ، العناصر المعدنية النادرة ؛التي تسبب مشاكل ذات أهمية بالغة بالنسبة للبيئة و الصحة العمومية نذكر منها الكروم، الرصاص، و الكادميوم. يعتبر الكادميوم من أهم هذه العناصر بسبب حركيته العالية و سموميته اتجاه النباتات.

يهدف هذا العمل إلى دراسة تأثير الكادميوم على الجوانب البيومترية، الكيميوحيوية والفسيولوجية ، و التشريحية وكذلك تأثيره على محتوى المركبات الفينولية لدى نبتتي الفاصولياء و الفول . لهذا الغرض قمنا بتعريض النبيتات إلى تراكيز متزايدة من الكادميوم: 0,25 غ/ل ،0,5 غ/ل، و 1 غ/ل لمدة 21 يوم. أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها أن الكادميوم يقلل بشكل كبير من نسبة أنتاش البذور ، واستطالة الجذور ، والوزن الجاف للنبات ، وطول الساق و الجذر وعدد الأوراق والجذور الجانبية. في الوقت نفسه ، لوحظ انخفاض في محتوى الكلوروفيل والبروتين مع جميع التراكيز المستعملة بالنسبة للنباتين ؛ أما محتوى السكر والبرولين فقد زاد تحت تأثير 1غ/ ل من الكادميوم. كما لاحظنا زيادة محتوى البوليفينول الكلي بحوالي 43٪ و 32٪ في الجزء الهوائي و الترابي لنبتة الفاصولياء على التوالي . و 43٪ و 39٪ عند الفول. أما الفلافونويدات و الفلافونولات و العفص (التنين) سواء القابلة للذوبان في الماء أو المكثفة فقد أبرزت زيادة معتبرة مع أعلى تركيز للكادميوم. . كما قام الكادميوم بتغيير البنية التشريحية لجذور وسيقان النباتات, حيث لوحظ انخفاض في عدد وحجم أوعية نسيج الخشب وتأخر في تمايز هذا النسيج.

الكلمات الرئيسية

الكادميوم،.L *Vicia faba* ،L. *Phaseolus vulgaris*، المركبات الفينولية، التغيرات النسيجية ، النمو.

Abstract

Among pollutants generated by human activities, heavy metals; of particular concern for environment and public health include Chromium, Lead, and Cadmium. Cadmium (Cd) is one of the most important elements due to its high mobility and its toxicity to plants. Our study aims to evaluate effect of cadmium on biometric, biochemical and physiological aspects, anatomical changes and phenolic compounds content of two plants *Phaseolus vulgaris* L. and *Vicia faba* L. seedlings are exposed to increasing concentrations of Cd: 0.25; 0.5 and 1 $g.l^{-1}$ for 21 days. Results obtained show that cadmium considerably decreases seed germination percentage, embryonic radical elongation, dry weight of plants, stem / root length and leaves and lateral roots number. At the same time, a decrease in chlorophyll and protein content is observed with all treatments for two plants; however, sugar and proline content increased significantly with 1 $g.l^{-1}$ of Cd. Total polyphenols content increased by approximately 43% and 32% in aerial and underground part respectively in *Phaseolus vulgaris* , and 43% and 39% in *Vicia faba*. Flavonoids, flavonols, hydrolyzable tannins and condensed tannins showed a significant increase with the highest concentration of cadmium. Cadmium has also altered roots and stems anatomy of plants; a decrease in number and size of xylem vessels and a delay in xylem differentiation were observed.

Key words: cadmium, *Phaseolus vulgaris* L., *Vicia faba* L., growth, histological changes, phenolic compounds