



**UNIVERSITÉ DE BLIDA 1**

**Faculté des Sciences de la nature et de la vie**

**Département de Biotechnologie et Agro-écologie**



Laboratoire de Biotechnologie des  
Productions Végétales



## **MÉMOIRE DE MASTER**

En Sciences Agronomiques

Spécialité : Système de Production Agroécologique



### **EFFET DU STRESS METALLIQUE SUR LE DEVELOPPEMENT ET LA CROISSANCE DE LA LUZERNE ET DU TREFLE.**

*(Effect of metallic stress on the development and growth of alfalfa and clover.)*

Par

**Mohamed NEFRAOUI & Mounir KHOUIDMI**

Devant le jury composé de :

BOUCHENAK F.	Maître de Conférences – A	U. Blida 1	Présidente
DEGAICHIA H.	Maître de Recherche – B	CRAPast- Djelfa	Promoteur
HAMIDI Y.	Maître de Conférences – B	U. Blida 1	Co-promoteur
ABBAD M.	Maître de Conférences – A	U. Blida 1	Examineur

**Blida, Juillet 2022**

## **REMERCIEMENTS**

Nous exprimons notre reconnaissance à notre promoteur Dr. DEGAÏCHIA H. ainsi à Dr. HAMIDI Y. pour nous avoir supervisé directement. Tout en nous laissant une grande liberté pour gérer notre projet, ils ont toujours été présents et disponible quand cela s'avérait nécessaire.

Au Dr. BOUCHENAK F. qui a acceptée de présider le jury. Ainsi, nous remercions le Dr. ABBAD M. qui a accepté d'examiner notre modeste travail.

Mme. REGUIG B., à qui nous adressons tout notre respect et notre profonde gratitude pour ses précieux conseils et son aide.

Nous remercions également Mr. Walid Ingénieur au laboratoire d'Amélioration Végétale (Blida 1) qui, grâce à sa disponibilité, ce projet a pu voir le jour.

Nous adressons nos remerciements à tout le staff administratif et le corps enseignant du département des biotechnologies et surtout Pr. BENREBIHA F.Z. et Dr. MOUAS Y.

**NEFRAOUI M.**

**KHOUIDMI M.**

## **DEDICACE**

A toute personne qui a pris la peine de faire sortir ce document des rayons de la bibliothèque.

A celui qui à dépoussiérer ce document ...On vous dédie ce travail.

A celui qui veut copier des parties de ce travail ... n'oubliez pas que le plagiat est sanctionné par la loi.

**Mohamed & Mounir ;)**

## RESUME

### Effet du stress métallique sur le développement et la croissance de la luzerne et du trèfle.

A l'heure actuelle, la pollution des sols est l'un des problèmes environnementaux les plus étudiés. Dans ce contexte, le présent travail, a pour but de suivre les effets du cobalt et zinc sur la germination de la luzerne (*Medicago sativa* L.) et le trèfle blanc (*Trifolium repens* L.) et étudier quelque paramètre de croissance (ADN ; l'activité d'amylase), afin de se prononcer sur leur capacité germinative sous différentes conditions. La germination est réalisée in vitro, les graines sont mises à germer à une température de 25°C, en présence des solutions à différentes concentrations de Cobalt  $\text{CoSO}_4$  (0.5, 0.8, 1.2 g/l) et de Zinc  $\text{ZnSO}_4$  (0.7, 1, 1.5 g/l). Pendant une durée de 14 jours d'expérience, les analyses physiologiques montrent l'effet des métaux est bénéfique au déclenchement de la germination cas de zinc avec un taux de germination atteint à 90% pour toutes les concentrations utilisées, par contre, le cas de cobalt avec un taux de germination réduit à 29.17% chez la luzerne. Les ETM réduisent la vitesse du développement cellulaire et la synthèse des protéines. Chez la luzerne et le trèfle cultivés en milieu traité on observe une diminution de la teneur en ADN des graines de la luzerne sous l'effet du stress métallique du cobalt (0.8 ; 1.2 g/l) et du zinc à (0.7 ; 1 g/l), contrairement aux graines de trèfle où on a obtenu une teneur en ADN élevé. De fortes concentrations en Cobalt induisent une faible teneur en ADN ce qui se traduit par une sensibilité au ETM. La luzerne est donc plus sensible aux Cobalt et au Zinc. L'activité de l' $\alpha$ -amylase, quant à elle, est nettement accélérée par le Cobalt et le Zinc. Les résultats montrent que les graines de la luzerne et du trèfle tolèrent les ETM aux différentes concentrations, cependant, le zinc est un métal indispensable pour la germination.

**Mots clés :** Germination, croissance, Zinc, Cobalt, *Medicago sativa*, *Trifolium repens*

## ABSTRACT

### Effect of metallic stress on the development and growth of alfalfa and clover.

Soil pollution is one of the most studied environmental problems today. In this context, the present work aims to follow the effects of cobalt and zinc on the germination of alfalfa (*Medicago sativa* L.) and white clover (*Trifolium repens* L.) and study some growth parameter (DNA; amylase activity), in order to decide on their germination capacity under different conditions. Germination is carried out *in-vitro*, the seeds are germinated at 25°C, in the presence of solutions at different concentrations of Cobalt CoSO<sub>4</sub> (0.5, 0.8, 1.2 g.L<sup>-1</sup>) and Zinc ZnSO<sub>4</sub> (0.7, 1, 1.5 g.L<sup>-1</sup>). For a period of 14 days of experience, the physiological analyzes show the effect of metals is beneficial in triggering the germination case of zinc with a germination rate of 90% for all the concentrations used, on the other hand, the case of cobalt with a germination rate reduced to 29.17% in alfalfa. TM reduce the rate of cell development and protein synthesis. In alfalfa and clover grown in treated medium, a decrease in the DNA content of alfalfa seeds is observed under the effect of metal stress from cobalt (0.8; 1.2 g.L<sup>-1</sup>) and zinc at (0.7; 1 g.L<sup>-1</sup>), unlike clover seeds where a high DNA content was obtained. High Cobalt concentrations induce low DNA content which results in sensitivity to TM. Alfalfa is therefore more sensitive to Cobalt and Zinc. The activity of α-amylase, for its part, is markedly accelerated by Cobalt and Zinc. The results show that the seeds of alfalfa and clover tolerate TM at different concentrations, however, zinc is an essential metal for germination.

**Keywords:** Germination, growth, Zinc, Cobalt, *Medicago sativa*, *Trifolium repens*

## ملخص

### تأثير الإجهاد المعدني على تطور ونمو الفصّة والبرسيم.

يعد تلوث التربة من أكثر المشاكل البيئية التي تمت دراستها. في هذا السياق، يهدف هذا العمل إلى متابعة آثار الكوبالت والزنك على إنتاش الفصّة والبرسيم الأبيض ودراسة بعض معاملات النمو، لتقرير قدرتها على الإنبات في ظل ظروف مختلفة. يتم الإنتاش في المختبر، وتنتبت البذور عند درجة حرارة 25 درجة مئوية، في وجود محاليل بتركيزات مختلفة من الكوبالت (0.5، 0.8، 1.2 جم / لتر) والزنك (0.7، 1، 1.5 جم / لتر). بعد مدة 14 يومًا، أظهرت التحليلات الفسيولوجية أن تأثير المعادن مفيد في إثارة حالة الإنتاش الناتج عن الزنك بمعدل إنبات 90% لجميع التركيزات المستخدمة، ومن ناحية أخرى حالة الكوبالت مع إنبات مخفض إلى 29.17%. تقلل المعادن من معدل نمو الخلايا في الفصّة والبرسيم المزروع في الوسط المعالج، لوحظ انخفاض في محتوى الحمض النووي لبذور البرسيم تحت تأثير الإجهاد المعدني من الكوبالت (0.8؛ 1.2 جم / لتر) والزنك عند (0.7؛ 1 جم / لتر)، على عكس الفصّة حيث تم الحصول على نسبة عالية من الحمض النووي. تؤدي التركيزات العالية من الكوبالت إلى انخفاض محتوى الحمض النووي مما يؤدي إلى الحساسية لذلك فإن البرسيم أكثر حساسية للكوبالت والزنك. من جهة أخرى، يتم تسريع نشاط  $\alpha$ -amylase بشكل ملحوظ بواسطة الكوبالت والزنك. أظهرت النتائج أن بذور الفصّة والبرسيم تتحمل المعادن بتركيزات مختلفة، ومع ذلك، يعتبر الزنك معدنًا أساسيًا للإنبات.

الكلمات المفتاحية: إنتاش ، نمو ، زنك ، كوبالت ، *Medicago sativa*, *Trifolium repens*

# TABLE DES MATIERES

RESUME

ABSTRACT

ملخص

INTRODUCTION .....	1
<b>CHAPITRE I : RECHERCHE BIBLIOGRAPHIQUE .....</b>	<b>3</b>
<b>PARTIE 1 : LA LUZERNE ET LE TREFLE .....</b>	<b>3</b>
1.1. La luzerne : <i>Medicago sativa</i> L. ....	3
1.2. Le trèfle blanc ( <i>Trifolium repens</i> L.) .....	7
1.3. Intérêt des légumineuses.....	10
1.3.1. Intérêts agronomiques des légumineuses.....	10
1.3.2. Intérêt alimentaire des légumineuses.....	10
1.3.3. Intérêts scientifiques des légumineuses.....	11
<b>PARTIE 2 : LA GERMINATION .....</b>	<b>12</b>
1.4. Morphologie de la graine .....	12
a. Dormance et levée de dormance .....	14
b. Dormance embryonnaire.....	14
1.5. Conditions de la germination .....	15
a. Conditions internes .....	15
b. Conditions externes .....	16
1.6. Physiologie et biochimie de la germination.....	17
a. Phase d'imbibition.....	17
b. Phase de germination <i>stricto sensu</i> .....	17
c. Phase de post-germination .....	18
1.7. Activité enzymatique au cours de la germination.....	19
1.7.1. Nature biochimique des réserves .....	19
a. Les protéines .....	19
b. Les glucides.....	20
c. Les lipides.....	21
1.7.2. Enzymes d'hydrolyse des réserves.....	21
<b>PARTIE 3 : LES ELEMENTS DE TRACE METALLIQUE ET LEUR EFFET SUR LES PLANTES.....</b>	<b>23</b>
1.8. Origine des éléments trace métallique .....	23
1.9. Définition Les éléments de trace métallique .....	23

1.10.	Les différents types d'éléments de trace métallique.....	23
1.10.1.	Les métaux essentiels.....	23
1.10.2.	Les métaux non essentiels.....	23
1.11.	Mécanismes de toxicité des métaux trace métallique .....	24
1.12.	L'effet du zinc sur la plante.....	25
1.12.1.	Définition de zinc.....	25
1.12.2.	Rôle du zinc .....	25
1.12.3.	Transport du zinc dans les plantes .....	26
1.12.4.	L'effet de zinc sur le trèfle et la luzerne .....	27
1.13.	L'effet de cobalt sur la plante.....	28

\_Toc107167418

<b>CHAPITRE II</b>	<b>MATÉRIEL ET MÉTHODES .....</b>	<b>31</b>
2.1.	Objectif du travail : .....	31
2.2.	Matériel végétal .....	31
2.3.	Effet des ETM sur la germination de la luzerne et du trèfle .....	33
2.3.1.	Stérilisation et choix des graines :.....	33
2.3.2.	Mise en germination.....	33
2.3.3.	Application du stress métallique .....	34
2.3.4.	Cinétique de germination .....	35
2.3.5.	Taux de germination .....	35
2.3.6.	Moyenne de germination journalière.....	35
2.3.7.	Vitesse de germination .....	35
2.3.8.	Inhibition de la germination .....	36
2.3.9.	Réversibilité de l'action du cobalt et zinc : .....	36
2.3.10.	Détermination <i>in - silico</i> de la DL <sub>50</sub> du Zinc et du Cobalt .....	36
2.4.	Effets du Zinc et du Cobalt sur les paramètres biochimiques .....	36
2.4.1.	Détermination de la teneur en ADN .....	37
2.4.2.	Dosage de l' $\alpha$ -amylase.....	39
2.5.	Effet du cobalt et du Zinc sur le développement de la luzerne et du trèfle .....	41
2.5.1.	Dispositif expérimental .....	41
2.5.2.	Suivi de l'état phytosanitaire (Symptomatologie) .....	43



<b>CHAPITRE III_RÉSULTATS ET DISCUSSION .....</b>	<b>44</b>
3.1. Cinétique de germination.....	44
3.2. Évolution du taux de germination final.....	47
3.3. Moyenne de germination journalière .....	49
3.4. La vitesse de germination.....	51
3.5. Inhibition de la germination :.....	53
3.6. Réversibilité de l'inhibition de la germination.....	57
3.7. Teneur en $\alpha$ -amylase .....	58
3.8. Teneur en ADN : .....	62
3.9. Détermination in - silico de la DL <sub>50</sub> et la DL <sub>99</sub> du Zinc et du Cobalt .....	66
3.10. Observation symptomatologique des traitements.....	68
<b>DISCUSSION .....</b>	<b>69</b>
<b>CONCLUSION .....</b>	<b>74</b>
<b>ANNEXES .....</b>	<b>76</b>
ANNEXE 1_SOLUTION NUTRITIVE .....	76
ANNEXE 2_ANALYSE STATISTIQUE.....	77
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>79</b>

## LISTE DES FIGURES

Figure 1. 1 : Caractéristiques morphologiques de <i>Medicago sativa</i> .....	4
Figure 1. 2 : Caractéristiques morphologiques de <i>Trifolium repens</i> L.....	8
Figure 1. 3 : Morphologie d'une graine de Fabaceae .....	13
Figure 1. 4 : Courbe théorique d'imbibition.....	18
Figure 1. 5 : Structure d'amylopectine.....	20
Figure 1. 6 : Hélice d'amylose .....	21
Figure 2. 1 : la luzerne au stade floraison .....	32
Figure 2. 2 : trèfle blanc au stade floraison .....	33
Figure 2. 3 : Mise en germination des graines du trèfle et de la luzerne .....	34
Figure 2. 4 : Dosage de l'ADN (Degaichia, 2015).....	38
Figure 2. 5 : Dosage de l' $\alpha$ -amylase (Degaichia, 2015).....	40
Figure 2. 6 : Pré-culture de la luzerne et de trèfle .....	41
Figure 2. 7 : Culture hydroponique de la luzerne et du trèfle.....	42
Figure 3. 1 : Effets du stress métallique sur la cinétique de germination de la luzerne et du trèfle.....	46
Figure 3. 2 : Effets du stress métallique (cobalt et zinc) sur le taux de germination ..	47
Figure 3. 3 : répartition des concentrations en cobalt et zinc dans des sous-ensembles homogènes chez la luzerne.....	48
Figure 3. 4 : répartition des concentrations en cobalt et zinc dans des sous-ensembles homogènes chez le trèfle .....	49
Figure 3. 5 : Effets du stress métallique (cobalt et zinc) sur la variation de la moyenne de germination journalière du luzerne et trèfle .....	50
Figure 3. 6 : Effet du zinc et du cobalt sur le temps moyen de germination (par jours) de la luzerne.....	51
Figure 3. 7 : répartition des concentrations en cobalt et zinc dans des sous-ensembles homogènes chez la luzerne.....	52
Figure 3. 8 : Effet du zinc et du cobalt sur le temps moyen de germination (par jours) du trèfle .....	52
Figure 3. 9 : répartition des concentrations en cobalt et zinc dans des sous-ensembles homogènes chez le trèfle .....	53
Figure 3. 10 : L'effet du cobalt et du zinc sur l'inhibition de la germination de la luzerne .....	54

Figure 3. 11 : Répartition de l'inhibition de la germination de la luzerne dans des sous-ensembles homogènes .....	55
Figure 3. 12 : L'effet du cobalt et du zinc sur l'inhibition de la germination du trèfle ..	55
Figure 3. 13 : Répartition de l'inhibition de la germination du trèfle dans des sous-ensembles homogènes .....	56
Figure 3. 14 : Moyenne de la réversibilité de l'inhibition de la germination.....	57
Figure 3. 15 : Effet des ETM sur la teneur en $\alpha$ -amylase (U/ml) des graines de la luzerne .....	58
Figure 3. 16 : répartition de l' $\alpha$ -amylase dans des sous-ensembles homogènes chez la luzerne .....	59
Figure 3. 17 : Effet des ETM sur la teneur en $\alpha$ -amylase (U/ml) des graines du trèfle blanc.....	60
Figure 3. 18 : répartition de l' $\alpha$ -amylase dans des sous-ensembles homogènes chez le trèfle .....	61
Figure 3. 19 : Effet des ETM sur la teneur en ADN ( $\mu\text{mol/g MS}$ ) des graines de la luzerne .....	62
Figure 3. 20 : répartition de l'ADN dans des sous-ensembles homogènes chez la luzerne. ....	63
Figure 3. 21 : Effet des ETM sur la teneur en ADN ( $\mu\text{mol/g MS}$ ) des graines du trèfle blanc.....	64
Figure 3. 22: répartition de l'ADN dans des sous-ensembles homogènes chez le trèfle blanc.....	65

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. 1 : Valeur énergétique de la luzerne en fonction du stade et du cycle de Développement .....	6
Tableau 2. 1: Position systématique de la luzerne .....	31
Tableau 2. 2 : Position systématique du trèfle .....	32
Tableau 2. 3 : Tableau des concentrations en ETM utilisés .....	35
Tableau 2. 4 : Concentration en ETM dans la solution nutritive .....	42
Tableau 3. 1 : Analyse de variance pour le modèle de régression .....	66
Tableau 3. 2 : Paramètres de l'équation du modèle de régression .....	67
Tableau 3. 3 : Résultats de la DL <sub>50</sub> et de la DL <sub>99</sub> du Zinc et du Cobalt.....	67
Tableau 3. 4 : Récapitulatif symptomatologique.....	68

## LISTE DES ABREVIATIONS

ROS : *Reactive species of oxygen* (Espèces Réactive d'Oxygène)

ETM : Elément de trace métallique

MDG : *Mean daily germination* (Moyenne de germination journalière)

TMG : Temps moyen de germination

TG : Taux de germination

I% : Pourcentage d'inhibition

# **INTRODUCTION**

## INTRODUCTION

L'évaluation des risques liés à la pollution par les métaux lourds nécessite de disposer d'outils biologiques permettant d'apprécier l'impact des polluants sur les êtres vivants. En effet, si la typologie de la pollution par les métaux lourds est globalement bien définie par les analyses physico-chimiques, les questions récurrentes posées lors des évaluations de risque concernent la biodisponibilité des polluants du sol, leurs interactions possibles, et les effets potentiels de la pollution non caractérisée.

La toxicité des métaux lourds est intimement liée à leurs propriétés oxydo-réductrices et à la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), tels que l'anion superoxyde ou le radical hydroxyle, qui possèdent un électron non apparié. Au niveau cellulaire, les principales cibles des ROS sont l'ADN, les phospholipides membranaires et les acides aminés (Remon, 2006). L'activité de l'appareil photosynthétique représente également une cible importante pour les contaminants métalliques parce que l'inhibition des processus biochimiques et biophysiques de la photosynthèse affectent en entier la physiologie des plantes.

Les plantes possèdent des systèmes de stockage ou de détoxification qui leur permettent de diminuer les effets néfastes des métaux lourds. Selon les espèces, ces systèmes sont plus ou moins développés, mais, il semble à l'heure actuelle que trois mécanismes sont prépondérants : la modification de la perméabilité membranaire, qui permet de réduire l'entrée des métaux dans la cellule, le système antioxydant, qui limite les dégâts des ROS et la chélation intracellulaire, qui empêche l'activité de l'ion métallique (Remon, 2006).

La compréhension des mécanismes de toxicités et de tolérance des plantes exposées au stress métallique peut constituer un apport majeur à la compréhension et le développement des marqueurs biologiques ou biomarqueurs. Selon Weeks (1995), un biomarqueur est une réponse biologique à un produit chimique (comme les métaux lourds) qui induit un stress et peut donner une estimation de l'exposition ou une mesure des effets toxiques potentiels. Le biomarqueur peut aussi être défini comme tout changement observable et/ou mesurable au niveau moléculaire, biochimique, cytologique, physiologique, biologique ou comportemental qui révèle l'exposition présente ou passée d'un organisme à au moins une substance chimique à caractère polluant (Lagadic et Caquet, 1996).

Les légumineuses fourragères peuvent jouer un rôle important dans la rotation, dans la protection des sols contre l'érosion et la désertification et surtout dans l'amélioration des ressources fourragères et pastorales dans les zones marginales et difficiles ce qui permet une amélioration de la production animale.

Le choix des légumineuses fourragères est fondamental, car elles comportent une multitude d'espèces intéressantes. Parmi ces légumineuses deux espèces suscitent notre attention vu leur intérêt ; l'une pérenne, la luzerne cultivée (*Medicago sativa*L.), et l'autre, bisannuelle ou annuelle (selon les conditions climatiques) le trèfle (*Trifolium repens*). La première est considérée par Mauriès (1994) comme étant l'une des plantes fourragères les plus répandues dans le monde et sa culture remonterait à plus de 9 000 ans ; Chaabena *et al.* (2006) signale qu'elle est l'espèce fourragère la plus utilisée dans le Sahara et notamment les régions de Ouargla et Oued Righ.

Au cours de ce travail, nous avons choisi tout d'abord d'étudier les effets des ETM (cobalt  $\text{CoSO}_4$ , et Zinc  $\text{ZnSO}_4$ ), aux différentes concentrations sur la germination et la croissance des plantules de trèfle et de la luzerne. La physiologie de la germination est étudiée ainsi que la réponse de l'activité amylasique et la teneur en ADN le développement des symptômes de carence et/ou d'excès ainsi par des paramètres biochimiques tel que la teneur en ADN, et la teneur en  $\alpha$ -amylase. Cette étude a été débutée le mois de mars 2022 jusqu'au début du mois de juin 2022.

Trois chapitres composent ce mémoire.

Le premier chapitre présente une synthèse bibliographique, et il est composé de trois parties ; dans la première partie on discute l'intérêt des légumineuses, généralité sur le trèfle et la luzerne, dans la deuxième partie on parle sur la germination, est discutée dans la troisième partie sur les éléments de trace métalliques et leur effet sur les plantes

Le deuxième chapitre représente le matériel et méthode où sont décrits le matériel biologique utilisé, le protocole expérimental et les techniques d'analyse, la première étude intitulée ; Effet de quelques métaux lourds sur la germination et la croissance des plantules de la luzerne et du trèfle.

Le troisième chapitre présente, résultats et discussion.



**CHAPITRE I :**  
**RECHERCHE BIBLIOGRAPHIQUE**

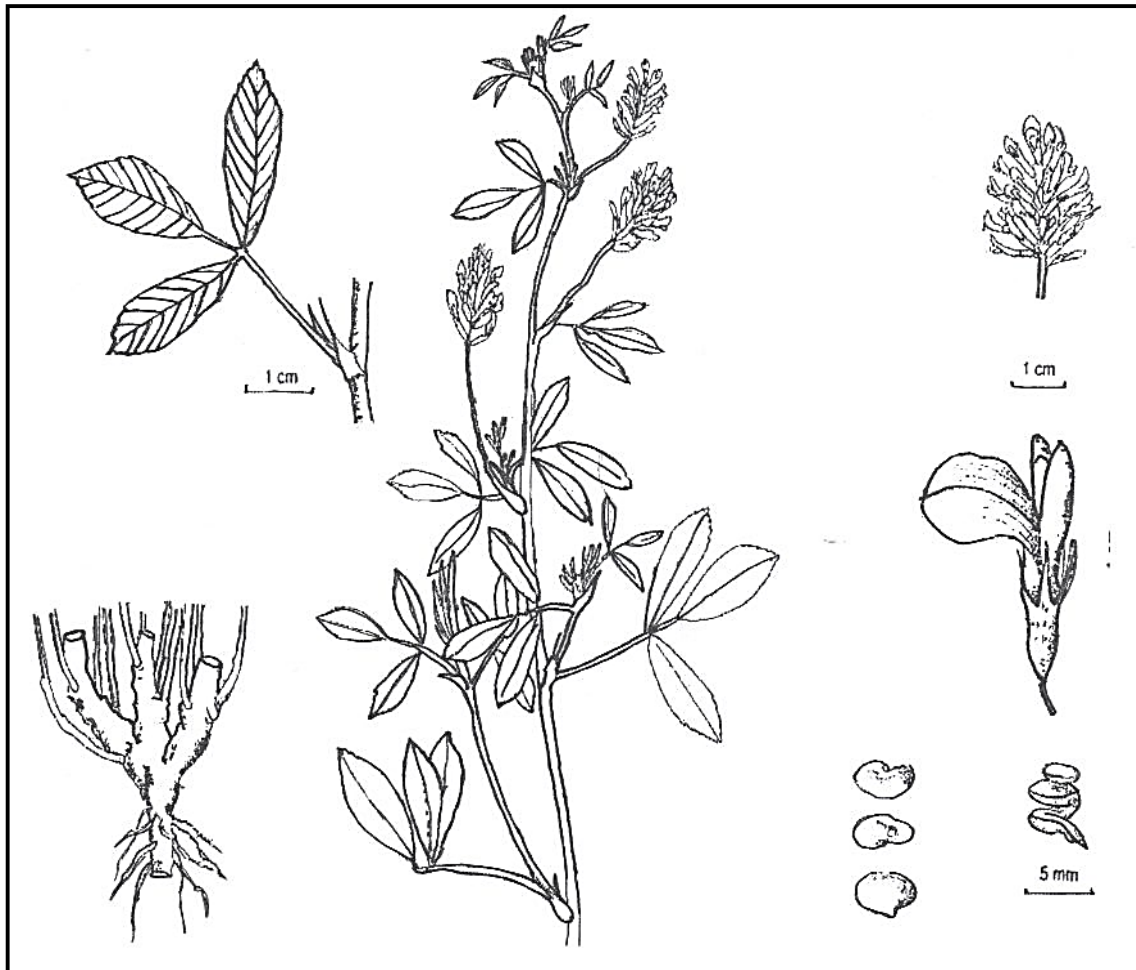
## PARTIE 1 : LA LUZERNE ET LE TREFLE

### 1.1. La luzerne : *Medicago sativa* L.

La luzerne (Figure 1.1) est une légumineuse de grande valeur (Planquert , 1966), elle dispose de qualités agronomiques et zootechniques incontestées (Mauriès et Paillat, 1997). Sa culture remonterait à 9 000 ans (Thenard., Mauriès, 2002). La plus productive de toutes les légumineuses, sauf conditions particulières du sol, est *Medicago sativa* L. (Huygue, 1966). C'est elle dont la repousse après la coupe est la plus rapide, même en saison sèche.

On s'accorde généralement à penser que la luzerne est originaire d'une zone délimitée par l'Asie mineure, la Transcaucasie, l'Iran et les hauts plateaux du Turkménistan (Whyte et al 1955), (Bolton, 1962), (Wilsie, 1962). Son centre d'origine le plus souvent mentionné est l'Iran. Elle a gagné le Bassin Méditerranéen puis l'Europe Occidentale, elle a été introduite en Amérique au siècle dernier (Lapeyronie,1982).

La luzerne cultivée appartient à deux sous espèces botaniques différentes de l'espèce *Medicago sativa* L. : La luzerne commune, *Medicago sativa* à fleurs pourpres, a évolué dans les zones arides, et la luzerne faucille, *Medicago falcata* à fleurs jaunes, qui possède une remarquable résistance au froid et aux maladies, ainsi que dans les conditions semi désertiques (Sinskaya, 1950). Les luzernes issues du croisement de ces deux sous espèces, *Medicago media*, sont bigarrées (de plusieurs couleurs), des caractères intermédiaires, vivaces et utiles (Bolton et al. 1962).



**Figure 1. 1 : Caractéristiques morphologiques de *Medicago sativa* L (Tela botanica, 2022)**

Les variétés de luzerne sont classées en trois types :

- Type méditerranéen : regroupe les variétés à repos végétatif peu marqué, production quasi continue, elles sont sensibles au froid ; cultivées dans les régions à hiver doux.
- Type intermédiaire : regroupe les variétés à repos végétatif plus ou moins marqué, elles sont moins sensibles au froid que les précédentes ; cultivées dans les régions à hiver peu froid à frais.
- Type nordique : regroupe les variétés à repos végétatif très marqué, elles sont résistantes au froid ; cultivées dans les régions à hiver froid et très froid.

Bien qu'ayant une aire de culture très large, la luzerne exige des conditions de

température et d'humidité suffisante, la température maximale autorisant la croissance est 37°C, la minimale au-dessous de laquelle la plante suspend son activité définit une autre limite, ce zéro de végétation est de 8 à 9°C (Lapeyronie, 1982).

La luzerne est très exigeante en eau. Pour élaborer un gramme de matière sèche, il faut 800 à 1 000 g d'eau. Il faut entre 12 000 et 13 000 m<sup>3</sup>/ha pour une année de culture (INRA Maroc, 1965), elle réussit bien dans les sols profonds, bien ameublés et s'adapte dans les sols riches en chaux ou du moins alcalins. Pour les sols légèrement acides, les amendements calciques constituent un usage de précaution et l'inoculation est envisageable (Hnatyszczym et Guais, 1988).

La luzerne est très exigeante en potassium, en acide phosphorique et en certains oligo-éléments tels que Mo, Zn, Cu, Fe, Cl, Br et Co.

La luzerne est la première légumineuse utilisée dans le monde. Elle assure :

- Une mobilisation des nutriments des réserves profondes du sol grâce à son puissant système racinaire.
- Un haut potentiel de production de qualité.
- Une souplesse d'exploitation (fauche, foin, pâturage, déshydratation et ensilage). (Birouk, et all 1997).
- Une masse importante de matière organique ainsi que des résidus azotés dans le sol après défrichement, grâce aux nodosités des racines.

En Algérie, la superficie consacrée à la luzerne pérenne, *Medicago sativa L.*, représente entre 0.37 et 0.71% de la superficie réservée aux cultures fourragères. Dans les régions sahariennes, la luzerne est la principale espèce fourragère cultivée. Les agriculteurs de la région ont façonné des populations qui arrivent à égaler et parfois même dépasser les populations introduites allant jusqu'à 12 coupes/an. (Chaabena, Abdelguerfi, 2001).

L'intervalle entre les coupes peut être ajusté afin d'obtenir des rendements élevés et une bonne persistance de la luzernière (Birouk, et all 1997), en effet, chaque repousse de luzerne se réalise à partir des réserves des pivots racinaires. Elle doit

être fauchée à 20-50% floraison, récoltée après, les tiges deviennent difficiles à consommer et à ruminer, et la digestibilité diminue rapidement (Lemaire, Allirand, 1993).

Dans un essai mené en Mitidja, BOUSSADI et HAMMADACHE (Boussadi, Hammadache, 1991) ont obtenu 8.36t MS/ha malgré une sécheresse automnale et hivernale, la période de production peut s'étaler de 3 à 5 mois selon la variété.

Le stade de récolte a un grand effet sur la valeur nutritive (Tableau 1.1) ; la proportion des feuilles représente 45% de la matière sèche de la plante au stade bourgeonnement et diminue pour ne constituer que le tiers lorsque la plante vieillit (Demarquilly et Weiss, 1970), la teneur en azote varie plus lentement que chez les graminées et suit l'évolution du rapport feuilles/tiges (Lemaire, et all 1985).

**Tableau 1. 1 : Valeur énergétique de la luzerne en fonction du stade et du cycle de Développement (Grenier G, et all 1978).**

<b>Cycle</b>	<b>Stade</b>	<b>UFL/kg MS</b>	<b>UFV/kg MS</b>
<b>Premier</b>	Végétatif	0.88	0.82
	Bourgeonnement	0.77	0.69
	Floraison	0.69	0.59
<b>Deuxième</b>	Végétatif	0.82	0.75
	Bourgeonnement	0.82	0.74
	Floraison	0.73	0.64
<b>Troisième</b>	Végétatif	0.84	0.76
	Bourgeonnement	0.78	0.70
	Floraison	0.73	0.65

La luzerne est la culture de foin par excellence, elle peut être cultivée en association avec des graminées (dactyle, féтуque élevée, brome), ou pure pour une exploitation en pâture où en fauche ou en vue de sa déshydratation industrielle (Lavoinn et Peres, 1993). Un excellent foin de luzerne doit contenir plus de 19% de MAT et avoir une digestibilité supérieure à 65% de la luzerne bien ensilée donne un produit appétant agissant favorablement sur la digestion. Elle donne une importante consistance tout en permettant une ingestion élevée.

L'utilisation en vert permet de bonnes performances de production et de croissance chez les bovins. Les vaches laitières peuvent produire 12 à 25 kg de lait par jour sans complémentation ; les jeunes bovins peuvent avoir une croissance de 800 à 1 000 g/jour sans complémentation (Grenier, et al. 1978).

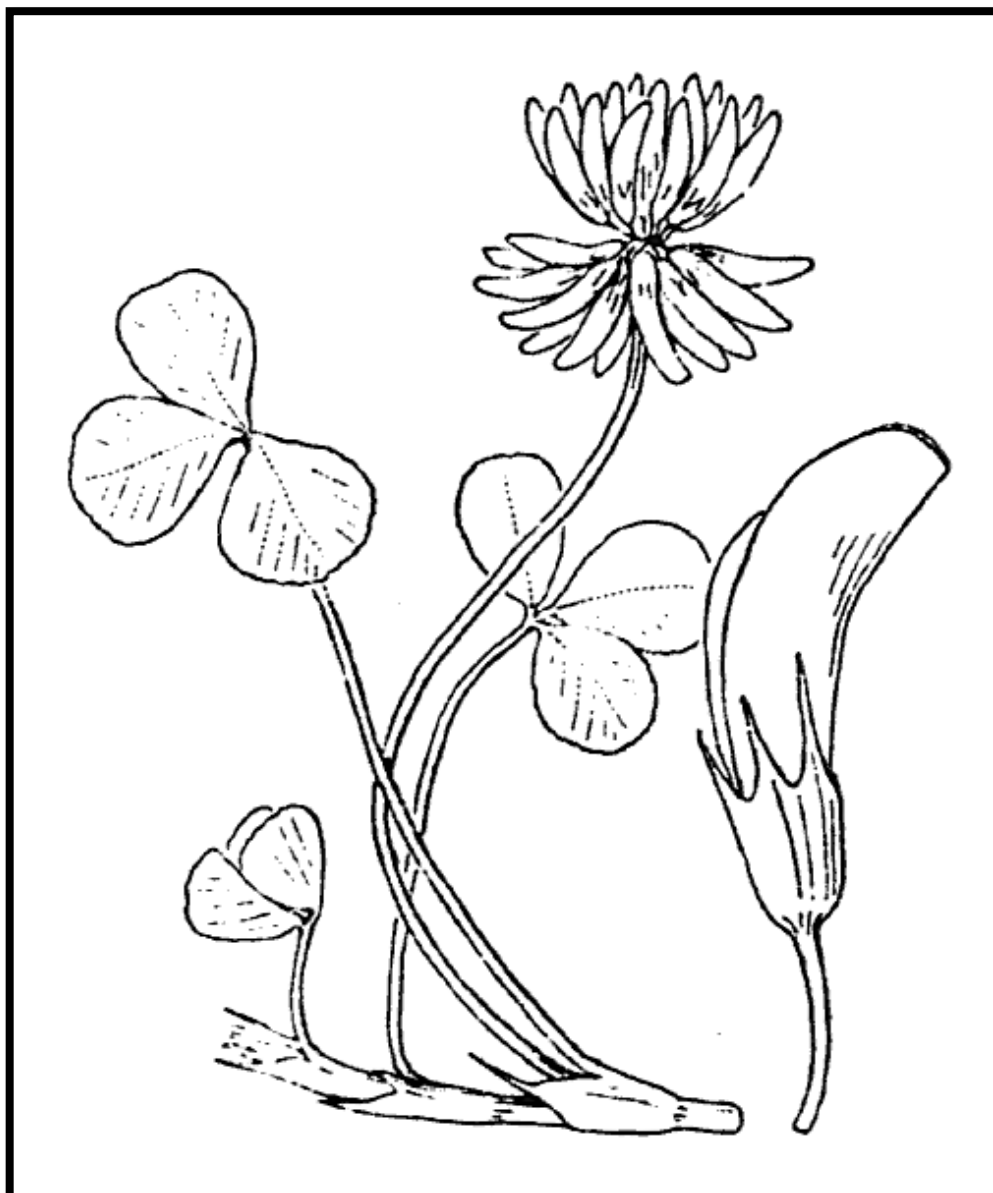
Comme la luzerne est cultivée de plusieurs façons et dans différents endroits, les méthodes d'installation varient et doivent être adaptées aux réalités locales. Elle est, cependant, la plante fourragère la plus indiquée pour un élevage bovin laitier.

Enfin, introduite dans la rotation, la culture peut rompre l'évolution parasitaire qui accompagne les rotations céréalières et freiner l'emploi des produits phytosanitaires (Picard, 1982).

## **1.2. Le trèfle blanc (*Trifolium repens* L.)**

Le trèfle blanc (*Trifolium repens* L.) (Figure 1.2) est une légumineuse rampante, herbacée et pérenne. Dans les régions plus chaudes, elle peut se comporter comme une annuelle qui pousse en été. Le trèfle blanc est une légumineuse fourragère largement utilisée, cultivée seule ou en mélange avec des graminées, dans des peuplements pluviaux ou irrigués.

Le trèfle blanc est un fourrage précieux, facile à manger et à haute valeur nutritive : il est de meilleure qualité que les légumineuses tropicales. Le trèfle blanc peut être utilisé comme pâturage, foin et ensilage pour de nombreuses classes de bétail (Heuzé et al., 2019). Il fournit plusieurs services environnementaux tels que la fixation de l'azote et la protection contre l'érosion des sols. En raison de ces caractéristiques, le trèfle blanc présente un intérêt particulier dans les systèmes d'agriculture biologique (Heuzé et al. 2019).



**Figure 1. 2 : Caractéristiques morphologiques de Le trèfle blanc (*Trifolium repens* L.) (Tela botanica, 2022)**

### **Les Exigences Agro - Climatiques**

1. Comportement du trèfle blanc au déficit hydrique Le trèfle blanc dispose d'un système racinaire double mais qui est en majeure partie superficiel : la plupart des racines ne descendent pas à plus de 10 cm dans le sol. Toutefois, quelques - unes d'entre elles peuvent atteindre de 60 cm de profondeur. Il en résulte que la majorité des trèfles blancs sont sensibles au déficit en eau. Toutefois les trèfles Ladino disposent d'un système racinaire plus puissant. D'après de nombreux auteurs, le trèfle blanc se révèle nettement plus sensible au déficit hydrique que les graminées les plus

sensibles, d'où la difficulté de l'utiliser dans les zones à fort déficit en eau, à moins que l'on dispose de l'irrigation.

**2. Comportement du trèfle blanc à la température** L'optimum de croissance du trèfle blanc des types - Sauvage et Hollandicum se situe entre 17 et 23 ° C. Pour le type Ladino », cet optimum peut se situer entre 21 ° et 29 ° C. > Pour le trèfle blanc, la température diurne revêt plus d'importance que la température nocturne. Les climats à amplitude thermique faible sont plus favorables à cette espèce que les climats contrastés. Le trèfle blanc nain ou sauvage supporte assez facilement une température basse en hiver ; par contre, les types Ladino y sont en général plus sensibles. On trouve toutefois une assez grande variabilité dans ce dernier type.

**3. Comportement du trèfle blanc à la lumière** Le trèfle blanc est très exigeant en lumière. BEINHART. (1962) indiquent que, pour un trèfle blanc de Nouvelle-Zélande, l'optimum est situé entre 19°C et 24°C avec 206 27 000 Lux.

La hauteur des plantes, c'est-à-dire des pétioles, dépend en grande partie du degré d'ombrage que subit la plante.



### **1.3. Intérêt des légumineuses**

Les légumineuses ont une place centrale dans les systèmes de production à la fois en tant que sources de fourrage vert et de foin de qualité, riche en protéines, et que tête de rotation incontournable par leur reliquat azoté, mais aussi par l'azote recyclé via les fumiers issus des élevages alimentés avec les fourrages suscités (Huyghe, 2006).

#### **1.3.1. Intérêts agronomiques des légumineuses**

Leur intérêt agronomique provient en premier lieu de leur aptitude à la fixation symbiotique de l'azote, qui leur permet de produire en abondance des protéines végétales même en l'absence de fertilisation azotée, d'où leur intérêt également dans le cadre d'une agriculture "durable" (réduction des intrants, préservation et enrichissement des sols en azote), (Somasegaran, Hoben, 1997). Elles exercent une influence très favorable sur la fertilité des sols grâce à la symbiose fixatrice d'azote avec les souches de *Rhizobium*. Elles jouent par conséquent un rôle primordial dans la rotation des cultures. (Baudoin, 2001).

Selon Abdelguerfi, (2001), *Lotus edulis* présente un nombre important de nodosité tout au long de son cycle de développement d'où l'intérêt à le conseiller pour améliorer les sols les moins fertiles.

#### **1.3.2. Intérêt alimentaire des légumineuses**

De nombreuses espèces cultivées appartiennent à la famille des *Fabaceae*. Elles constituent une source très importante de protéines et de lipides dans l'alimentation humaine et animale (Abdelguerfi, 2001). Elles constituent un apport de protéines peu coûteux mais néanmoins important (18 à 30% de la graine sèche). (Baudoin, 2001).

Les légumineuses spontanées sont une source alternative pour l'alimentation du bétail sachant que l'Algérie connaît une augmentation de son bilan énergétique et une nette diminution de la production fourragère (Hamadach, 1998), (Houmani, 1999). De ce fait, l'utilisation d'espèces spontanée afin de remédier à ce déficit peut augmenter le taux de couverture des besoins à plus de 65% (Nacef, et al. 2009).

### **1.3.3. Intérêts scientifiques des légumineuses**

Les légumineuses tiennent une part très importante des travaux accomplis dans des domaines aussi divers que l'agronomie, la génétique, l'entomologie, la phytopathologie et la physiologie (Baudoin. 2001).

Les principaux objectifs de recherche, sur les légumineuses à graines, cherchent à la fois à sécuriser la nodulation, à assurer la complémentarité entre les voies d'assimilation et de fixation de l'azote, et à assurer une meilleure remobilisation de l'azote des feuilles et des tiges vers les graines. Le point fort des légumineuses est leur coût énergétique faible et leur faible contribution aux gaz à effets de serre, directement liés à l'absence de fertilisation azotée (Somasegaran. 1994).

La réduction de la fertilisation azotée et l'amélioration des coûts et bilans énergétiques sont aujourd'hui un objectif commun à plusieurs filières dans la perspective, non seulement d'améliorer une compétitivité économique, ou de réduire des impacts environnementaux, mais surtout de développer des biocarburants (Baudoin. 2001).

Les légumineuses en générale et les *Lotus* en particulier sont d'excellents dépolluants telluriques qui peuvent être préconisé en phytoremédiation (Akiko, et al. 2006).

## **PARTIE 2 : LA GERMINATION**

La germination est un stade physiologique correspondant à la transition de la phase de vie latente de la graine sèche à la phase du développement de la plantule, elle commence dès que la graine sèche est hydratée (Anzala, 2006).

Plusieurs auteurs adoptent la conception de (Bewley, 1997) qui définit la germination d'une graine comme étant la somme des événements qui commencent avec l'imbibition et se termine par l'émergence d'une partie de l'embryon, généralement la radicule, à travers les tissus qui l'entourent.

On rapporte que l'eau est d'abord absorbée par les ouvertures naturelles de la graine, puis diffusée à travers ses tissus. Les cellules devenues turgescents, la graine grossit alors en volume et devient davantage perméable à l'oxygène et au dioxyde de carbone. À la suite de l'hydratation, sous l'effet de la dilatation de la graine, les téguments s'ouvrent, et l'embryon subit des changements métaboliques qui réamorcent sa croissance (Nivot, 2005).

Des enzymes commencent à dégrader les réserves contenues dans l'albumen ou dans les cotylédons, et les nutriments parviennent aux régions en croissance de l'embryon (Delgado, et al. 1994). La synthèse de nouvelles molécules donne lieu à une augmentation en taille de l'embryon jusqu'à ce que ce dernier émerge de la graine (Bray, et al. 2000). Le premier organe à émerger de la graine est généralement la radicule qui constitue la racine embryonnaire (Gimeno-Gilles. 2009). S'ensuit l'émergence de l'épicotyle et des cotylédons, qui constituent la partie aérienne de la plantule (Nivot, 2005).

Mais pour mieux comprendre le processus de la germination, il est préférable d'élucider la constitution de son site de déroulement, la graine.

### **1.4. Morphologie de la graine**

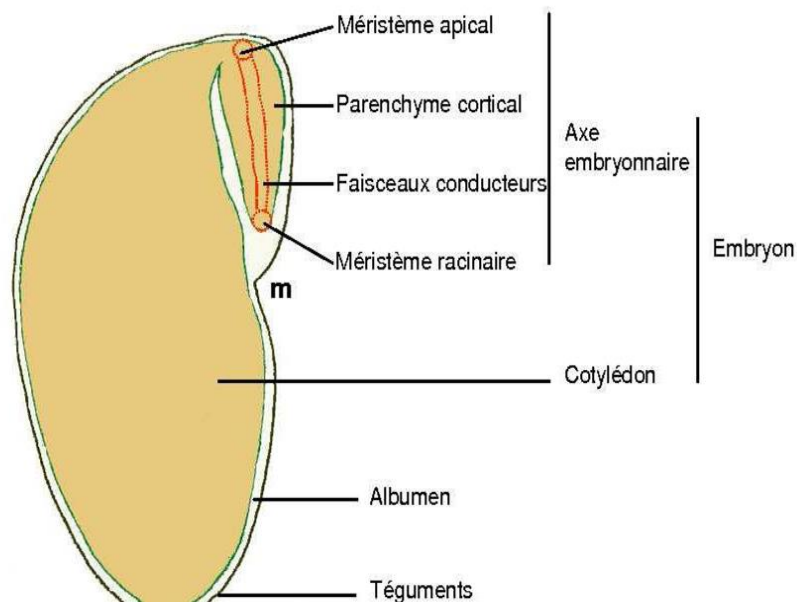
La graine est un organe de réserves, qui permet la pérennité de l'espèce par multiplication et franchissement des saisons défavorables (Anzala, 2006). Elle est constituée, de l'intérieur vers l'extérieur, de l'embryon, l'albumen et les téguments qui sont des tissus d'origines différentes (Nivot, 2005). (Figure 1.3)

L'embryon et l'albumen sont issus de la fécondation (Nouar, 2007). L'embryon, représentant l'élément principal de la graine, est formé d'une radicule, d'un ou plusieurs cotylédons, selon qu'il s'agit des monocotylédones, dicotylédones ou gymnospermes, d'un épicotyle, d'une plumule et enfin d'une hypocotyle qui relie les parties aériennes aux parties souterraines de la future plante (Nivot, 2005).

L'albumen constitue, chez les plantes à graines albuminées, la zone de stockage des réserves nécessaires au développement de la plantule avant l'acquisition de l'autotrophie ; mais pour celles à graines exalbuminées telle que la fève, ce sont les cotylédons de l'embryon qui assument ce rôle (Anzala, 2006).

A la périphérie de la graine, on retrouve les téguments, enveloppes protectrices plus ou moins résistantes (Young et al. 1986), qui dérivent des tissus de l'ovaire entourant le sac embryonnaire (Nivot, 2005).

Les téguments renferment des macrosclérides, épaissements ligneux responsables de la résistance physique, et des anthocyanines qui colorent la graine (Gimeno-Gilles C., 2009).



**Figure 1. 3 : Morphologie d'une graine de *Fabaceae***

### **a. Dormance et levée de dormance**

En règle générale, les graines mûrissent, deviennent quiescentes puis germent dès que l'eau, l'oxygène et la température favorable seront disponibles (Srivastava, 2002).

Néanmoins, il arrive chez plusieurs espèces qu'après la quiescence, les graines ne germeront pas et entrent en dormance, bien que les conditions environnementales leur sont optimales. La dormance est une caractéristique spécifique des graines qui peut se définir comme le blocage de la germination d'une graine intacte et viable malgré des conditions environnementales favorables (Finch-Savage et al.2006). Ceci permet à la graine d'échapper une germination spontanée qui pourrait survenir trop précocement (Bewley et al.1994). La dormance peut être due à des facteurs propres à la graine ou qui lui sont imposés par le milieu externe.

- **Dormance primaire**

Elle s'explique par des raisons internes à la graine à cause de l'embryon, dormance embryonnaire, ou à cause du tégument, dormance tégumentaire (Gimeno-Gilles, 2009). Elle est initiée par l'ABA endogène produit par l'embryon au cours de la maturation (Nivot, 2005). Cet état disparaît progressivement lors du stockage dans des conditions sèches ou grâce à des traitements imposés à la graine comme la stratification par le froid ou la chaleur (Bewley et al.1994), la lumière, les gibbérellines et d'autres hormones telles que les buténolides et l'oxyde nitrique (Anzala, 2006). La dormance primaire peut être tégumentaire ou embryonnaire.

- **Dormance tégumentaire**

Elle est due à une imperméabilité à l'eau, une limitation de l'entrée d'oxygène, une résistance mécanique lors de la sortie de la radicule, ou la présence d'inhibiteurs chimiques causant le piégeage d'oxygène, le blocage du développement embryonnaire ou l'inhibition de certaines enzymes (Gimeno-Gilles, 2009). Les téguments sont dégradés dans le sol grâce aux conditions climatiques tel que le gel, les incendies, le lessivage par de l'eau ou les animaux ; les techniques de scarification et de lixiviation sont les plus courantes (Bewley et al.1994).

### **b. Dormance embryonnaire**

D'après (Vallee et al.1999), elle a son origine dans l'embryon lui-même, c'est- à-dire

qu'elle n'est pas levée par des traitements effectués sur les téguments; elle survient lorsque l'embryon n'est pas complètement développé ou est causée par la présence d'inhibiteurs de croissance. Elle est due principalement à l'acide abscissique qui bloque l'action de l'acide gibbérellique, responsable du déclenchement de la germination (Nivot, 2005).

On peut lever les dormances embryonnaires par surmaturation en laissant la graine sur la plante, par stratification avec un froid humide (5 à 10°C), par anoxie qui consiste en la privation partielle d'oxygène entraînant un stress ou avec plus ou moins de lumière selon l'espèce (Gimeno-Gilles, 2009).

- **Dormance secondaire**

La levée de dormance permet en général la poursuite de la germination, mais il n'en est pas toujours ainsi, car il peut persister ou s'installer une dormance secondaire (Vallee et al.1999). Elle est imposée à la graine après la récolte et est due aux conditions de milieu telles que des températures trop basses, un manque d'eau, une semence enfouie trop profondément, pas assez de lumière, une teneur trop faible en oxygène et CO<sub>2</sub> (Anzala, 2006) et prend fin quand les bonnes conditions reviennent (Nivot, 2005).

## **1.5. Conditions de la germination**

Selon (Flesh, 1991) et (Anzala, 2006), la germination est influencée par des conditions internes et d'autres externes.

### **a. Conditions internes**

Sont propres à la graine elle-même telle que la maturité, la longévité et la photosensibilité (Chaussat, 1999).

**1. La maturité** : La graine doit être complètement différenciée morphologiquement et ses réserves bien constituées (Come, 1970).

**2. La longévité** : qui varie, selon les espèces, de quelques jours à quelques années (Vallee et al.1999). En effet, la capacité germinative est plus faible pour plantes ligneuses que pour les herbacés (Flesh, 1991).

**3. La photosensibilité** : En général, on distingue trois catégories de quant-à leur sensibilité et leur exigence à la lumière (Bewley, et al 1994) et (Thot, 2005) :

- Les graines à photosensibilité positive dont la germination est induite par la lumière.

- Les graines dites à photosensibilité négative et dont la germination est retardée ou inhibée par la lumière.

- Les graines apparemment non photosensibles et capables de germer indifféremment à la lumière ou à l'obscurité.

#### **b. Conditions externes**

Dépendent des paramètres environnementaux tels que l'eau, la température, l'oxygène et la lumière.

**1. L'eau** : La quantité d'eau nécessaire à la réhydratation des tissus varie, selon le type des graines et la nature des téguments, de 50% à 250% du poids sec de la graine (Bewley. 1997). Ces besoins en eau sont plus importants chez les graines protéagineuses que chez les Amylacées que chez les Oléagineuses (Bewley. et al 1999). L'eau y pénètre par voie passive sous l'effet de la forte succion que possèdent les graines. Cette capacité leur permet de germer dans des sols présentant de faibles teneurs en eau. Par contre si on met trop d'eau elles sont asphyxiées par l'absence d'oxygène (Bewley. 1997). Seules les plantes marécageuses telle que le riz y sont adaptées.

**2. La température** : Elle influe sur les activités enzymatiques, la perméabilité des membranes et l'entrée d'oxygène (Anzala, 2006). On peut donc parler de température optimale de germination qui s'entoure d'une plage de tolérance. On a, ainsi, une gamme de températures variant d'une espèce à l'autre et permettant de déterminer la date des semis (Bewley. 1997) ; (Anzala, 2006)

**3. L'oxygène** : qui est indispensable à la respiration et à la production d'ATP. La concentration en Oxygène nécessaire est inférieure à la concentration en Oxygène atmosphérique et représente 5 à 10%. (Bewley. 1997) ; (Vallee. et al.1999). Cependant, les teneurs perçues par l'embryon sont plus faibles que celles indiquées,

car l'oxygène traverse plusieurs couches en pénétrant à travers les téguments où la présence de phénols oxydables, inhibiteurs de germination, peut empêcher son passage par piégeage (Vallee et al.1999). C'est pourquoi, on procède au rinçage des graines pour débarrasser ces particules inhibitrices (Anzala, 2006).

**4. La lumière** : La germination est également influencée, selon les espèces, par l'éclairement (Gimeno-Gilles, 2009). La lumière est perçue par la graine au niveau des phytochromes qui sont impliqués dans la modulation des hormones endogènes, les gibbérellines et l'acide abscissique (Seo, et al.2009).

## **1.6. Physiologie et biochimie de la germination**

D'après,( Hopkins, 2003) ; la cinétique de prise d'eau permet de caractériser la germination en trois phases (Figure 1.4)

### **a. Phase d'imbibition**

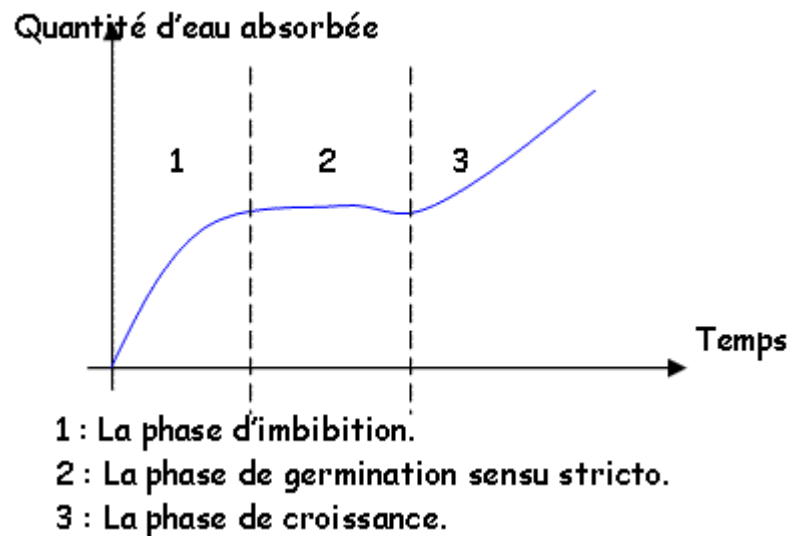
C'est une étape rapide et réversible ; caractérisée par une entrée massive et passive d'eau ; elle se déroule même si la graine n'est pas viable (Anzala, 2006). Cette entrée d'eau, servant à hydrater les tissus, est accompagnée d'une augmentation de la consommation d'oxygène attribuée à l'activation des enzymes mitochondriales (Chaussat, 1999). Les structures et les enzymes nécessaires à cette reprise d'activité sont supposé avoir résisté à la déshydratation et être présentes dans les graines sèches (Bewley. 1997).

### **b. Phase de germination *stricto sensu***

Caractérisée par une stabilité de la prise d'eau et de l'oxygène L'hydratation des tissus et des enzymes est totale ; l'activité respiratoire est ralentie (Anzala, 2006). C'est à ce stade que se préparent les événements métaboliques associés à l'allongement de la radicule qui émerge du tégument (Gimeno-Gilles, 2009).

Cette émergence, rendue possible grâce à l'élongation des cellules (Bewley. 1997), coïncide avec la fin de la deuxième étape et la perte de la tolérance à la dessiccation.





**Figure 1. 4 : Courbe théorique d'imbibition**

D'après (Finch-Savage al. 2006), l'eau entrée rend mobiles et active les phytohormones hydrosolubles en stock dans la graine telles que les gibbérellines qui sont véhiculées vers la couche à aleurones où elles vont activer la synthèse d'hydrolases,  $\alpha$ -amylases, nucléases et protéinases, nécessaires à la dégradation des réserves, à la division et l'élongation cellulaire.

Ainsi, ajoute la même source :

1. **Les  $\alpha$ -amylases** : hydrolysent l'amidon stocké dans l'albumen et libèrent des molécules de glucose, substrat du métabolisme respiratoire.
2. **Les nucléases** : permettent la libération d'acides nucléiques impliqués dans la formation des cytokinines, hormones qui stimulent la division cellulaire.
3. **Les protéases** : lysent les réserves protéiques qui favorisent la formation de phytohormones telles que l'auxine responsable de l'élongation des cellules.

### **c. Phase de post-germination**

Distinguée par une reprise de l'absorption d'eau et une élévation de la

consommation d'oxygène, dues probablement à l'activité des enzymes néosynthétisées (Anzala, 2006). Certains auteurs ne considèrent pas cette phase comme faisant partie de la germination au sens strict (Hopkins, 2003).

## **1.7. Activité enzymatique au cours de la germination**

La reprise d'activités métaboliques est liée à l'augmentation du niveau d'activité de certaines enzymes que possède la graine et qui sont étroitement liées avec son contenu en réserves (Bewley.1997).

### **1.7.1. Nature biochimique des réserves**

Ces réserves ont une grande importance car elles assurent l'alimentation du jeune embryon en cours de germination avant d'atteindre son autotrophie (Nivot, 2005). Elles occupent 80 % de la taille de la graine (Bewley.1997). Même dans de petites graines comme celles de Laitue (*Lactuca sativa*) pesant seulement quelques mg les réserves peuvent autoriser la croissance de l'embryon pendant plusieurs jours (Nivot, 2005). Chez des graines comme la fève pesant jusqu'à 1 g les réserves sont suffisantes pour plusieurs semaines (Bewley.1997) et (Nivot, 2005). Ces réserves sont également importantes pour la nutrition de l'homme et des animaux.

#### **a. Les protéines**

Les légumineuses représentent une source importante de protéines végétales; la fève, par exemple, en contient 5,4 g aux 100 g (Malki, et al.1999). Plusieurs auteurs, entre autres ce dernier, subdivisent les protéines, selon leur solubilité, en 4 classes : les albumines, les globulines, les gluténines et les prolamines.

Les légumineuses contiennent des légumines et des vicilines appartenant à la classe des globulines. Elles sont stockées dans des corps protéiques de 0,1 à 25 $\mu$  de diamètre, grains d'aleurones, répartis dans tout l'organe de réserves, les cotylédons (Anzala, 2006).

Ces corps protéiques contiennent 70-80 % de protéines, 10 % de phytine et des enzymes telles que les protéases, les phosphatases, les glucidases, les phytases et les ribonucléases (Bewley.1997) et (Anzala. 2006). La phytine, sel complexe de P, K,

Mg, Ca, Zn, et Fe, représente une vraie réserve minérale pour la graine (Bewley.1997).

## b. Les glucides

Ils sont présents sous forme d'amidon et de sucres solubles :

1. **L'amidon** : constitue la forme principale des réserves glucidiques, notamment chez les graminées dont il forme presque tout l'albumen (Zaghouane, 1991). Quoique sa présence chez la plupart des Légumineuses, soit moins importante que celle des protéines, la fève (*Vicia faba* L.) en contient beaucoup plus. L'amidon est formé de deux polysaccharides (dont 15 à 30 %) et l'amylopectine (70 à 85 %) (Figure 1.5). L'amylopectine est organisée en feuillets entre lesquels l'amylose forme une zone amorphe (Hopkins, 2003). (Figure 1.6)

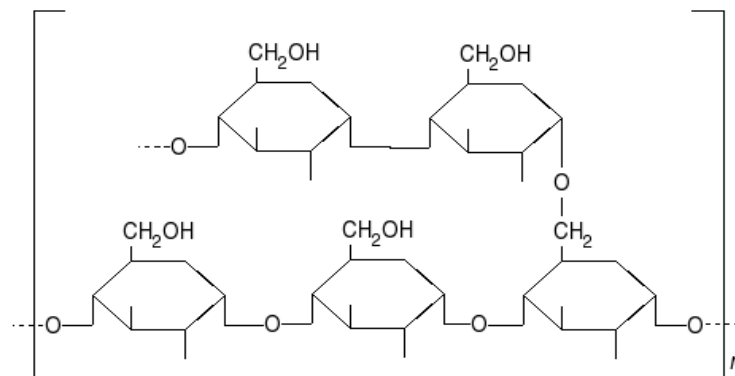
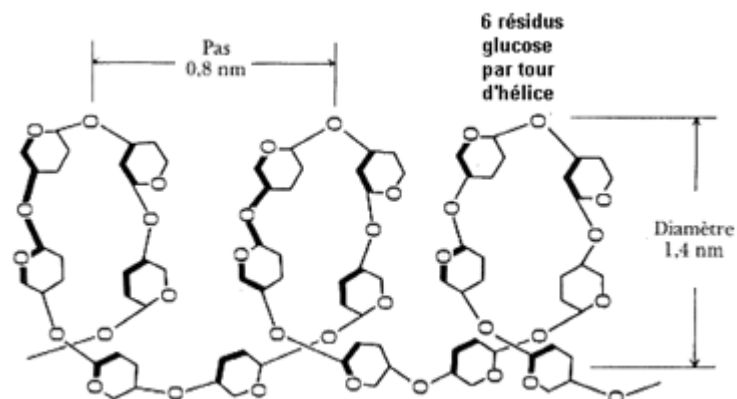


Figure 1. 5 : Structure d'amylopectine



## **Figure 1. 6 : Hélice d'amylose**

**2. Les sucres solubles** : L'hydrolyse enzymatique de l'amidon donne naissance au maltose et à la dextrine, qui sont des formes intermédiaires et qui se dégradent, à leur tour, en glucose (Anzala, 2006). Il est à noter que les sucres solubles sont en petites quantités dans la graine au repos (Bewley, 1997).

### **c. Les lipides**

Bien que leur présence dans les graines des Légumineuses soit moins importante en comparaison avec les protéines et les glucides, les lipides constituent la forme de réserve la plus répandue, dans 9/10 des plantes (Gimeno-Gilles, 2009). La plus grande partie de ces réserves est constitué d'ester, de glycérol et d'acides oléique et palmitique, présents en gouttelettes de différentes tailles appelées oléosomes (Vallee, et al. 1999).

#### **1.7.2. Enzymes d'hydrolyse des réserves**

Elles aboutissent à la formation de substrats qui entrent dans la synthèse des constituants des nouvelles cellules ou qui seront utilisés par la voie respiratoire (Heller R., et al. 1998). Notons que chaque catégorie de graines possède des enzymes en relation avec son contenu en réserves ; nous trouvons, ainsi, l'amylase, la maltase et la phosphorylase servant à hydrolyser les réserves amylacées ; les lipases pour les lipides et les protéases pour les protéines (Nivot, 2005) et (Gimeno-Gilles, 2009) rapportent que certaines de ces enzymes sont déjà présentes dans la graine sous une forme inactive et la réhydratation des tissus permet leur activité ; c'est le cas des protéases et des enzymes de la respiration.

### **d. Mise en évidence de l'activité amylasique**

La germination des graines requiert une activité enzymatique très importante pour la mobilisation des réserves et le développement de l'embryon (Hopkins, 2003). On assiste à une reprise de synthèse d'enzymes, notamment les amylases :  $\alpha$ -amylase,  $\beta$ -amylase et enzymes débranchantes (Lugan, 2008). Ce dernier ajoute que ces hydrolases néosynthétisées en réponse à l'acide gibbérellique, sont capables d'hydrolyser l'amidon, et de libérer le glucose qu'il contient.

L'hydrolyse d'amidon se passe comme suivant (Heller, et al.1998), (Hopkins, 2003) et (Lugan, 2008) :

L' $\alpha$ -amylase est une enzyme endo-glucosidase qui catalyse l'hydrolyse aléatoire des liaisons glucosidiques  $\alpha$  (1-4) de l'amylose et de l'amylopectine. Les produits d'hydrolyse sont des oligoholosides de 6 à 7 résidus en moyenne et un disaccharide réducteur, l' $\alpha$ -D- glucosyl-(1-4)-D-glucose appelé maltose.

La  $\beta$ -amylase est une exo-glucosidase qui catalyse l'hydrolyse de la liaison glucosidique  $\alpha$  (1-4) à partir des extrémités libres, non-réductrices, de l'amylopectine, et libère séquentiellement du maltose.

Les liaisons  $\alpha$  (1-6) de l'amylopectine n'étant pas reconnues par la  $\beta$ -amylase, l'hydrolyse s'arrête quand l'enzyme atteint les points de branchement. La molécule d'amylopectine partiellement hydrolysée est appelée dextrine limite. Elle ne peut être ultérieurement dégradée qu'après l'action d'enzymes spécifiques des liaisons glucosidiques  $\alpha$  (1-6), les enzymes débranchantes ou déramifiantes. Le maltose, ainsi produit de l'hydrolyse enzymatique de l'amidon par les amylases, sera hydrolysé par l' $\alpha$ -glucosidase (maltase) pour finir en glucose (Prnovost M., 2010).

## **PARTIE 3 : LES ELEMENTS DE TRACE METALLIQUE ET LEUR EFFET SUR LES PLANTES**

### **1.8. Origine des éléments trace métallique**

Les éléments de trace métalliques sont des constituants naturels de tous les écosystèmes. Ils se trouvent dans l'atmosphère, l'hydrosphère, la lithosphère et la biosphère. Leur distribution dans l'environnement procède à deux origines : origine naturelle et anthropique (Aoun. 2008).

### **1.9. Définition Les éléments de trace métallique**

Un élément de trace métallique (ETM) est tout métal de densité supérieure à 5 g/cm<sup>3</sup>, de numéro atomique Élevé et présentant un danger pour l'environnement (Di Benedetto et al. 1997). Par ordre décroissant de toxicité, les métaux sont classés comme suit : Hg > Cr > Ti > Mo > Cu > Ni > Pb > Zn

### **1.10. Les différents types d'éléments de trace métallique**

#### **1.10.1. Les métaux essentiels**

Les métaux essentiels sont des éléments indispensables à l'état de trace pour de nombreux processus cellulaires (métabolisme des protéines, des glucides et des lipides, ...). Ils se trouvent en très faible proportion dans les tissus biologiques. Certains peuvent devenir toxiques lorsque la concentration dépasse un certain seuil. C'est le cas du cuivre (Cu), du nickel (Ni), du zinc (Zn), fer (Fe), et du Cobalt (Co) ... (Behanzin et al. 2015).

#### **1.10.2. Les métaux non essentiels**

Les métaux non essentiels ont un caractère polluant. Ils n'ont aucun effet bénéfique connu pour la cellule. Ils exercent des effets toxiques sur les organismes vivants même à faible concentration. C'est le cas du plomb (Pb), du mercure (Hg), du cadmium (Cd), ... (Baker et Walker 1990) ;( Behanzin et al. 2015).

### **1.11. Mécanismes de toxicité des métaux trace métallique**

Les mécanismes de toxicité des métaux peuvent être répartis en deux catégories : la toxicité peut être engendrée par l'interaction directe entre les ions métalliques et les protéines, l'ADN ou d'autres molécules dont le comportement sera modifié, ou elle peut être le fruit du stress oxydant causé par les métaux, Comme suit :

#### **a. interaction avec les protéines et l'ADN**

Des interactions entre les cations  $Cd^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$  et  $Pb^{2+}$  et les protéines sont rapportées dans la littérature. Les protéines peuvent être affectées de deux façons : les cations peuvent modifier la structure tridimensionnelle des protéines, par exemple en se liant aux groupements thiols des acides aminés qui la composent, ou ils peuvent se substituer aux cofacteurs métalliques des métalloprotéines. Dans les deux cas, les protéines sont dénaturées et leur fonction n'est plus assurée (Moulis, 2010); (Sharma et al. 2012). Les ions métalliques peuvent également interagir avec l'ADN, c'est notamment le cas du nickel, du chrome et du platine (Sharma et al. 2012). Le nickel peut par exemple, par compétition avec le magnésium, modifier la condensation de la chromatine et réprimer ainsi l'expression de gènes (Briat and Lebrun, 1999).

#### **b. Accumulation de dérivés réactives de l'oxygène et stress oxydant**

Les métaux peuvent engendrer l'accumulation de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS, pour *reactive oxygen species*), provoquant un état de stress oxydant qui semble être l'une des principales causes de la toxicité des métaux. Les ROS sont produits par tous les organismes aérobies, c'est-à-dire les organismes dont les voies métaboliques utilisent le dioxygène comme accepteur d'électrons, tels que les plantes. Ils interviennent dans différents processus cellulaires, par exemple des processus de signalisation ou de défense. En conditions de fonctionnement normales, leur production et leur suppression sont régulées par des mécanismes antioxydants afin de maintenir la balance de potentiel oxydo-réducteur à l'équilibre. La cellule est en état de stress oxydant lorsque cet équilibre est rompu et que le système antioxydant de la cellule est submergé par une quantité trop importante de ROS. De nombreuses conditions de culture peuvent engendrer un stress oxydant chez les plantes : carences nutritives, sécheresse, chocs thermiques, radiations ionisantes, contraintes

mécaniques, polluants, etc. L'exposition aux métaux est également l'une des causes du stress oxydant (Ercal et al. 2001; Hall, 2002; Mittler, 2002).

## **1.12. L'effet du zinc sur la plante**

### **1.12.1. Définition de zinc**

Le zinc est un élément chimique de symbole Zn et de numéro atomique 30. Sa masse atomique est de 65,39 g/mole.

Le zinc est absorbé sous forme des cations bivalents  $Zn^{2+}$ . C'est un activateur de nombreuses enzymes tel que l'alcool déshydrogénase (ADH) qui catalyse la réduction d'acétaldéhyde en éthanol. En plus, le zinc est l'activateur de l'enzyme anhydrase carbonique, enzyme essentielle pour l'utilisation de l'acide carbonique. De même, il contrôle la synthèse de l'acide indolacétique qui est un régulateur de croissance très important pour la plante (El allaoui A, 2007).

Le zinc est classé comme le 24ème élément le plus abondant dans la croûte terrestre avec une concentration de 70mg/Kg. Les principaux minerais du zinc sont des sulfures tels que la sphalérite ( $ZnS$  cubique) et la wurtzite ( $ZnS$  hexagonal), des carbonates tels que la smithsonite ( $ZnCO_3$ ) et des silicates tels que la willémitte ( $Zn_2SiO_4$ ).

### **1.12.2. Rôle du zinc**

Le zinc assure plusieurs rôles au niveau de la cellule :

- Il entre dans la composition d'un très grand nombre d'enzymes (plus de 300), il remplit trois types de fonctions : catalytiques, co-catalytiques ou structurales.
- Il intervient dans le métabolisme des sucres, des protéines et des phosphates.
- Il est impliqué dans la réplication et la transcription de l'ADN, via des métalloprotéines, et donc dans la régulation de l'expression des gènes.
- Il influence l'intégrité et la perméabilité des membranes et protège les lipides et les protéines membranaires du stress oxydant (Sadeghzadeh 2013). Chez les végétaux, une carence en zinc entraîne des modifications morphologiques des feuilles (taille réduite et déformation).



Chez les dicotylédones un raccourcissement de l'entre-nœud et de la tige est observé (Kabata-Pendias, et al. 2010; Sadeghzadeh 2013).

### **1.12.3. Transport du zinc dans les plantes**

Le transport du zinc dans la plante s'effectue grâce trois mécanismes : l'absorption, la translocation et la séquestration.

#### **e. Absorption**

L'absorption est le mécanisme de transport du zinc du milieu de culture vers les racines. Elle est assurée par toute la surface des racines qui est en contact avec l'eau et ses substances dissoutes. La vitesse d'absorption du zinc dépend de l'espèce et des compositions et concentration du milieu de croissance (Tsonev et Lidon 2012). L'absorption du zinc se fait par des transporteurs spécifiques appelés ZIP (Zinc-regulated transporters, Iron-regulated transporter-like Protein). Il est transporté sous forme de cation libre ou bien sous forme chélatés avec les phytosidérophores.

#### **f. Translocation**

La translocation est le transport du Zn au sein de la plante des racines vers les autres parties de la plante. Elle varie en fonction de l'espèce végétale et de la forme du métal. Le déplacement du zinc des racines vers les parties aériennes est effectué à travers le xylème par circulation de la sève brute, Translocation du zinc à travers les vaisseaux du xylème s'effectue par l'intermédiaire des symplastes et apoplastes. (Marcato 2007).

#### **g. Séquestration**

La séquestration est la complexation des métaux par la méthionine, la phytochélatine et le Glutathion pour les transporter vers les vacuoles et les inactiver (Sheoran et al, 2009). Chez les plantes non accumulatrices, le zinc est séquestré dans les vacuoles des racines (Lasat et al. 2000). Chez les plantes hyper-accumulatrices, la séquestration se fait dans les vacuoles des parties aériennes (Milner et Kochian 2008).

#### **1.12.4. L'effet de zinc sur les plantes**

##### **h. En cas d'excès**

L'excès métallique est un facteur de stress entraînant des modifications importantes au niveau des processus physiologiques des plantes (Benavides, et al. 2005; Sharma et al. 2012). A fortes concentrations, les ions  $Zn^{2+}$  engendrent une toxicité 5 Synthèse bibliographique comparable à celle provoquée par des ETM qui n'ont pas de fonction connue dans le métabolisme de la plante. La modification majeure concerne le noyau des cellules de l'extrémité des racines ; la chromatine est fortement condensée et certaines des cellules corticales montrent la rupture et la dilatation de leur membrane nucléaire en présence de 7.5 mM de zinc. En plus du cytoplasme qui perd sa structure, la désintégration d'organites et le développement de vacuoles sont aussi observés (Garty, et al.1992 ; Rout et al 2009).

##### **i. En cas de carence**

###### **a. Définition de chélation**

La chélation est la formation des complexes entre les métaux et les peptides ou les acides organiques ou bien entre les métaux et les ions inorganiques. Elle s'effectue au niveau de la paroi cellulaire ou à l'intérieur du cytoplasme. Il en résulte que le métal ne peut pas interférer avec les réactions métaboliques sensibles de la plante (Kabata-Pendias, et al 2010).

###### **b. Chélation du zinc dans la cellule**

Si l'absorption du zinc est assez bien décrite dans les plantes, peu de données sont en revanche disponibles concernant son stockage dans les cellules. Or, un mécanisme récurrent de détoxification des métaux lourds au sein de la cellule (aussi bien chez les plantes que dans d'autres organismes) repose sur la fixation du métal à un ligand (chélation) puis éventuellement à la neutralisation de ce complexe par compartimentation (séquestration) grâce à un transporteur spécifique (Briat, et al 1999). Quatre types de ligands de cations métalliques sont connus chez les plantes : les métallothionéines, les phytochélatines, les acides aminés et organiques (Rauser, 1999; Clemens, 2001). Bien que les phytochélatine jouent un rôle majeur dans la

détoxication du cadmium (Cobbett, 2000; Cobbett et Goldsbrough, 2002), il n'a pas été montré à ce jour qu'elles interviennent dans la détoxication du zinc.

Les plantes utilisent l'oxygène, via le métabolisme aérobie, pour obtenir l'énergie nécessaire à leur croissance et à leur développement. Cependant, la réduction de l'oxygène par les cytochromes de la chaîne respiratoire s'accompagne inévitablement d'une production de radicaux oxygénés. En effet, lorsque cette réduction est incomplète, des molécules hautement réactives dérivées de l'oxygène (ROS = Réactive Oxygène Species) sont produites, parmi lesquelles des radicaux libres comme le radical superoxyde ( $O_2^-$ ), le radical perhydroxyle ( $HO_2^-$ ), le radical hydroxyle ( $-OH$ ), le radical peroxyde ( $RO_2^-$ ) et le radical alkoxyde ( $RO^-$ ) ainsi que des formes non radicalaires comme le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ). Parallèlement, les chaînes de transfert d'électrons au niveau de l'appareil photosynthétique sont également capables de produire une grande quantité de ROS (Parent et al, 2008)

### **1.13. L'effet de cobalt sur la plante**

Découvert en 1735 par Brandt, le cobalt est un métal de transition de numéro atomique  $Z = 27$ . C'est un métal blanc-bleu, malléable, ductile et ferromagnétique.

Le cobalt est pratiquement inoxydable à température ordinaire, il s'oxyde pour des températures supérieures à  $300^\circ C$  (Barceloux, 1999; Bresson et al, 2009a).

#### **1.13.1. Le rôle de cobalt**

Le cobalt est un composant essentiel de plusieurs enzymes et coenzymes, notamment des cobalamines et en particulier de la vitamine B12 (Kobayashi and Shimizu, 1999; Martens et al, 2002). La vitamine B12 est présente chez de nombreux êtres vivants, elle est indispensable au développement de certaines bactéries et des animaux. Chez l'homme, par exemple, l'apport journalier d'environ  $1 \mu g$  de vitamine B12 est nécessaire (Martens et al. 2002). Le caractère essentiel du cobalt et de la vitamine B12 chez les plantes et les algues est en revanche discuté, leurs éventuels rôles physiologiques étant peu connus (Palit et al, 1994). Il pourrait dépendre des espèces considérées.

Chez les plantes supérieures, les enzymes dépendant de la vitamine B12 ont été perdues et remplacées par d'autres enzymes indépendantes vis-à-vis de cette

vitamine (Blaby-Haas and Merchant, 2012). De nombreux effets bénéfiques ont été observés lors de l'exposition des plantes supérieures à de faibles concentrations de cobalt, sans que le rôle joué par celui-ci soit clairement précisé : croissance stimulée, senescence retardée, meilleure résistance à la sécheresse et aux attaques microbiennes, régulation de la synthèse des alcaloïdes et de l'éthylène, synthèse de chlorophylle stimulée, etc. (Kabata-Pendias, 2011; Palit et al., 1994).

Les plantes peuvent également bénéficier de l'apport de cobalt lorsqu'elles sont en carence de nitrates (Palit et al, 1994). Ce phénomène a été observé avec des plantes légumineuses (Ahmed and Evans, 1959) et non-légumineuses (Hewitt and Bond, 1966). Il semble être le fait d'une symbiose entre la plante et les bactéries de sa rhizosphère (Hewitt and Bond, 1966; Palit et al, 1994).

# **CHAPITRE II**

## **MATERIEL ET METHODES**

## CHAPITRE II

### MATÉRIEL ET MÉTHODES

#### 2.1. Objectif du travail :

Le présent travail s'inscrit dans le cadre du projet de recherche international COST ACTION PLANTMETALS CA19116. Il a pour objectif d'étudier l'effet de deux éléments de trace métallique, à savoir le Cobalt et le Zinc sur la germination et la croissance de la luzerne (*Medicago sativa* L.) et trèfle blanc (*Trifolium repens* L.).

La physiologie de la germination est étudiée ainsi que la réponse de l'activité amylasique et la teneur en ADN le développement des symptômes de carence et/ou d'excès ainsi par des paramètres biochimiques tel que la teneur en ADN, et la teneur en  $\alpha$ -amylase. Cette étude a été débutée le mois de mars 2022 jusqu'au début du mois de juin 2022.

#### 2.2. Matériel végétal

Les graines utilisées dans cette expérimentation sont celles de la luzerne (*medicago sativa*) et trèfle blanc (*trifolium repens*) provenant de la région de Sidi Amar sud El Abadia wilaya de Ain Defla, Les graines sont d'un taux de germination de 85% et de pureté de 99%. La systématique du matériel végétal est résumée dans le tableau 2.1

**Tableau 2. 1: Position systématique de la luzerne**

<b>Règne</b>	Plantes ( <i>Plantae</i> )
<b>Sous règne</b>	Plantes vasculaires ( <i>Tracheobionta</i> )
<b>Division</b>	Plantes à graines ( <i>Spermatophyta</i> )
<b>Classe</b>	Plantes à fleurs ( <i>Angiospermae</i> )
<b>Sous classe</b>	Dicotylédones ( <i>Dicotyledonae</i> )
<b>Ordre</b>	Fabales ( <i>Fabales</i> )
<b>Famille</b>	<i>Fabaceae</i> ( <i>Pailionaceae</i> )
<b>Genre</b>	<i>Medicago</i>
<b>Espèce</b>	<i>sativa</i>
<b>Nom commun</b>	Luzerne cultivée



**Figure 2. 1 : la luzerne au stade floraison (Originale , 2022)**

**Tableau 2. 2 : Position systématique du trèfle**

<b>Règne</b>	Plantes ( <i>plantae</i> )
<b>Sous règne</b>	Plantes vasculaires ( <i>Tracheobionta</i> )
<b>Division</b>	Plantes à graines ( <i>Spermatophyta</i> )
<b>Classe</b>	Plantes à fleurs ( <i>Angiospermae</i> )
<b>Sous classe</b>	Dicotylédones ( <i>Dicotyledonae</i> )
<b>Ordre</b>	Fabales ( <i>Fabales</i> )
<b>Famille</b>	<i>Fabaceae</i> ( <i>Papilionaceae</i> )
<b>Genre</b>	<i>Trifolium</i>
<b>Espèce</b>	<i>repens</i>
<b>Nom commun</b>	Trèfle blanc



**Figure 2. 2 : trèfle blanc au stade floraison (original, 2022)**

### **2.3. Effet des ETM sur la germination de la luzerne et du trèfle**

#### **2.3.1. Stérilisation et choix des graines :**

La stérilisation se fait selon la méthode de Vincent (1970) et Somasegaran et Hoben(1994) comme suite :

Les graines des 2 espèces végétales sont prises de façon aléatoire puis sont désinfectées par une solution d'éthanol à 95%(v/v) pendant 10seconde, rincées abondamment à l'eau distillée (10 fois à l'eau distillée stérile, puis on les laisse gonfler pendant 1 heure).

#### **2.3.2. Mise en germination**

Après stérilisation, les graines ont été mises à germer sur boites de Petri contenant des disques de papier filtre imbibés d'eau distillée et différentes doses de zinc et du cobalt, à l'obscurité totale et à 25°C jusqu'à apparition des radicelles.





**Figure 2. 3 : Mise en germination des graines du trèfle et de la luzerne**

### **2.3.3. Application du stress métallique**

Les graines ont été mises à germer dans des boîtes de Petri, (20 graines par boîte) dont le fond a été recouvert d'une double couche de papier filtre imbibé d'eau distillée (témoin), de solutions de concentration différentes en  $\text{CoSO}_4$  ou  $\text{ZnSO}_4$  (essais) (Tableau 2.3). La germination a été faite à l'obscurité à une température de  $25^\circ\text{C}$ . (Mihoub et al ; 2005)

Suite aux différents tests statistiques réalisés lors des travaux sur l'effet des éléments de trace métallique sur les plantes à intérêt agronomique dans le cadre du projet international COST ACTION PLANTMETALS dirigé par Dr. DEGAÏCHIA H. (communication personnelle), nous avons retenus trois concentrations de Cobalt et de Zinc susceptibles d'avoir un effet inhibiteur sur la germination chez la luzerne et le trèfle.

**Tableau 2. 3 : Tableau des concentrations en ETM utilisés**

Elément	Concentration (g/l)		
Zinc (ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O)	0.7	01	1.5
Cobalt (CoSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O)	0.5	0.8	1.2

L'effet des ETM sur la germination a été estimé par la mesure de différents paramètres.

#### 2.3.4. Cinétique de germination

Elle permet d'appréhender la signification de l'effet du CoSO<sub>4</sub> et du ZnSO<sub>4</sub> sur l'évolution germinatif de la **luzerne**, le **trèfle** à différentes concentrations. Le nombre de graines germées a été noté toutes les 24 heures pendant 14 jours.

#### 2.3.5. Taux de germination

Ce paramètre constitue un meilleur moyen de déterminer la faculté germinative et d'identification de la concentration métallique qui présente la limite physiologique de germination des graines. Il est exprimé par le rapport nombre de graines germées sur nombre total de graines.

$$TG\% = \frac{n}{N} \times 100$$

n: nombre de graines germées ; N : nombre total de graines mises en germination

#### 2.3.6. Moyenne de germination journalière

C'est le rapport entre le pourcentage de germination finale (TG%) et le nombre de jours à la germination finale (N) désigné par MDG « *Mean Daily Germination* » (Osborne J.M., Fox J.E.D. Et Mercer S. (1993)).

$$MDG = \frac{TG\%}{N}$$

#### 2.3.7. Vitesse de germination

Selon Come, la vitesse de germination peut s'exprimer en temps moyen de germination (TMG) équivalent à l'inverse multiplié par 100 du coefficient de *Kotowski* (Kotowski 1926) et conduisant à la formule suivante :

$$TMG = \frac{(N1. T1) + (N2. T2) + \dots + (Nn. Tn)}{N1 + N2 \dots \dots Nn}$$

**N<sub>1</sub>** : est le nombre de graines germées au temps T<sub>1</sub>,

**N<sub>2</sub>** : est le nombre de graines germées dans l'intervalle T<sub>1</sub> -T<sub>2</sub>.....

### 2.3.8. Inhibition de la germination

Le pourcentage d'inhibition de la germination a été calculé selon El Hadji :

$$\text{Inhibition \%} = \frac{X_i - Y_i}{X_i} \times 100$$

**X<sub>i</sub>** : nombre de graines ayant germées sur le milieu témoin.

**Y<sub>i</sub>** : nombre de graines ayant germées sur le milieu contenant les ETM

### 2.3.9. Réversibilité de l'action du cobalt et zinc :

Ce paramètre a l'avantage de déterminer l'origine de l'effet dépressif des ETM, de nature **osmotique** et/ou **toxique** (Benani ,2013). Les graines mises à germer en présence de différentes doses des ETM (tableau 3.3) ont été utilisées. Parmi ces graines on a choisi celles non germées. Elles ont été rincées trois fois pour éliminer le cobalt et le zinc non absorbé puis transférées sur milieu contenant de l'eau distillée pendant 10 jours supplémentaires. Le pourcentage de la reprise de germination (RG%) a été déterminé par la formule qui suit :

$$RG\% = \frac{(a - b)}{(c - b)} \times 100$$

**a** : nombre total de graines germées après le transfert sur l'eau distillée,

**b** : nombre total de graines germées sur solution contenant les ETM

**c** : nombre total de graines mises en germination.

### 2.3.10. Détermination *in - silico* de la DL<sub>50</sub> et de la DL<sub>99</sub> du Zinc et du Cobalt

Nous avons opté pour une détermination in-silico de la DL<sub>50</sub> et de la DL<sub>99</sub> en se basant sur les résultats obtenus et cela par une méthode de modélisation prévisionnelle (la régression linéaire simple). Le logiciel utilisé est le SPSS statistics Version 21.0.0. Les résultats ont été confirmés par le logiciel SPSS Modeler Version 18.0.0

## 2.4. Effets du Zinc et du Cobalt sur les paramètres biochimiques

Après 03 jours d'incubation (nombre de jours nécessaire à l'obtention du maximum de germination du lot témoin) en conditions métalliques l'appréciation des paramètres

biochimiques a été effectuée.

#### 2.4.1. Détermination de la teneur en ADN

- **Extraction de l'ADN**

L'ADN a été dosé selon la technique utilisée par Burton et *al.*(1956). Dans des tubes de centrifugation, à 0.2g de matière sèche on ajoute 2ml d'acide perchlorique. Le mélange est incubé au bain marie pendant 20mn à 90°C. Les tubes sont ensuite centrifugés pendant 10 mn à 2000 G. Une solution contenant l'ADN est obtenue.

- **Dosage de l'ADN**

Une aliquote de la solution (500µl) a été récupérée et à laquelle on ajoute 500 µl d'acide perchlorique et 2ml de diphénylamine. Les tubes ont été recouverts et laissés au repos à l'obscurité pendant 18h. La lecture de la densité optique des échantillons a été effectuée à 600 nm (Figure 2.4).La teneur en ADN est déterminée selon la formule :

$$\text{Teneur en ADN } (\mu\text{mol/g. MS}) = \frac{DO_{600} - 0.015}{0.0059862}$$

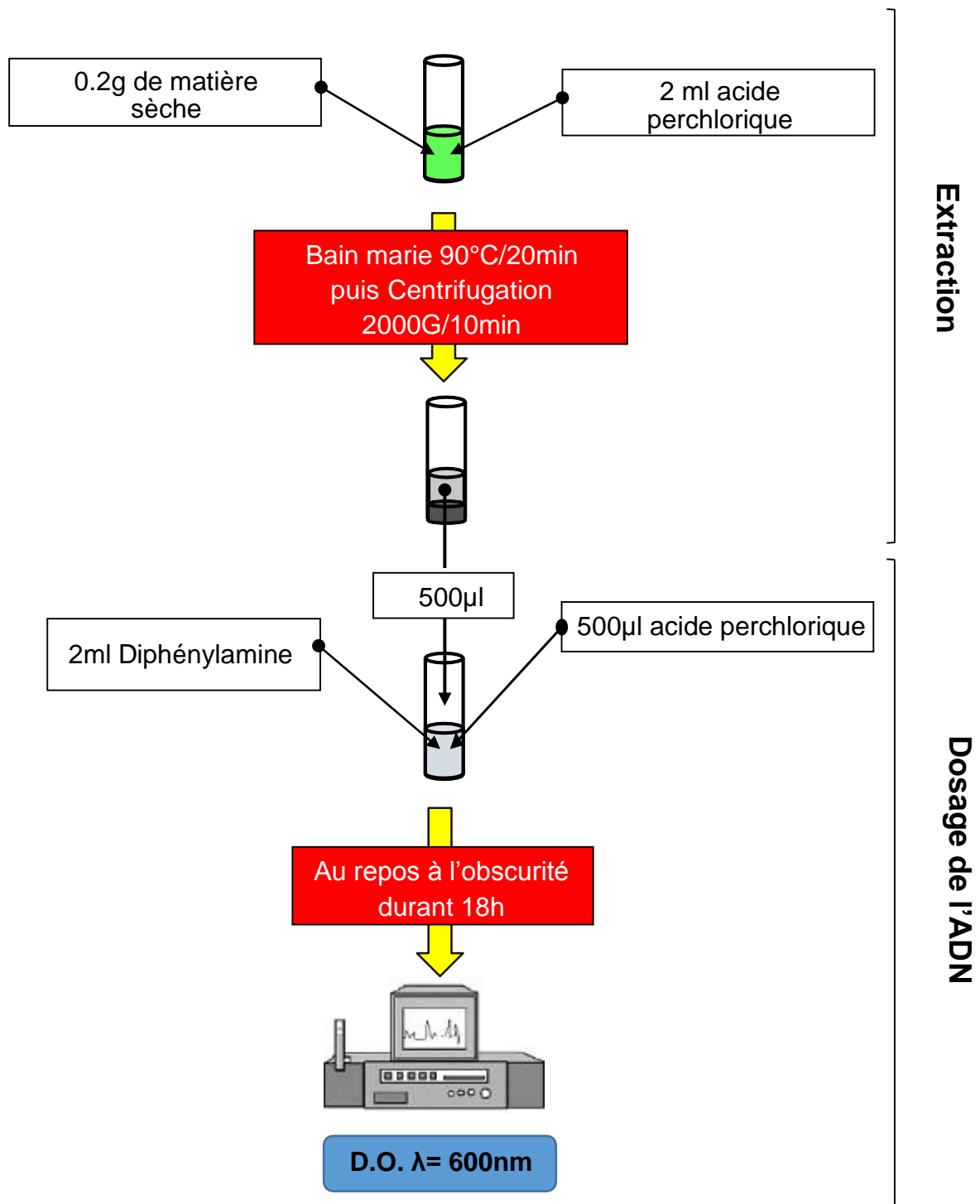


Figure 2. 4 : Dosage de l'ADN

#### 2.4.2. Dosage de l' $\alpha$ -amylase

L'alpha-amylase a été mesurée selon la méthode de Xiao et *al.* (2006) en utilisant le Lugol. Les graines mises en germination (10 mg) ont été broyées dans 3 ml de solution tampon phosphate (pH 7). Un millilitre (1ml) de l'extrait a été additionné à 1ml d'une solution d'amidon soluble (0.2% ; p/v). Après incubation à 50°C durant 30 min, 500 $\mu$ l d'acide chlorhydrique (HCl) ont été ajoutés pour arrêter l'activité enzymatique. Ensuite, 2.5ml de Lugol (I<sub>2</sub>, KI) ont été additionnés. L'absorbance a été mesurée à 580nm (A580.E). (Figure 2.5) Les résultats ont été exprimés en unité enzymatique par millilitre (U/ml), calculée selon la formule suivante :

$$\alpha - \text{amylase (U/ml)} = \frac{\text{A580.T} - \text{A580.E}}{\text{A580.Et} \times \text{T} \times \text{V}}$$

**A580.T** : l'absorbance de l'amidon **sans** addition de l'extrait enzymatique ;

**A580.E** : l'absorbance de l'amidon **après** addition de l'extrait enzymatique ;

**A580.Et** : l'absorbance pour 1 mg d'amidon, dérivée de la courbe étalon (Degaichia 2015)

**T** : temps d'incubation en minutes ;

**V**: volume de l'extrait enzymatique en millilitre ;

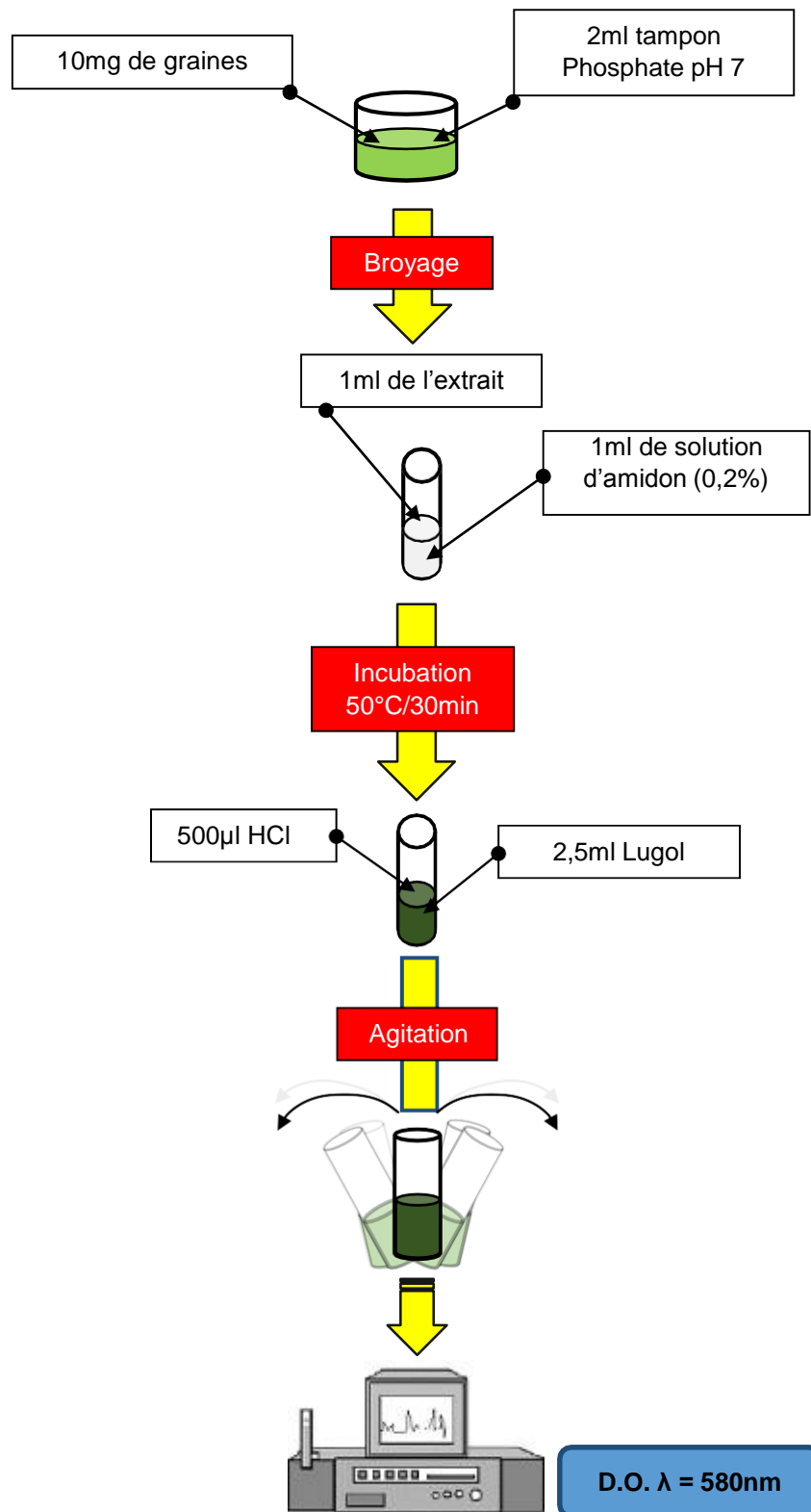


Figure 2. 5 : Dosage de l'α-amylase

## 2.5. Effet du cobalt et du Zinc sur le développement de la luzerne et du trèfle

### 2.5.1. Dispositif expérimental

#### a) Pré culture :

Après 03 jours, les graines germées sont transférées dans des alvéoles contenant de la tourbe. Les alvéoles sont ensuite placés dans une serre multi chapelle avec une température moyenne de 35 °C

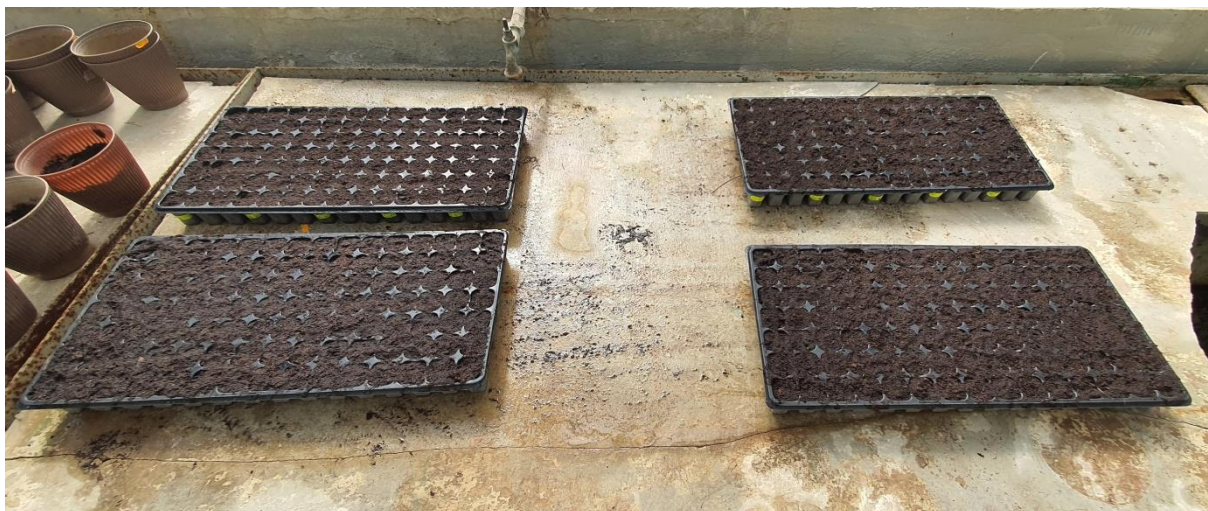


Figure 2. 6 : Pré-culture de la luzerne et de trèfle (Originale, 2022)

#### B) Préparation de la solution nutritive :

La solution de Hoagland (Hoagland et *al.* 1933) a été utilisée pour la suite de l'essai dans les conditions contrôlées. La composition est donnée en Annexe 1.

#### C) Installation de l'essai

Une fois les plants de luzerne et de trèfle arrivent au stade de Deux vraies feuilles, sont dépotés et transférés dans des pots en plastique (6.5\7 cm) contenant 150 ml de la solution nutritive de Hoagland afin de permettre l'acclimatation des plants. Les plants choisis sont de tailles identiques. Ensuite les doses de Zinc et de Cobalt sont additionnées à la solution nutritive. L'essai est conduit en hydroponie en bloc aléatoire complet





**Figure 2. 7 : Culture hydroponique de la luzerne et du trèfle (Originale, 2022)**

**D) Application du stress métallique :**

Le Zinc et le Cobalt sont introduits dans la solution nutritive de Hoagland à des différentes concentrations. Ces dernières sont consignées dans le tableau 2.4

**Tableau 2. 4 : Concentration en ETM dans la solution nutritive**

Traitement	Elément	Concentration
T1	Témoin +	Solution de Hoagland
T2	Témoin -	Solution de Hoagland exempte de Zinc
T3	Cobalt	0.5 g/l
T4	Cobalt	0.8 g/l
T5	Cobalt	1.2 g/l
T6	Zinc	0.7 g/l
T7	Zinc	1 g/l
T8	Zinc	1.5 g/l

### 2.5.2. Suivi de l'état phytosanitaire (Symptomatologie)

Après induction du stress métallique, le suivi de l'état sanitaire des plants de tomate et du haricot est effectué chaque 24 heures. Les Symptômes observés sont codifiés et notés comme suit :

0	Plante d'aspect sain,
1	Flétrissement,
2	Jaunissement,
3	Nécrose,
4	Brûlure,
5	Réduction de la taille de tige
6	Chlorose des nervures,
7	Mort de la plante.

**CHAPITRE III**  
**RESULTATS & DISCUSSION**

## CHAPITRE III

### RÉSULTATS ET DISCUSSION

#### 3.1. Cinétique de germination

La figure 3.1 montre l'effet des différentes concentrations de cobalt ( $\text{CoSO}_4$ ) et du zinc ( $\text{ZnSO}_4$ ) sur l'évolution du taux de germination du luzerne et trèfle au cours du temps.

Après 14 jours de traitement métallique, les courbes de germination permettent de distinguer 03 phases.

- **Une phase de latence :**

Nécessaire à l'apparition des premières germinations, au cours de laquelle le taux de germination reste faible. La durée de cette phase est nulle pour l'ensemble des concentrations peut import l'ETM, Elle est courte, de l'ordre de 24 heures sauf pour la concentration 1.2g/l de cobalt chez la luzerne qui est de 48h

- **Une phase sensiblement linéaire :**

Correspondant à une augmentation rapide du taux de germination et est proportionnelle au temps, La durée de cette phase est variable entre 4 jours et 11 jours selon la concentration en ETM.

Cependant, Dans le milieu contenant les différentes doses de zinc, le taux de germination atteint son maximum au bout de 05 jours pour les graines du trèfle et 08 jours pour les graines de la luzerne, cette phase est plus lente par rapport au témoin. D'autre part, dans le milieu contenant les différentes doses de cobalt, cette phase est plus lente que celle du lot de graine dans le milieu contenant les différentes doses de zinc et par rapport au témoin (09 pour le trèfle à 11 jours pour la luzerne)

- **Une phase de stabilisation :**

Une troisième phase correspondant à un palier représentant le pourcentage final de germination et traduisant la capacité germinative dans les conditions de l'expérience. Le nombre de graines germées en fonction du temps sur milieu témoin a été plus important et a évolué plus rapidement (3j pour le trèfle et 5j pour la luzerne) par rapport aux essais.

Cependant, Dans le milieu contenant les différentes doses de zinc, le taux de germination atteint son maximum au bout de 5 à 8 jours, les graines atteignent un taux de germination final nettement inférieur à celui du témoin sauf les graines du trèfle traitées par les concentrations de 0.7 et 1.5 g/l de Zinc

D'autre part, Dans le milieu contenant les différent dose de cobalt, le taux de germination atteint son maximum au bout de 9 à 11 jours.

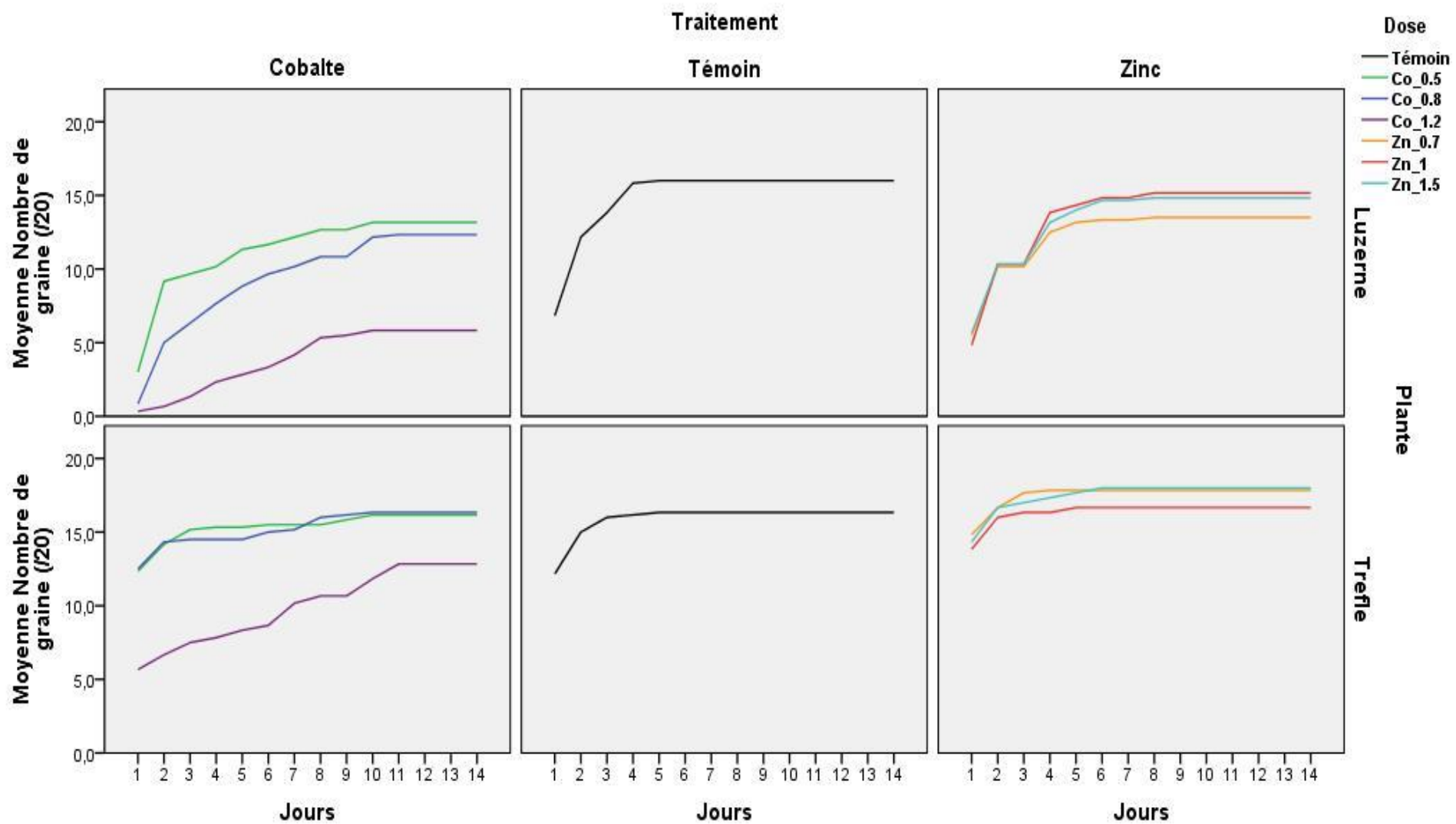
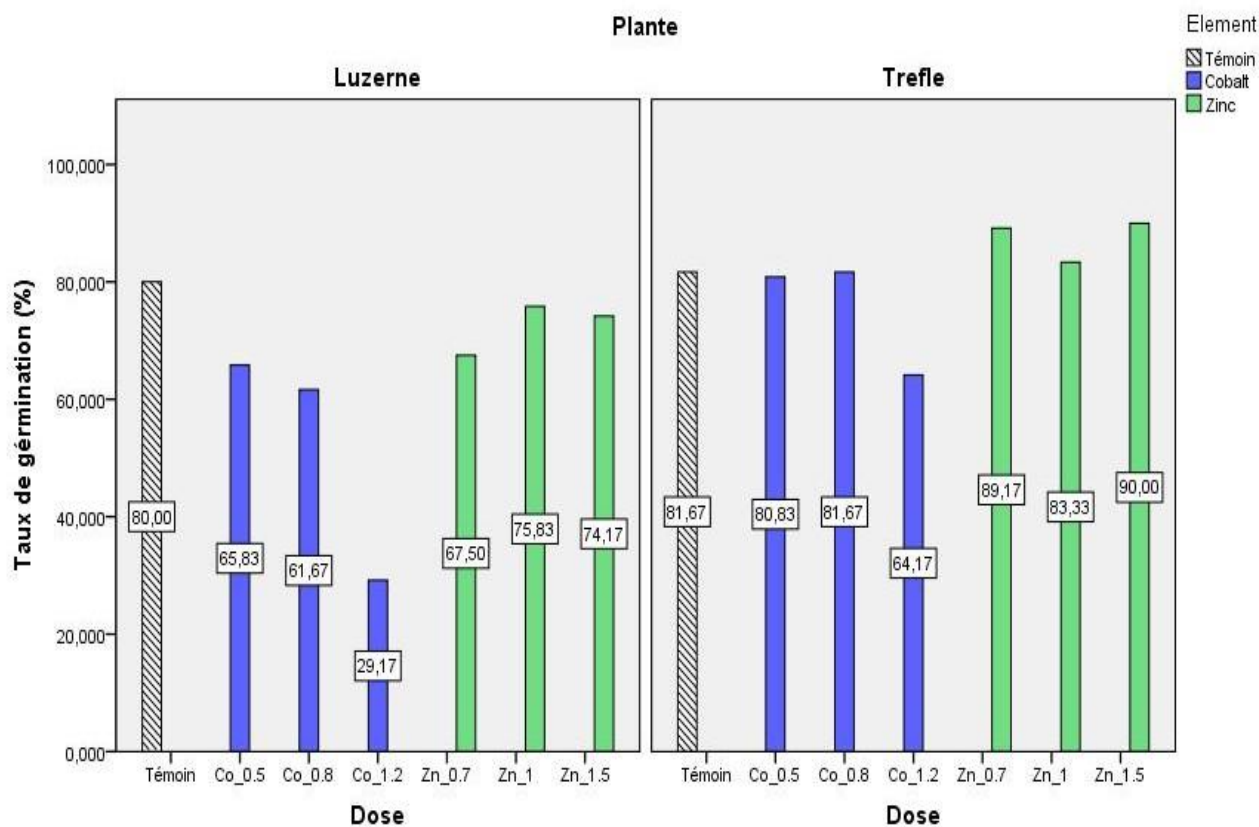


Figure 3. 1 : Effets du stress métallique sur la cinétique de germination du luzerne et trèfle

### 3.2. Évolution du taux de germination final

Les figures suivantes montrent les résultats des paramètres de germinations de la Luzerne et du Trèfle

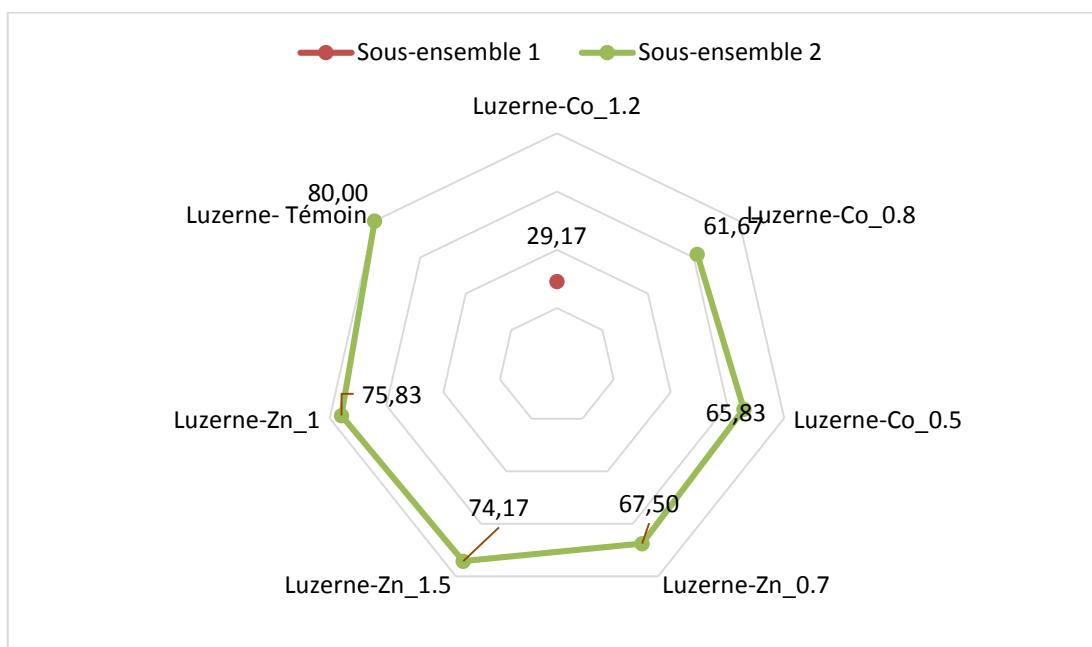


**Figure 3. 2 : Effets du stress métallique (cobalt et zinc) sur le taux de germination**

La figure 3.2 montre les résultats de taux de germination des espèces utilisées luzerne et trèfle traitées par les différentes concentrations de zinc et le cobalt.

Pour la **luzerne** on remarque que chez le témoin le taux de germination est de 80% cette valeur diminue avec l'augmentation de la concentration en cobalt, en effet la plus petite valeur est de 29.17% pour la dose de cobalt de 1.2g/l, puis en 0.5 et 0.8g/l on a trouvé 65.83% et 61.67%. Tandis que pour le lot traiter par le **zinc** il n'y a pas de différence entre les témoins et la dose 1g/l et 1.5g/l par contre l'analyse statistique montre que la dose 0.7g/l induit un résultat différent.

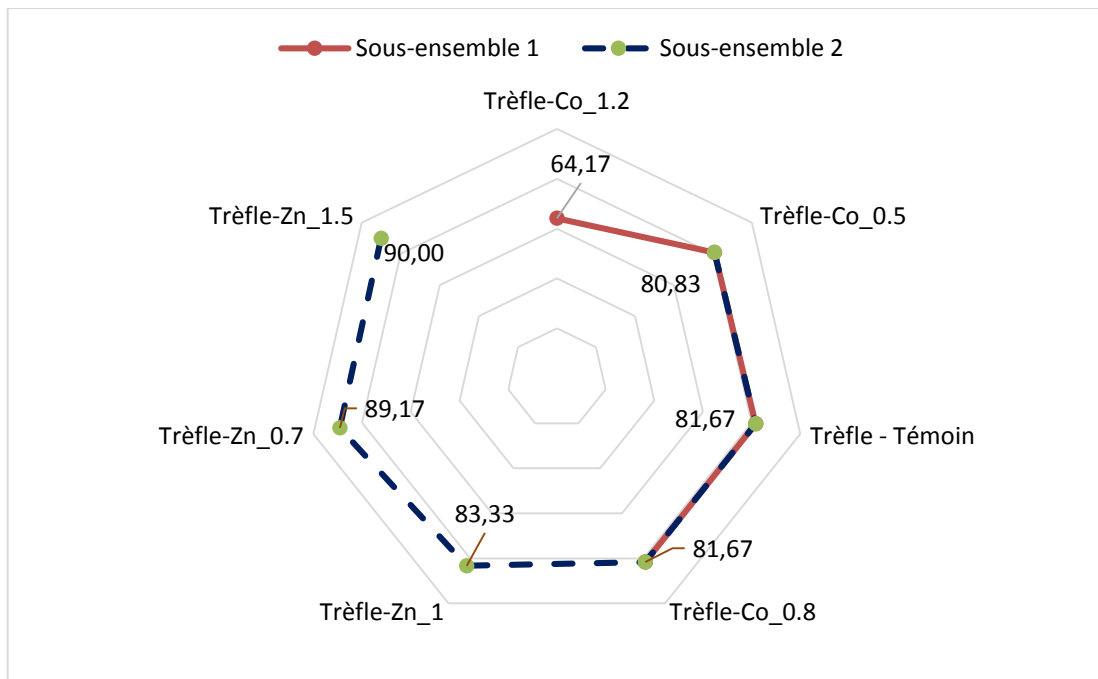
Tant pour le **trèfle** le témoin et de 81.67% cette valeur ne diminue pas significativement avec les doses du **cobalt** jusqu'à 0.8g/l tandis que le taux de germination diminue avec l'augmentation de la concentration en cobalt.



**Figure 3. 3 : répartition des concentrations en cobalt et zinc dans des sous-ensembles homogènes chez la luzerne**

Les résultats de l'analyse de variance unie variée (ANOVA) ont révélés que la concentration 1.2g/l de **cobalt** dans le milieu a un effet significatif sur le taux de germination par rapport au témoin. Par contre il n'y a pas une différence significative entre les autres doses du cobalt et du zinc ( $p=0.000<5\%$ ). Le test de Tukey pour la comparaison des moyennes nous indique que ces concentrations n'engendrent pas de réponses significativement différentes au seuil de 5%.(Annexe2)



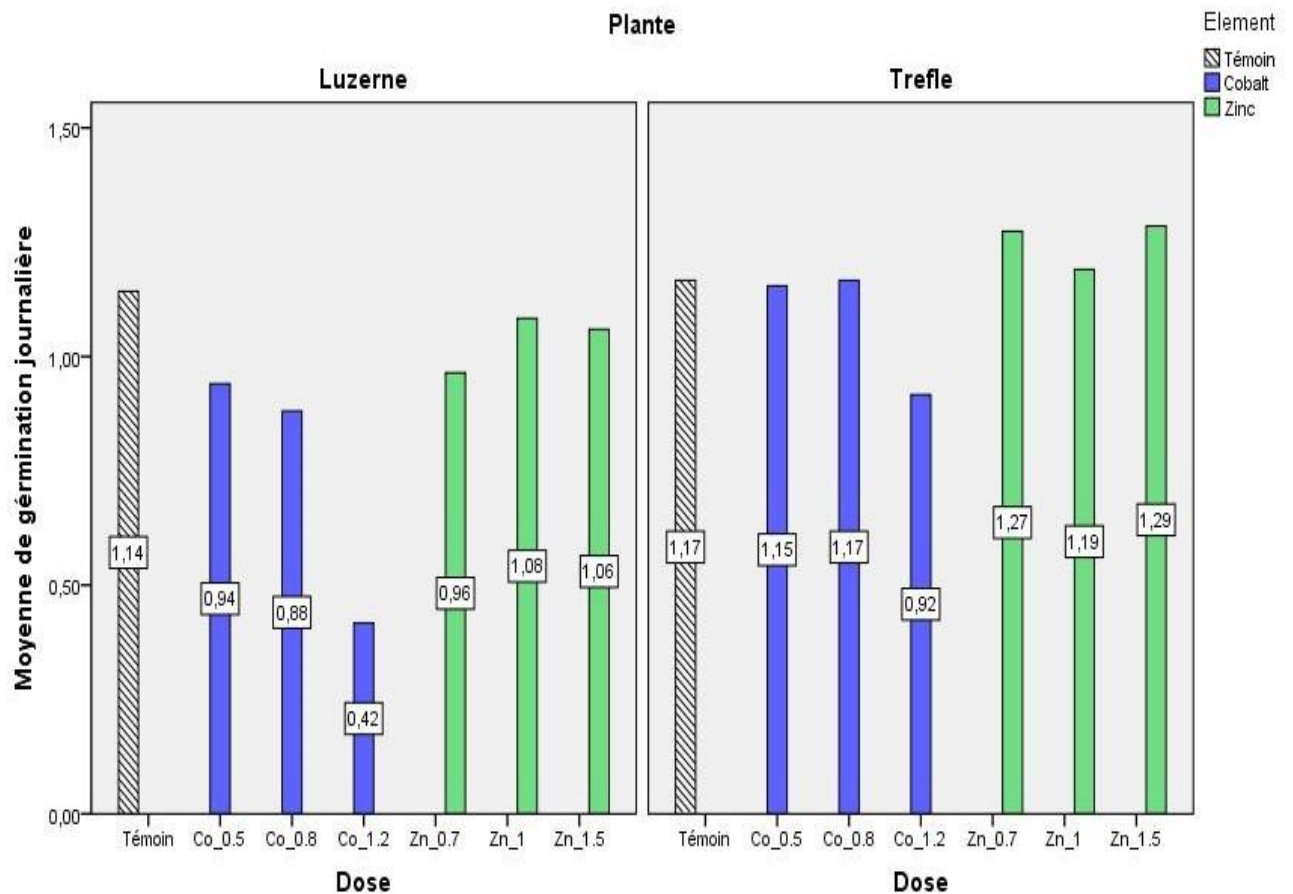


**Figure 3. 4 : répartition des concentrations en cobalt et zinc dans des sous-ensembles homogènes chez le trèfle**

Le cobalt à une dose de 1.2 g/l engendre des taux faibles de germination de la **Trèfle**, en effet le test de Tukey montre que cette dose n'a pas des effets significatifs en comparant avec les doses les plus faibles mais elle est significativement différente de celle du zinc (Annexe 2)

### 3.3. Moyenne de germination journalière

Les valeurs des moyennes de germination journalière (MDG) de la luzerne et trèfle soumis à différents stress métalliques (cobalt et zinc) sont représentées (figure 3.5)

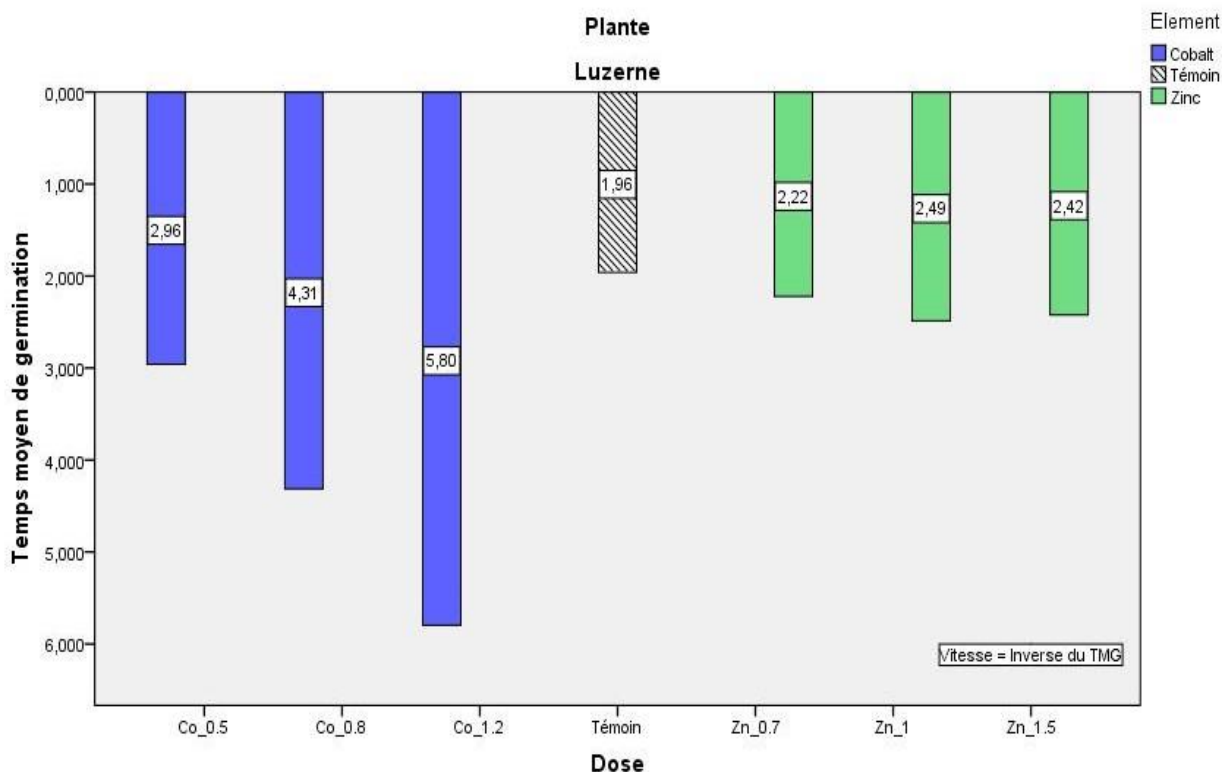


**Figure 3.5 : Effets du stress métallique (cobalt et zinc) sur la variation de la moyenne de germination journalière du luzerne et trèfle**

Les résultats de la moyenne de germination journalière suivent la même tendance que le taux de germination car en effet la moyenne de germination journalière est en rapport avec le taux de germination ce qui indique les mêmes tendances des résultats. Cependant, le MDG apporte une nouvelle information c'est le nombre de graines germées par jour.

### 3.4. La vitesse de germination

Les figures 3.6 ; 3.8 met en évidence le temps moyen de germination (TMG) du trèfle et de la luzerne en conditions métalliques, ce dernier est inversement proportionnel à la vitesse de germination



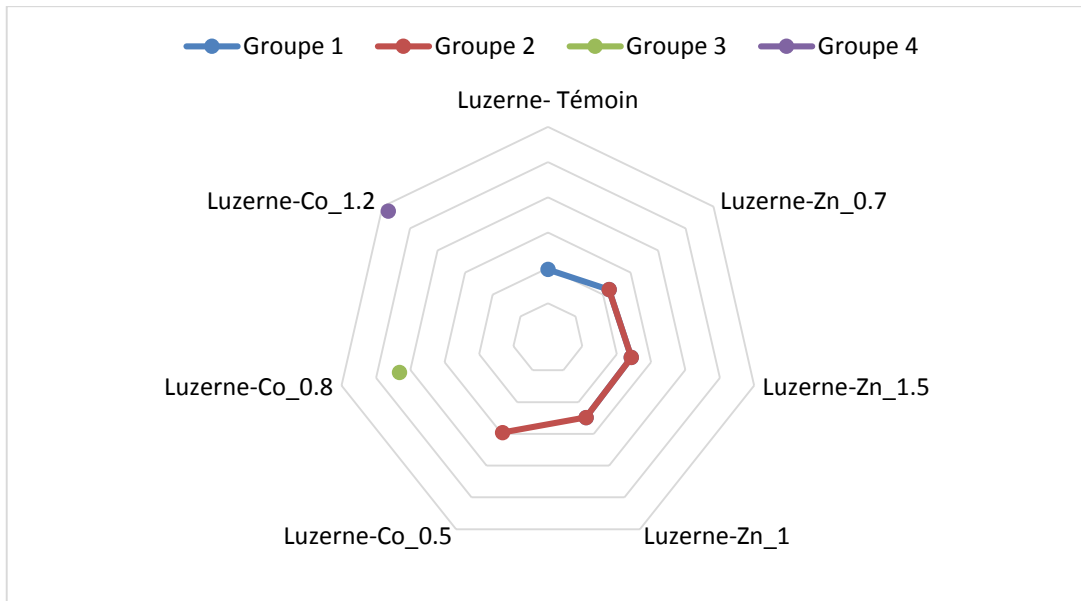
**Figure 3. 6 : Effet du zinc et du cobalt sur le temps moyen de germination (par jours) de la luzerne**

L'analyse des résultats présentés dans la **figure 3.6** montre que les graines de **Luzerne** ayant germées dans l'eau distillée ont un TMG de 1,96 jour.

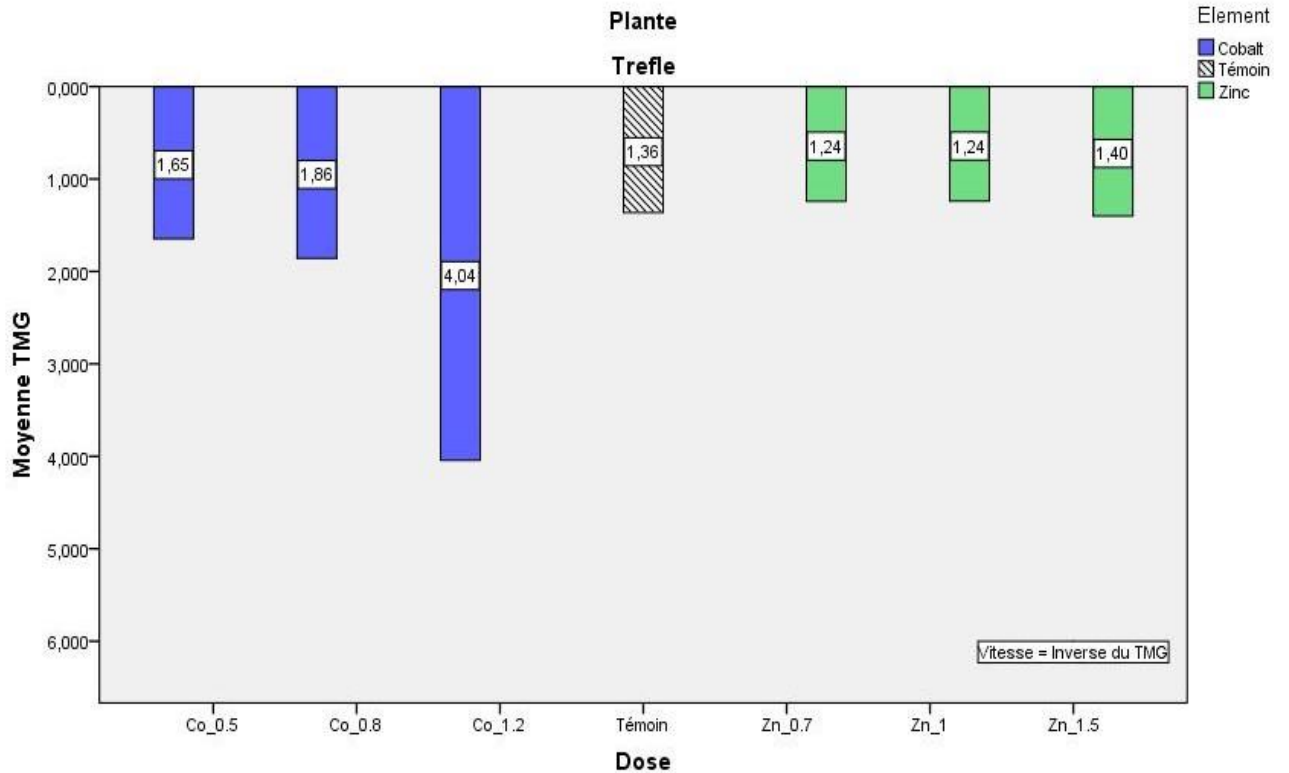
Sous contrainte causée par les ETM, la vitesse de germination, exprimée en temps moyen de germination (TMG), enregistre des diminutions qui varient de 2.96 à 5.80 jours pour le lot de graines mis en germination en contact avec le cobalt. Cette diminution est proportionnelle à la concentration de cette ETM ce qui est confirmé par le test de Tukey qui indique l'appartenance du témoin et des doses de cobalt dans des groupes homogènes différents (Annexe 2).

Le zinc n'engendre pas des différences aussi importantes que celle notées par le cobalt. En effet le TMG varie entre 2.22 et 2.42 graines par jours. Ce qui est expliqué

par le Test de Tukey qui montre que ces chiffres sont présents dans le même groupe homogène avec le témoin (Figure 3.7). (Annexe 2)



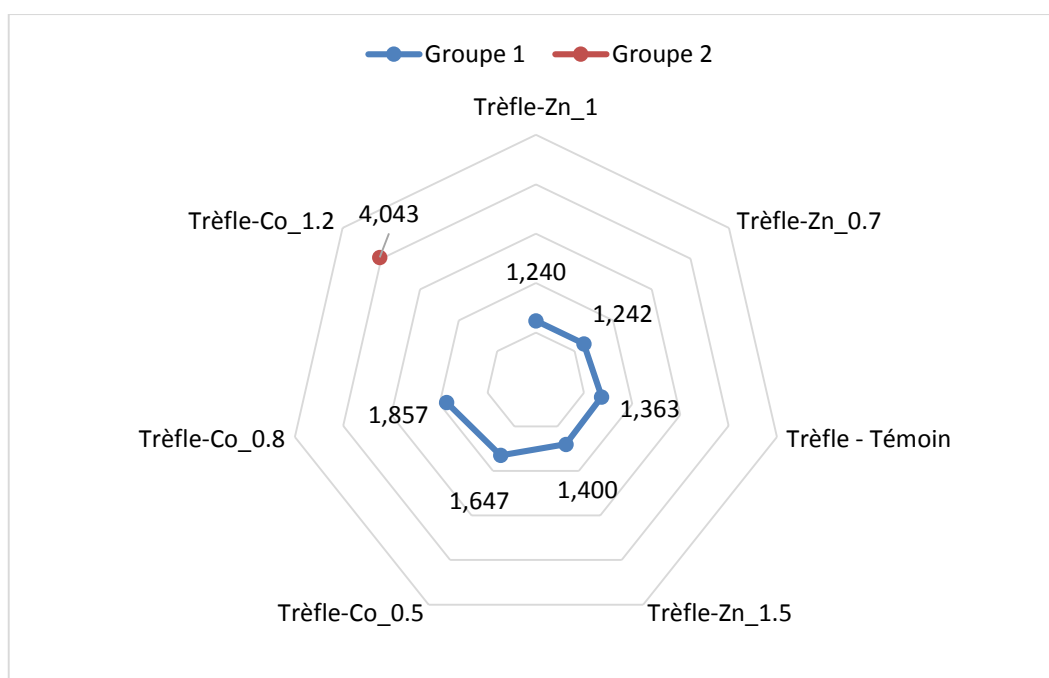
**Figure 3. 7 : répartition des concentrations en cobalt et zinc dans des sous-ensembles homogènes chez la luzerne**



**Figure 3. 8 : Effet du zinc et du cobalt sur le temps moyen de germination (par jours) du trèfle**

Les deux ETM ont le même effet sur le **Trèfle (figure 3.8)**. En effet chez le lot témoin on note un TMG de 1.36 jours.

Cette valeur augmente avec l'augmentation de la concentration en cobalt (ce qui signifie une diminution de la vitesse de germination), elle atteint 4.04 jours pour la concentration 1.2 g/l. comme pour la luzerne, le trèfle réagit de la même manière en contact avec les différentes doses de zinc avec une variation allant de 1.24 à 1.40 jours. Le test de Tukey indique que toutes les doses des deux éléments ont des effets similaires sauf pour la dose 1.2g/l de cobalt (**Figure3.9**). (Annexe 2)



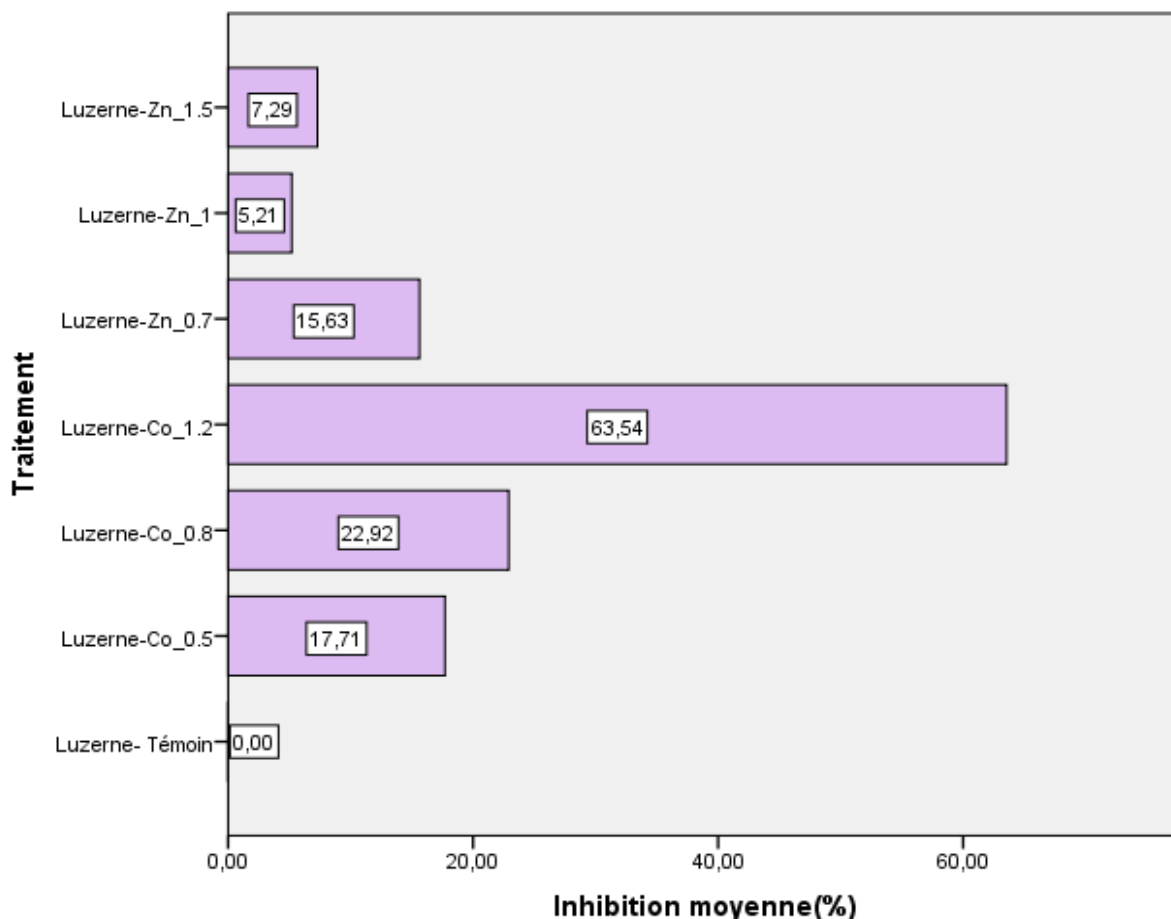
**Figure 3. 9 : répartition des concentrations en cobalt et zinc dans des sous-ensembles homogènes chez le trèfle**

### 3.5. Inhibition de la germination :

L'effet du cobalt et du zinc sur l'inhibition de la germination de la **luzerne** est consigné dans la Figure 3.10.

Le taux d'inhibition de la germination le plus élevé est enregistré chez le cobalt à la concentration 1.2 g/l (63.54%). On remarque une diminution du taux d'inhibition, proportionnel à la concentration. (**Figure 3.10**).

Le taux le plus élevé d'inhibition des graines de **luzerne** en présence du zinc est de 15.63 % (0.7g/l). En effet le cobalt et le zinc n'engendrent pas le même effet inhibiteur par rapport à la germination de la luzerne



**Figure 3. 10 : L'effet du cobalt et du zinc sur l'inhibition de la germination de la luzerne**

La figure 3.11 résume graphiquement le résultat du test de Tukey pour l'inhibition de la germination de la **luzerne**. En effet tous les traitements, mis à part le Cobalt à 1.2 g/l, ne présentent pas de différences statistiquement significatives. Ce qui est expliqué par le fait que tous les traitements sont regroupés dans le sous-ensemble 1, et que le Cobalt à 1.2g/l soit dans le sous-ensemble 2

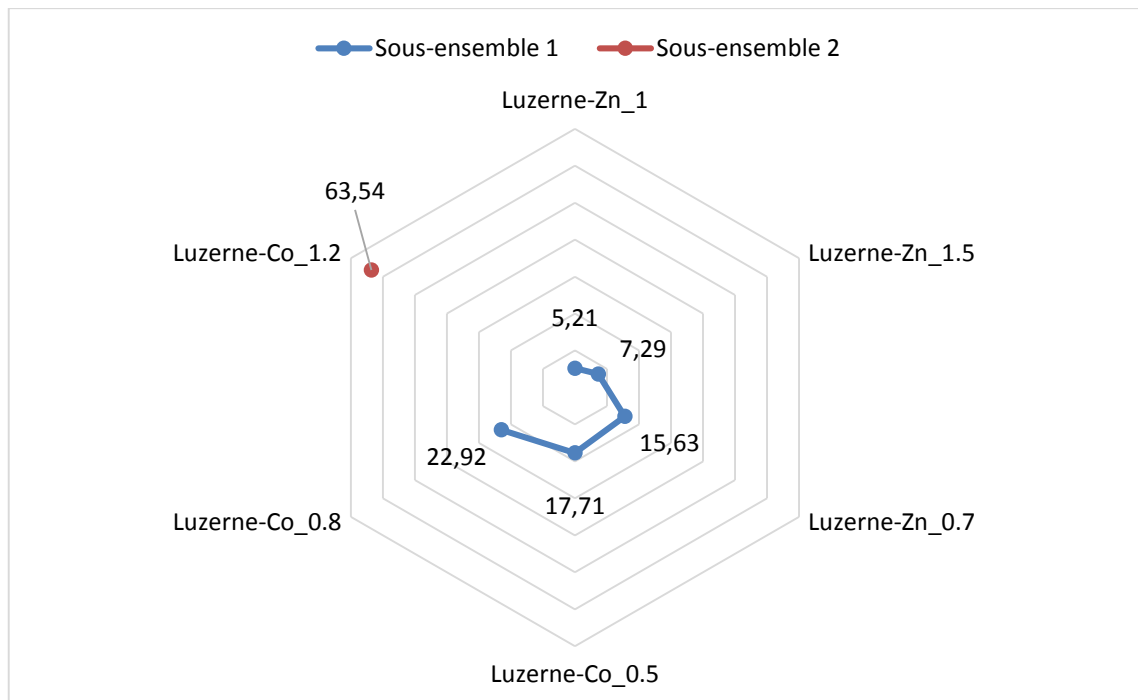


Figure 3. 11 : Répartition de l'inhibition de la germination de la luzerne dans des sous-ensembles homogènes

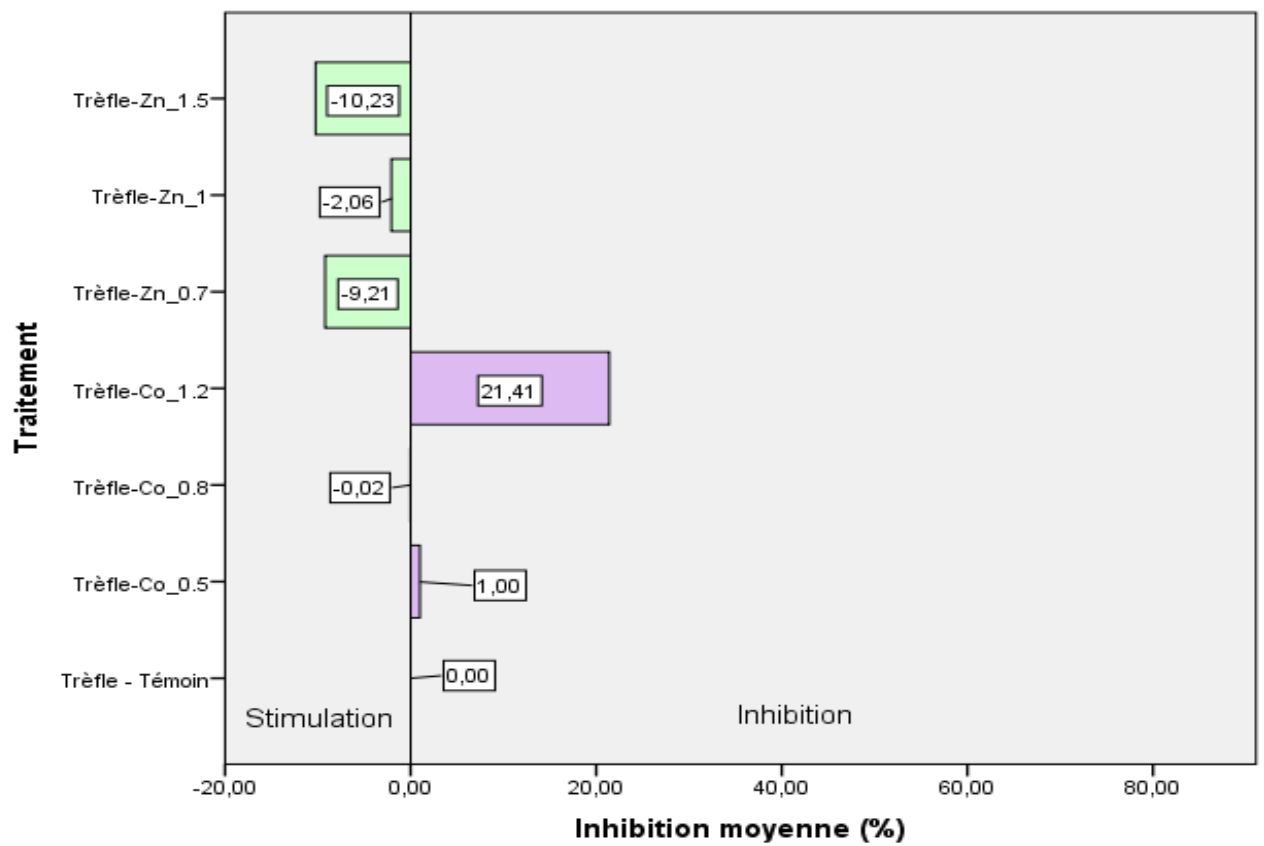
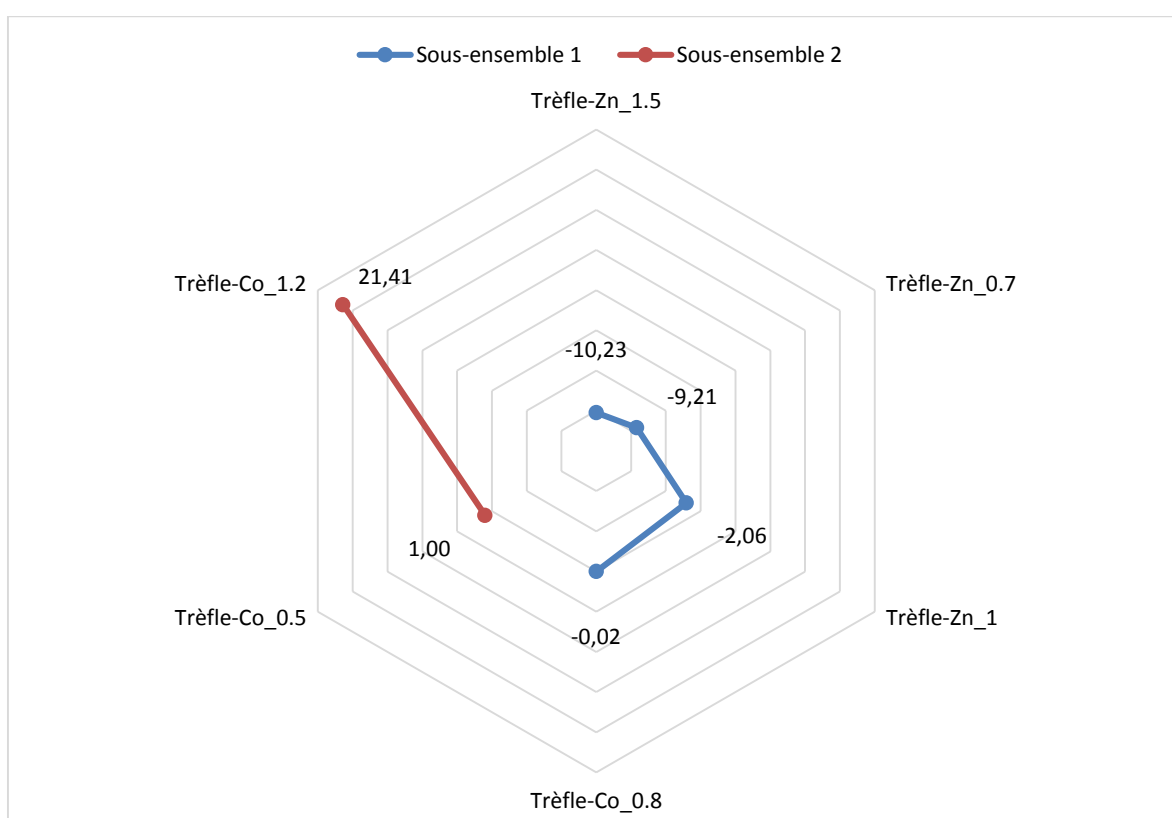


Figure 3. 12 : L'effet du cobalt et du zinc sur l'inhibition de la germination du trèfle

Une dose de 1.2g/l de cobalt induit un taux d'inhibition de 21.41%. Cette valeur est la plus élevée. Le zinc et le Cobalt à 0.8 g/l, induisent une **stimulation** de la germination qui se traduit par des valeurs négatives du taux calculé. Cette stimulation peut aller jusqu'à 10.23 % causée par le zinc à 1.5g/l (**Figure 3.12**)

Deux groupes homogènes sont dégagés par le test de Tukey (Figure 3.13). Le premier groupe est celui des traitements qui ont engendrés une **stimulation**. Tandis que le second groupe renferme les traitements qui ont causés une **inhibition** (Cobalt 0.5 et 1.2 g/l)



**Figure 3. 13 : Répartition de l'inhibition de la germination du trèfle dans des sous-ensembles homogènes**



### 3.6. Réversibilité de l'inhibition de la germination

Il a été démontré dans les paragraphes précédents que le cobalt et le zinc exercent, à différentes concentrations, un effet dépressif sur la germination des graines. Cette inhibition peut être osmotique et/ou toxique. Si elle est d'origine osmotique, on devrait s'attendre à une reprise de la germination après levée de cette contrainte. Par contre, si des phénomènes de toxicité ionique interviennent, on peut s'attendre à une absence de reprise de la germination.

On a particulièrement noté une absence de reprise de germination pour la **luzerne** prétraitée par le Zinc sauf pour la faible dose de 0.7g/l (Figure 3.14). Ceci confirme que l'action inhibitrice du zinc est de nature toxique à des grandes concentrations. Contrairement au cobalt qui est de nature osmotique. En effet les graines des deux espèces prétraitées par le cobalt ont repris la germination après rinçage et germination dans l'eau distillée.

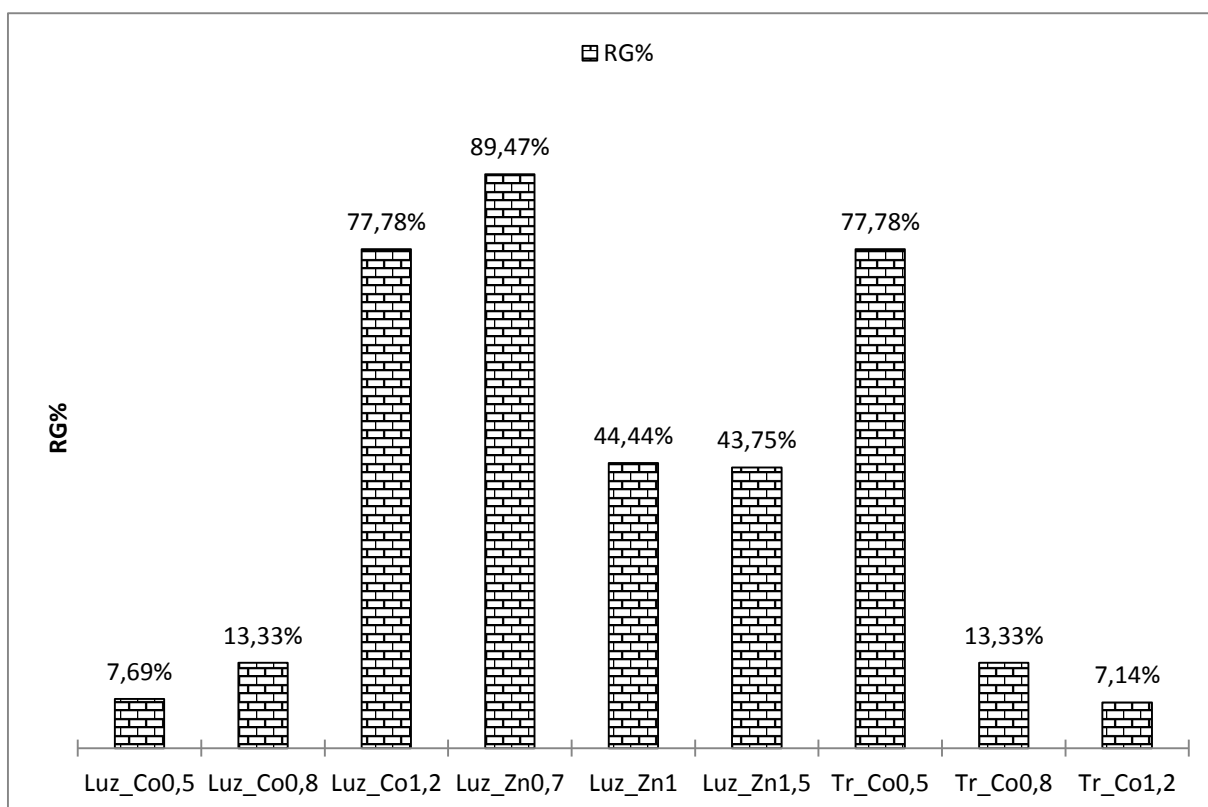
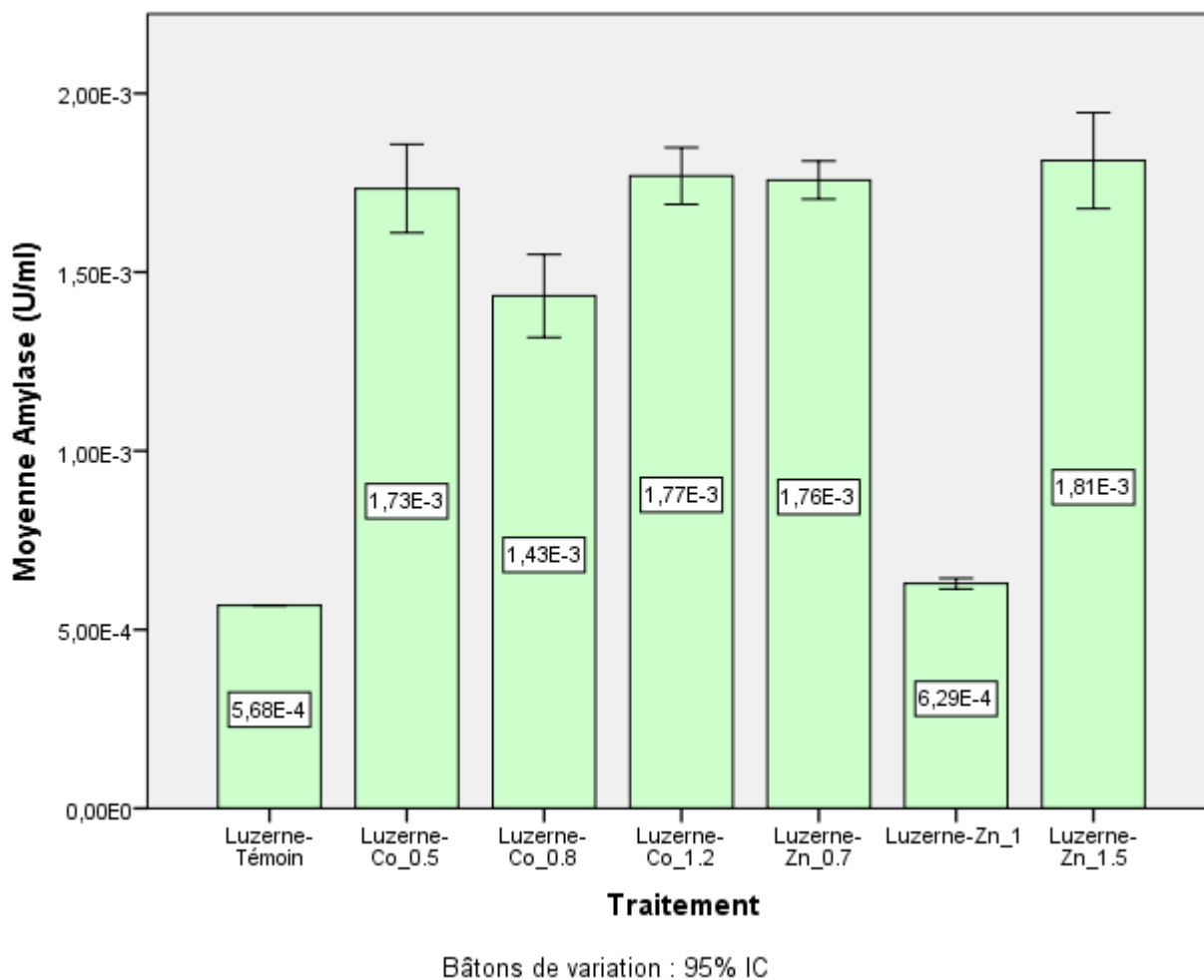


Figure 3. 14 : la moyenne de la réversibilité de l'inhibition de la germination

### 3.7. Teneur en $\alpha$ -amylase

La teneur en  $\alpha$ -amylase dans les graines de la luzerne stressées est estimée en unité enzymatique par millilitre (U/ml) et représentée dans la **figure 3.15**

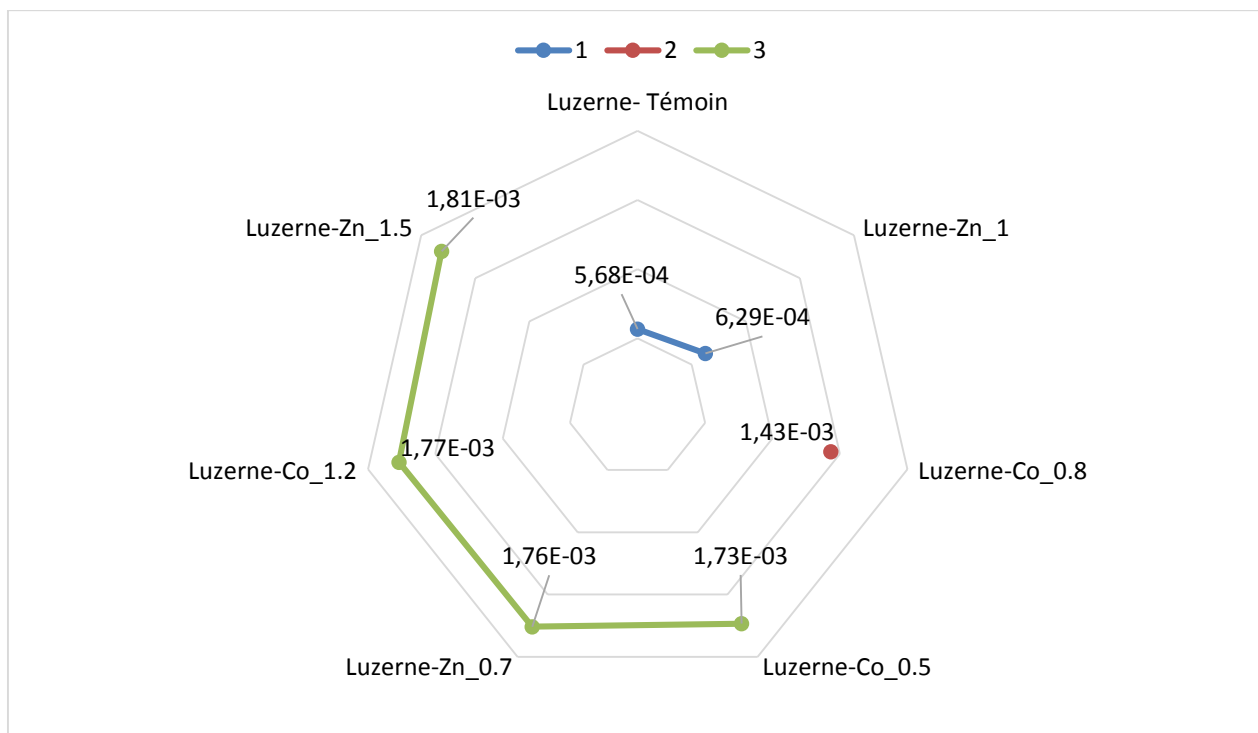


**Figure 3. 15 : Effet d'ETM sur la teneur en  $\alpha$ -amylase (U/ml) des graines de la luzerne**

En absence d'ETM on note une très faible activité amylasique du témoin avec une valeur de  $5,68 \cdot 10^{-4}$  U/ml.

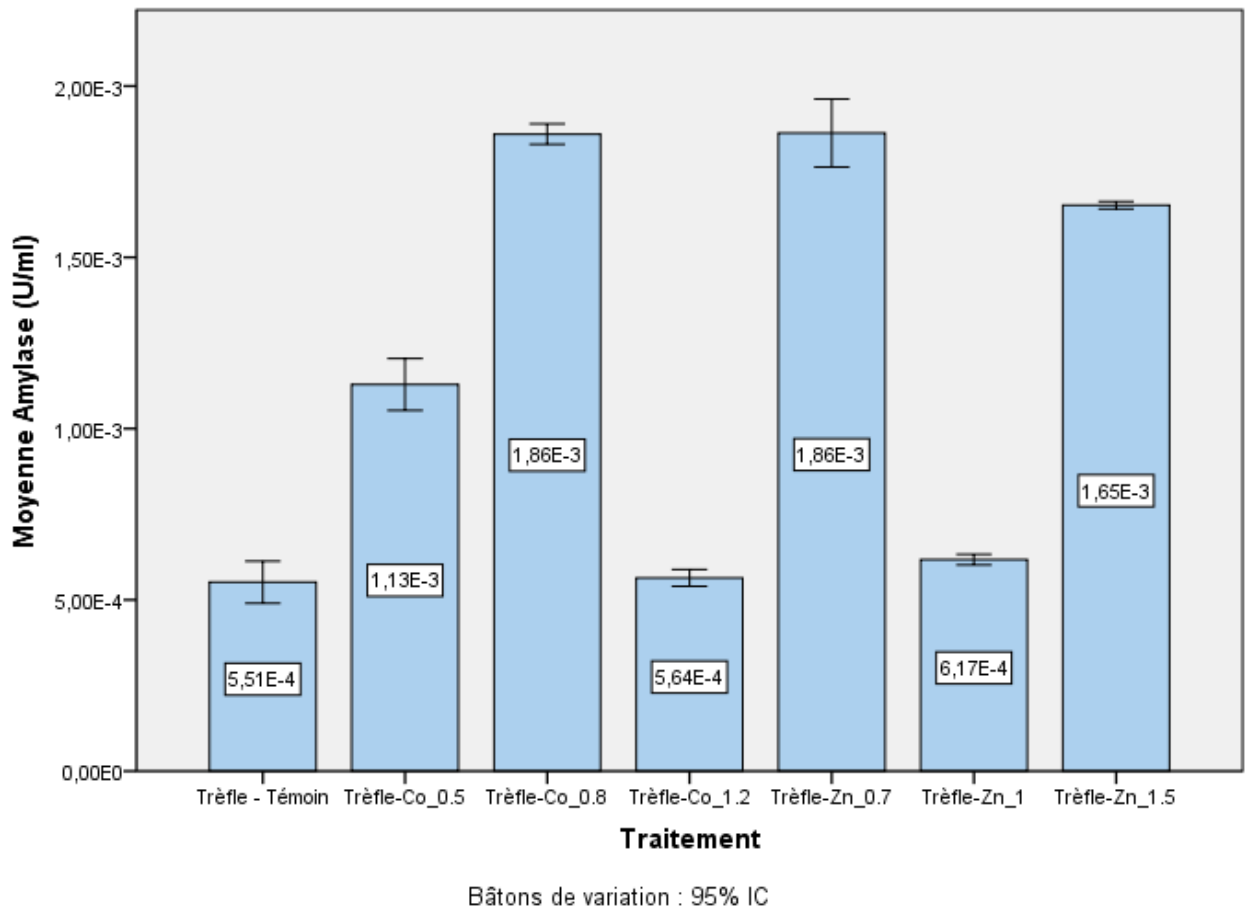
La teneur en  $\alpha$ -amylase augmente légèrement avec l'augmentation de la concentration en ETM où on a enregistré une valeur maximale de l'ordre de  $1,81 \cdot 10^{-3}$  U/ml pour la concentration 1.5g/l de **Zinc**. Pour la concentration 1g/l de zinc on enregistre une valeur similaire au témoin de  $6,29 \cdot 10^{-4}$  U/ml, l'augmentation des concentrations en ETM fait augmenter la valeur de l' $\alpha$ -amylase.

Les résultats de l'analyse de variance uni variée (ANOVA) montrent que la variation de la teneur en  $\alpha$ -amylase chez les graines de luzerne traitées par la différente dose en ETM est statistiquement significative ( $p=0,000 < 0,05$ ). (Annexe 2)



**Figure 3. 16 : répartition de l' $\alpha$ -amylase dans des sous-ensembles homogènes chez la luzerne**

Le test de Tukey montre qu'il n'y a pas de différences statistiquement significatives entre le témoin et la concentration 1g/l de Zinc ce qui implique leurs appartenances dans le même groupe homogène. Tous les autres traitements engendrent des taux d'amylase plus élevés par rapport au premier groupe (**Figure 3.16**) (Annexe 2)



**Figure 3. 17 : Effet des ETM sur la teneur en  $\alpha$ -amylase (U/ml) des graines du trèfle**

En absence d'ETM on note une très faible activité amylasique du témoin avec une valeur de  $(5,51 \cdot 10^{-4} \text{ U/ml})$  chez les graines du **Trèfle**

La teneur en  $\alpha$ -amylase augmente légèrement avec l'augmentation de la concentration en ETM où on a enregistré une valeur maximale de l'ordre de  $1,86 \cdot 10^{-3} \text{ U/ml}$  pour les concentrations Co (0.8g/l) et Zn (0.7g/l), les valeurs les plus faibles sont enregistrées dans les essais Co (1.2g/l) et Zn (1g/l) on enregistre une valeur similaire au témoin de  $5,64 \cdot 10^{-4}$  et  $6,17 \cdot 10^{-4} \text{ U/ml}$  respectivement. **(Figure 3.17)**

Les résultats de l'analyse de variance uni variée (ANOVA) montrent que l'augmentation de la teneur en  $\alpha$ -amylase chez les graines du **trèfle** traitées par les différentes concentrations en ETM est statistiquement significative ( $p=0,000 < 0,05$ ). (Annexe1)

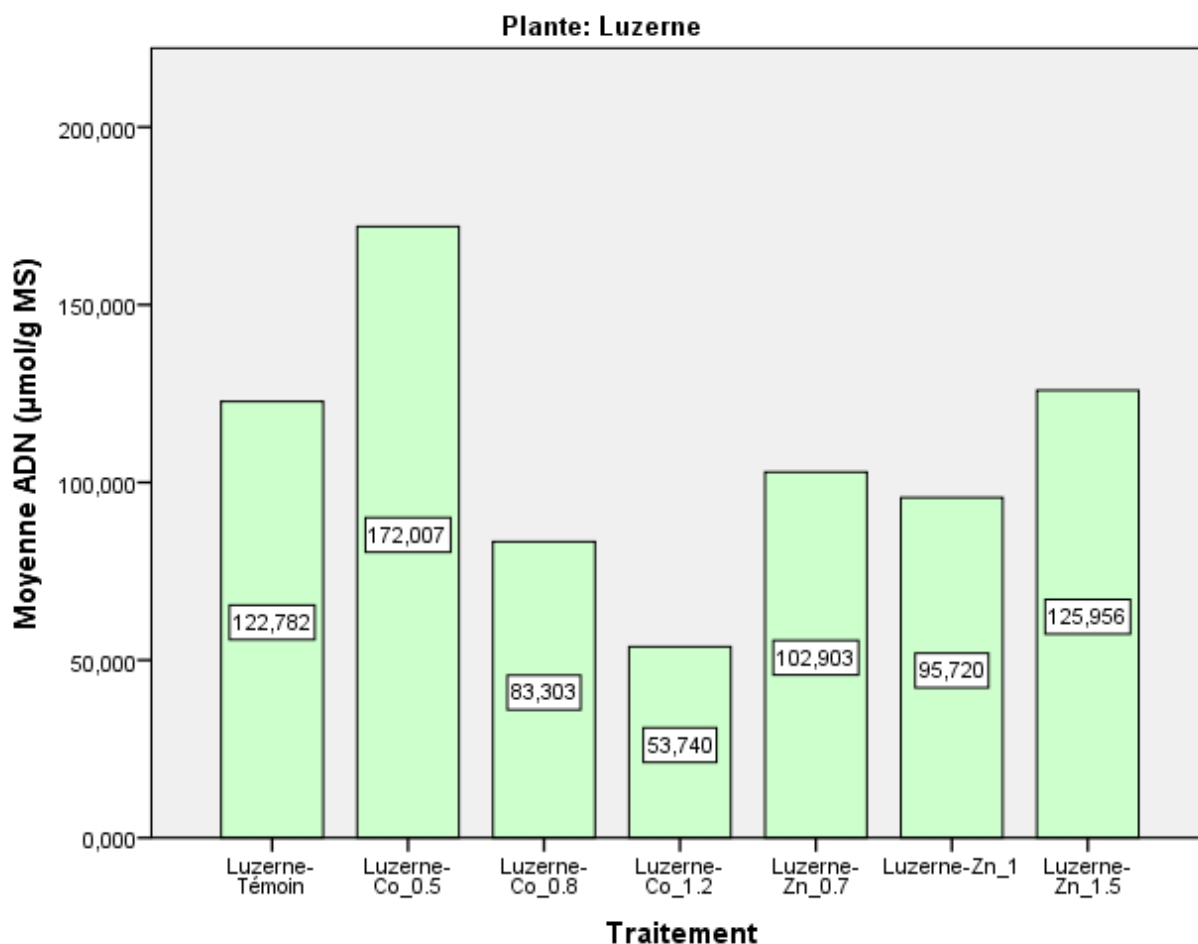


**Figure 3. 18 : répartition de l'α-amylase dans des sous-ensembles homogènes chez le trèfle**

Le test de Tukey montre qu'il n'y a pas de différences statistiquement significatives entre le témoin et les concentrations 1g/l de Zinc et 1.2g/l de Cobalt. Ce qui implique leur appartenance dans le même groupe homogène. Les traitements 0.7g/l Zinc et 0.8g/l Cobalt engendrent des taux d'amylase plus élevés par rapport aux autres groupes (**Figure 3.18**) (Annexe 2).

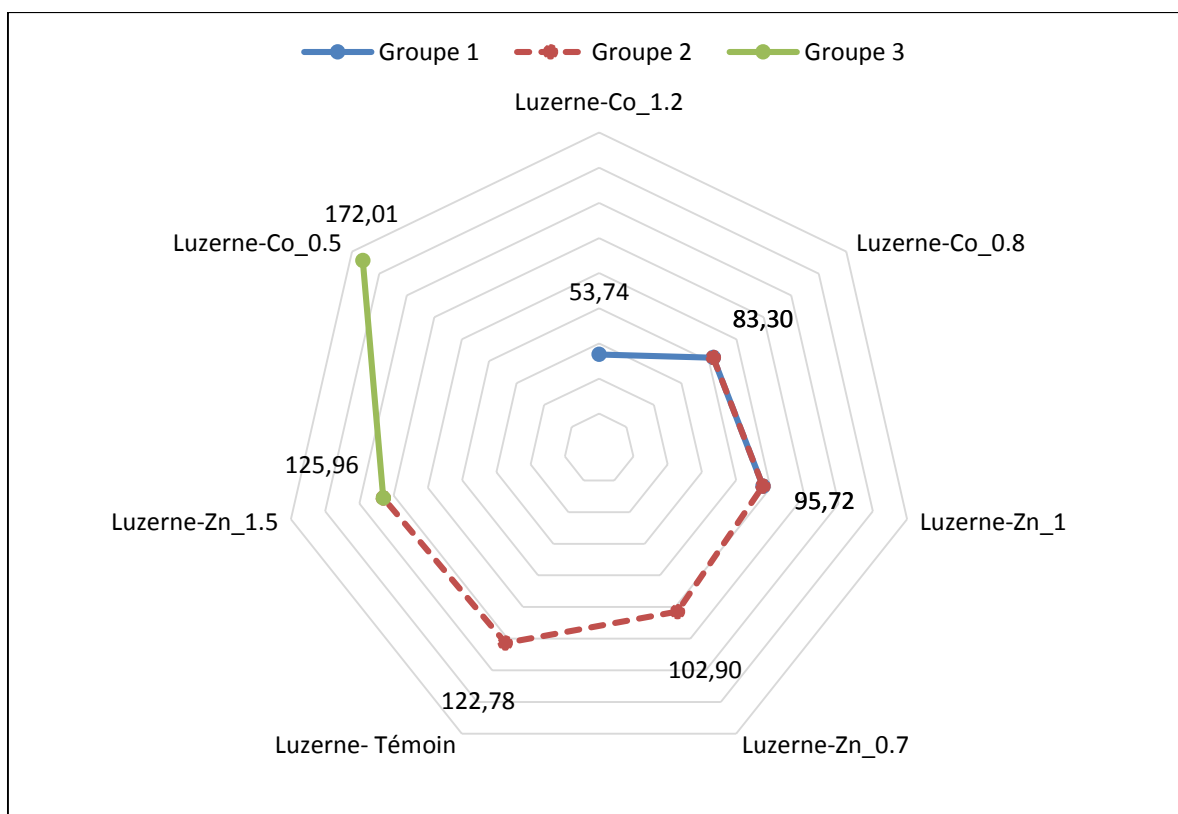
### 3.8. Teneur en ADN :

La figure 3.19 ci-dessous illustre l'impact des ETM sur la teneur en ADN des graines de la luzerne stressée par différentes concentrations du cobalt et du zinc.



**Figure 3. 19 : Effet des ETM sur la teneur en ADN (µmol/g MS) des graines du luzerne**

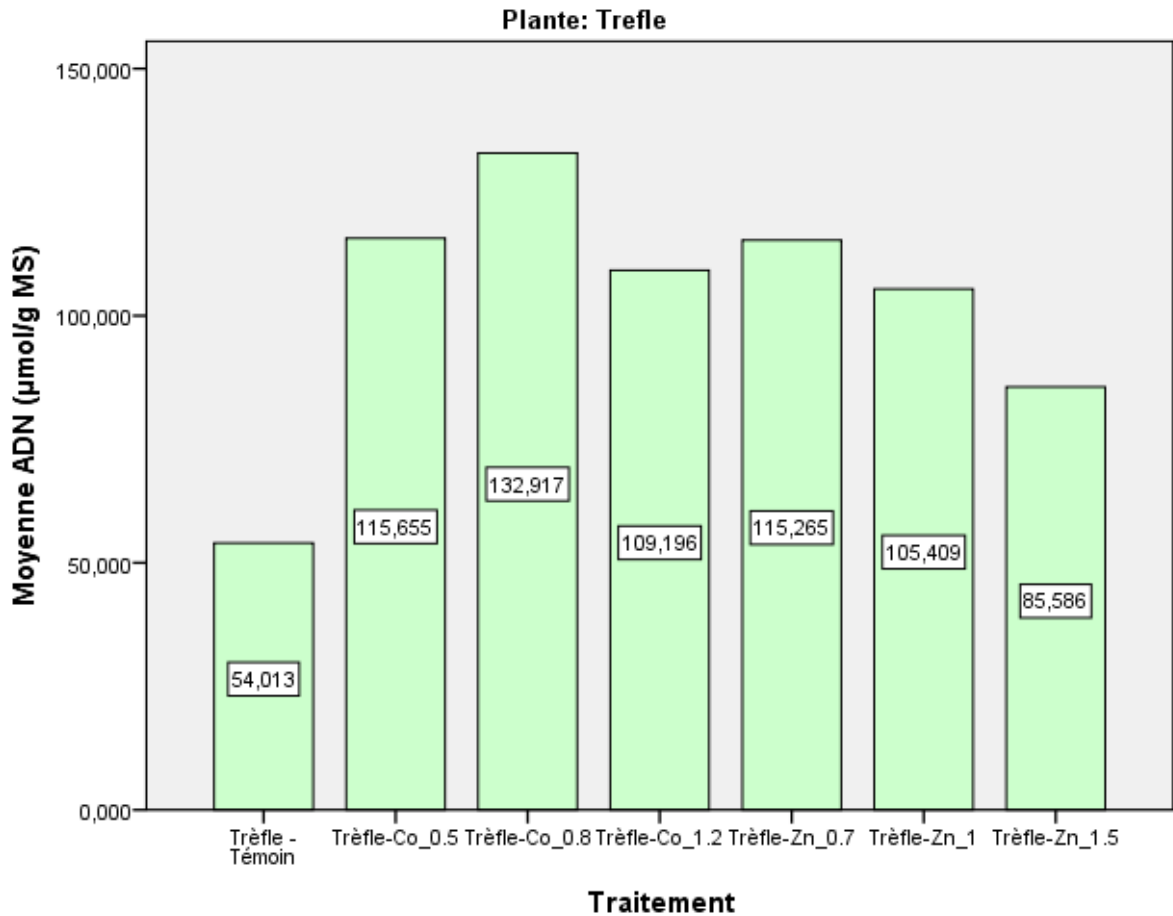
Pour la **luzerne** on remarque que chez le témoin la teneur d'ADN est de 122.782 µmol/g MS. On note une augmentation importante de la teneur en ADN de l'ordre de 172,007 µmol/g MS pour la concentration Co (0.5g/l), par contre dans le cas de Co (1.2g/l) on note la plus faible teneur en ADN qui est de l'ordre de 53.740 µmol/g MS (**Figure 3.19**). Le zinc provoque une variation similaire à faible de la teneur en ADN par rapport au témoin allant de 95.72 à 125.95 µmol/g MS.



**Figure 3. 20 : répartition de l'ADN dans des sous-ensembles homogènes chez la luzerne.**

On se basant sur le résultat du test de Tukey (Figure 3.20), on note la présence 03 groupes homogènes. Seules les concentrations 0.5 et 1.2 du Cobalt engendre des teneurs en ADN différentes du témoin (Annexe 2).

La figure 3.21 ci-dessous illustre l'impact des différentes concentrations du cobalt et du zinc sur la teneur en ADN des graines du trèfle.

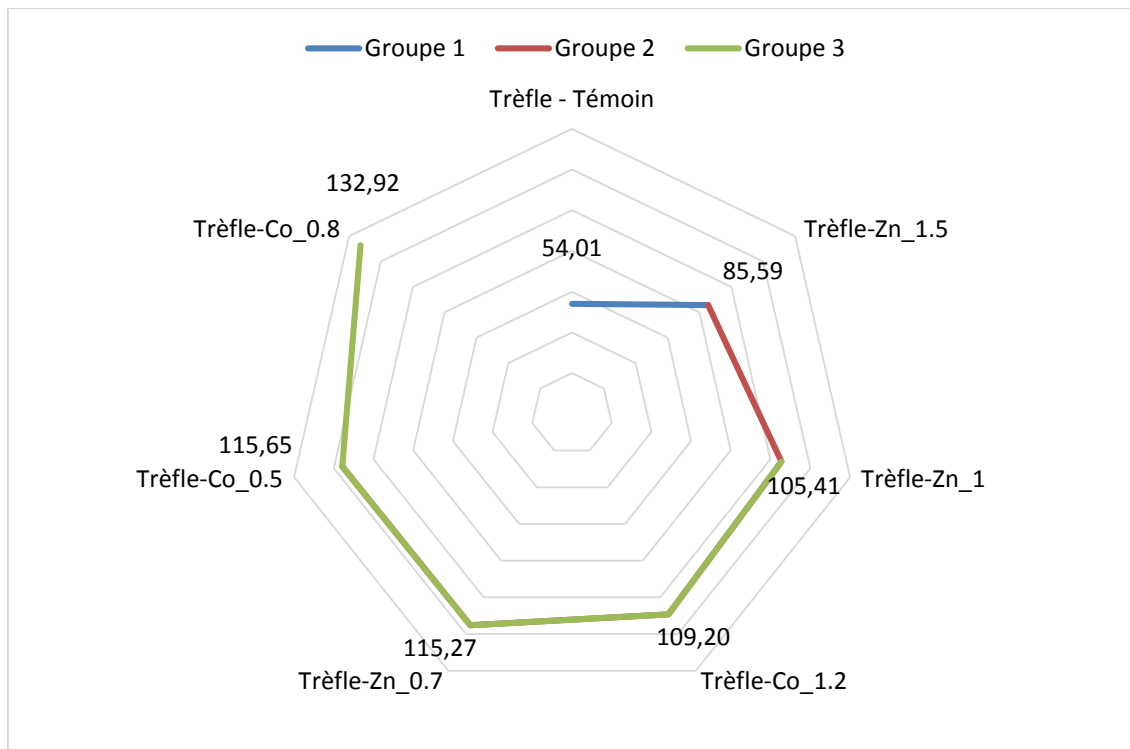


**Figure 3. 21 : Effet des ETM sur la teneur en ADN ( $\mu\text{mol/g MS}$ ) des graines du trèfle**

Pour **le trèfle** on remarque que chez le témoin la teneur en ADN est la plus faible avec une valeur de l'ordre de  $54,013 \mu\text{mol/g}$ , les valeurs de l'ADN obtenu augmentent proportionnellement avec les différentes concentrations des ETM.

En effet on note une valeur maximale de l'ordre de  $132,917 \mu\text{mol/g}$  pour le **cobalt** à  $0.8\text{g/l}$ , puis à  $0.5$  et  $1.2\text{g/l}$  on a trouvé  $115.655 \mu\text{mol/g}$  et  $109,196 \mu\text{mol/g}$  respectivement. Tandis que pour le lot traité par le **zinc**, on enregistre une valeur maximale de  $115.265 \mu\text{mol/g}$  pour la concentration Zn ( $0.7\text{g/l}$ ), cette valeur diminue avec l'augmentation des concentrations.





**Figure 3. 22: répartition de l'ADN dans des sous-ensembles homogènes chez le trèfle**

On note une absence de différences statistiquement significatives (Test de Tukey) entre le témoin et le zinc à 1.5 g/l ce qui se traduit par leur appartenance au groupe homogène 1. L'ensemble des traitements engendrent des résultats différents et supérieurs à ceux du groupe 1. (Annexe 2)

### 3.9. Détermination in - silico de la DL<sub>50</sub> du Zinc et du Cobalt

Nous avons opté pour une détermination *in-silico* de la DL<sub>50</sub> en se basant sur les résultats obtenus et cela par une méthode de modélisation prévisionnelle (la régression linéaire simple).

#### a. Évaluation de la pertinence du modèle de régression

##### - Analyse de variance

Le calcul de la valeur de F se fait automatiquement et le degré de signification associé est consigné dans la dernière colonne du tableau 3.1.

Les valeurs du F sont significatives à  $p < 0,0005$ . Ceci signifie que les probabilités d'obtenir une valeur F de cette taille par hasard sont de moins de 0,05 %. Dans ce cas, nous devons rejeter l'hypothèse nulle. Il y a donc une relation statistiquement significative entre les concentrations en Zinc et Cobalt et le pourcentage d'inhibition chez le Trèfle et la Luzerne. *Le zinc induit chez le Trèfle une stimulation il ne sera donc pas possible de calculer la DL<sub>50</sub> pour ce traitement*

**Tableau 3. 1 : analyse de variance pour le modèle de régression**

	ddl	F	Sig
Trèfle_Co	1,00	11,71	0,002
Luzerne_Co	1,00	175,99	0,000
Luzerne_Zn	1,00	8,36	0,008

#### b. Évaluation de la variabilité expliquée par le modèle de régression

##### - Les paramètres du modèle

Le tableau 3.2 nous donne les paramètres de l'équation du modèle de régression. Les coefficients non standardisés nous permettent de reconstituer l'équation de la droite de régression, qui sera de type :  $y = b_1 \cdot x$ .

**Tableau 3. 2 : Paramètres de l'équation du modèle de régression**

Traitement			Coefficients <sup>a, b</sup>		t	Sig.	
			Coefficients non standardisés	Coefficients standardisés			
			A	Erreur standard	Bêta		
Trèfle_Co	1	Dose	10,38	3,03	0,581	3,42	0,00
Luzerne_Co	1	Dose	39,01	2,94	0,940	13,27	0,00
Luzerne_Zn	1	Dose	7,24	2,50	0,516	2,89	0,01

a. Variable dépendante : Inhibition de la germination (%)

b. Régression linéaire à l'origine

La colonne des coefficients standardisés indique la valeur du coefficient de corrélation ( $\beta$ ). Elle apporte toutefois une nouvelle information : la valence de cette valeur (+ ou -). Donc le sens de la relation entre l'inhibition de la germination (y) et la concentration en Zinc ou en Cobalt (x) est proportionnel.

#### - Détermination de l'équation de régression

Le précédent tableau (Tableau 3.2) nous indique que les équations de régression sont les suivantes :

$$y = 10,38 \cdot x \dots\dots\dots (Cobalt \times Trèfle)$$

$$y = 39,01 \cdot x \dots\dots\dots (Cobalt \times Luzerne)$$

$$y = 7,24 \cdot x \dots\dots\dots (Zinc \times Luzerne)$$

#### - Détermination prédictive de la DL<sub>50</sub> du Zinc et du Cobalt

En se basant sur les équations nous obtenons, en remplaçant « y » (pourcentage d'inhibition) par « 50 » et « 99 » dans les équations nous obtenons :

**Tableau 3. 3 : Résultats du la DL<sub>50</sub> et de la DL<sub>99</sub> du Zinc et du Cobalt**

	DL <sub>50</sub> (g/l)	DL <sub>99</sub> (g/l)
<i>Cobalt X Trèfle</i>	4,81	9,5348
<i>Cobalt X Luzerne</i>	1,28	2,5376
<i>Zinc X Luzerne</i>	6,90	13,6711

### 3.10. Observation symptomatologique des traitements par le cobalt et le zinc sur la luzerne et le trèfle

Au cours de 3 jours de traitement, on a procédé au relevé symptomatologique des plantes. Les résultats sont consignés dans le tableau 3.4

**Tableau 3. 4 : Récapitulatif symptomatologique**

Plante	Traitement	Observation symptomatique		
		1 <sup>er</sup> jour	2 <sup>ème</sup> jour	3 <sup>ème</sup> jour
Luzerne	Cobalt 0.5 g/l	Flétrissement	Jaunissement Nécrose Brulure	Mort de la plante
	Cobalt 0.8 g/l	Flétrissement	Jaunissement Nécrose Brulure	Mort de la plante
	Cobalt 1.2 g/l	Flétrissement	Jaunissement Nécrose Brulure	Mort de la plante
	Zinc 0.7 g/l	<b>Plante d'aspect sain</b>	Jaunissement Nécrose	<b>Nécrose Brulure</b>
	Zinc 1 g/l	<b>Plante d'aspect sain</b>	Jaunissement Nécrose	Mort de la plante
	Zinc 1.5 g/l	<b>Plante d'aspect sain</b>	Jaunissement Nécrose	Mort de la plante
	Cobalt 0.5 g/l	Flétrissement	Jaunissement Nécrose	Mort de la plante
	Cobalt 0.8 g/l	Flétrissement	Jaunissement Nécrose Brulure	Mort de la plante
	Cobalt 1.2 g/l	Flétrissement	Jaunissement Nécrose Brulure	Mort de la plante
Trèfle	Zinc 0.7 g/l	<b>Plante d'aspect sain</b>	Jaunissement	Mort de la plante
	Zinc 1 g/l	<b>Plante d'aspect sain</b>	Jaunissement Nécrose Brulure	Mort de la plante
	Zinc 1.5 g/l	Flétrissement	Jaunissement Nécrose Brulure	Mort de la plante

## DISCUSSION

La contamination par les éléments traces métalliques (ETM) est devenue un problème environnemental majeur qui limite la productivité des plantes et menace la santé humaine (Demirevska-Kepova et al.2004).

Les principales sources de pollution par les éléments traces métalliques dans le monde sont les activités industrielles telles que l'exploitation minière, la combustion de carburants, les engrais et les pesticides (Redondo-Gómez et al. 2011). Certains éléments traces métalliques, comme le Zn, le Cu, le Mg, le Mo et le Ni, sont essentiels pour la croissance des plantes, mais sont toxiques à des concentrations élevées (Li et al, 2005 ; Tangahu et al. 2011).

L'évaluation de la toxicité causée par les éléments traces métalliques sur les plantes constitue un outil très important pour la recherche dans le domaine de la phytoremédiation. Plusieurs paramètres physiologiques peuvent être utilisés pour évaluer le stress induit par des éléments traces métalliques tels que la germination, la croissance et la production en biomasse, la teneur en ADN et Amylase et les activités des enzymes antioxydants (Kavuličová et al.2012).

La germination des graines est le premier stade de vie des plantes, et elle est l'un des processus physiologiques les plus sensibles qui peut être influencé par des facteurs environnementaux, biotiques et/ou abiotiques (Moosavi et al.2012). Par conséquent, l'étude du stade de la germination constitue un outil considérable pour comprendre les mécanismes toxiques des contaminants environnementaux sur les plantes (Cheng and Zhou, 2002 ; Liu et al.2012). La littérature suggère que la germination des graines est affectée par les métaux de deux manières. D'abord, par leur toxicité générale et d'autre part, par l'inhibition de l'absorption d'eau (Kranner and Colville, 2011).

D'après les résultats obtenus, les traitements par le Zinc et le Cobalt ont montré un effet inhibiteur au niveau de la germination chez les graines de la luzerne. Cependant, pour le trèfle le Zinc montre un effet *stimulant* de germination, cet effet est observé chez le Cobalt à 0.8g/l.

A partir de ces constatations on peut dire que la luzerne est plus sensible au zinc et au cobalt par rapport au trèfle. Où nous avons observé une forte réaction enzymatique.

Les ETM réduisent la vitesse du développement cellulaire et la synthèse des protéines (Neiman (1965) In Katterman, (1990). Chez la moutarde et le haricot cultivés en milieu toxiques, les auteurs rapportent une dépression significative de la teneur en ADN Chatterjee et al. (1985) ce qui est en concordance avec nos résultats, on observe une *diminution* de la teneur en ADN des graines de la *luzerne* sous l'effet du stress métallique du cobalt (0.8 ;1.2 g/l) et du zinc à (0.7 ;1 g/l), contrairement aux graines de trèfle où on a obtenu une teneur en ADN élevé.

La teneur en ADN est indicatrice de tolérance aux stress abiotiques selon Bouzid, (2009). De fortes concentrations en Cobalt induisent une faible teneur en ADN ce qui se traduit par une sensibilité au ETM. La luzerne est donc plus sensible aux Cobalt et au Zinc.

Les ions métalliques peuvent également interagir avec l'ADN, c'est notamment le cas du nickel, du chrome et du platine (Sharma et al.2008). Le nickel peut par exemple, par compétition avec le magnésium, modifier la condensation de la chromatine et réprimer ainsi l'expression de gènes (Briat and Lebrun, 1999).

L'activité de l' $\alpha$ -amylase, quant à elle, est nettement accélérée par le Cobalt et le Zinc. Nos résultats sont incompatibles avec ceux de (Mihoub et al ; 2005)173]. L'auteur relève une diminution importante de l'activité amylolytique en présence du cuivre et du cadmium et suggère que le Cd et le Cu n'affectent pas de la même manière les activités hydrolytiques des réserves nutritionnelles du petit pois.

Nos résultats comparés à ceux de (Mihoub, et al ; 2005) suggèrent que l'effet des ions cadmium et cuivre sur l'inhibition de l'activité de l' $\alpha$ -amylase se fait, au moins en partie, directement sur les protéines enzymatiques déjà synthétisées. Ainsi les travaux de (Lamhamdi, et al ,1999) sur l'effet du plomb sur la germination du blé appuient cette suggestion.

En analysant l'impact des ETM sur une multitude de fonctions physiologiques vitales de la plante, Ernst (1998) admet que la germination est un processus certes vulnérable au stress métallique, mais qui serait des plus résistants parmi les autres phases du développement de la plante. L'auteur a suggéré que les barrières tégumentaires des

graines y empêcheraient une forte accumulation des éléments- traces métalliques. Par ailleurs, pour tout processus physiologique ou métabolique, ce sont les seuils critiques de phytotoxicité, définis en termes d'accumulation tissulaire qui déterminent la sensibilité aux ETM (Woolhouse, 1983), (Fernandes, et al ,1991)

Le taux et le pourcentage de germination final des graines de la luzerne diminuent avec l'augmentation de la concentration des ETM dans le milieu. Par contre le TG et la germination final de trèfle. En effet, nos résultats soulignent que l'excès de cobalt et/ou de zinc dans le milieu provoque une toxicité réversible. Il est de même pour la vitesse, la moyenne ainsi que la cinétique de germination.

La croissance est un processus commun à tous les organismes vivants. Au niveau cellulaire, les composants de la croissance sont la division, l'élongation cellulaire et la production de diverses substances cellulaires.

L'exposition des plantes aux métaux lourds peut entraîner de nombreux troubles physiologiques et biochimiques. Le traitement avec du cobalt et du zinc affecte de manière significative la croissance des plantes, des études montrent que le cobalt et le zinc à affecter de façon significative les paramètres de croissance (Chugh et Sawhney, 1995 ; Herrieche, 2004).

Il est largement démontré que les microéléments affectent de nombreux processus morphologiques, physiologiques et biochimiques chez les plantes. La réduction de croissance est une des réponses les plus fréquentes et la première observable lorsque des plantes sont soumises à un stress (Adriano, 2001 ; Sandalio et al, 2001 ; Sobkowiak et Deckert, 2003).

Le cobalt, à forte concentration, engendre des effets toxiques chez tous les organismes vivants (Barceloux, 1999 ; Bresson et al.2009 ; Palit et al.1994). Le zinc est connu pour avoir un effet stabilisateur et protecteur sur les membranes biologiques contre les dommages oxydatifs (peroxydation), la perte d'intégrité de la membrane (Cakmak, 2000 et Powell, 2000), et également l'altération de la perméabilité de la membrane (Bettger, 1981).

Chez les plantes supérieures, l'exposition à des doses toxiques de cobalt entraîne la chlorose et la nécrose des feuilles, diminue la biomasse et modifie la morphologie des plantes (Ahmed et al ,2011 ; Kabata-Pendias, 2011)

Aux fortes concentrations, le cobalt inhibe la synthèse des chlorophylles a et b, le rendement du photosystème et la respiration mitochondriale (Tan et al.2010). Il déstabilise également l'homéostasie d'autres nutriments (P, S, Fe, Mn, Zn, Cu), notamment en perturbant leur assimilation et leur translocation des racines vers les feuilles (Gopal et al.2008).

Nos résultats montre que les éléments nutritifs en générale joue un grand rôle sur la croissance et la morphologie des plante, mais chaque plante besoin d'une certaine concentration de ses éléments, et un excès ou une carence vas causer un stress a la plante, et plusieurs symptôme vas apparaitre sur la morphologie de la plante, et dans nos travail le traitement de zinc et du cobalt à fortes et à faibles concentrations produit un développement ralenti par rapport au témoin, aussi des chloroses , des brulures, des nécroses, et par la fin une morte.

La réduction de croissance sensu stricto peut résulter d'une inhibition de la division cellulaire, d'une diminution de l'élongation cellulaire ou de ces deux processus simultanés (Arduini et al.1994).

Le statut hydrique, et plus particulièrement la pression de turgescence, c'est-à-dire la force exercée sur les parois par l'eau vacuolaire, est considéré comme le principal élément contrôlant le taux d'élongation cellulaire. Il est démontré que l'exposition aux éléments de trace peut conduire à une restriction de la nutrition minérale et à une modification du statut hydrique (Quariti et al.1997),

Dans ce processus d'inhibition de l'élongation cellulaire, l'impact des microéléments sur les propriétés physiques des parois cellulaires peut également être mis en cause puisqu'il a déjà été démontré que la toxicité des métaux peut induire une inhibition de l'extensibilité pariétale (Barceló et Poschenrieder, 1990).

Certains auteurs estiment que la fixation des microéléments par les molécules de la paroi pourrait contribuer à la diminution de leur extensibilité (Zheng et al.2003).



Diverses conséquences biologiques dues au contact des plantes avec des éléments de trace peuvent également contribuer à l'inhibition de leur croissance, comme une perturbation de l'activité de certaines enzymes intervenant dans des processus physiologiques essentiels au développement (photosynthèse, respiration) ou encore l'induction d'un stress oxydatif pouvant conduire à la mort cellulaire (Poschenrieder et Barceló, 2004).

# **CONCLUSION**

## CONCLUSION

Cette étude expérimentale a été entreprise dans le but d'étudier l'effet de métaux lourds cas zinc et cobalt à différentes concentrations sur les le développement et la croissance de la luzerne et du trèfle au stade germinatif et plantule. Elle rentre dans le cadre du projet international COST ACTION PLANTMETALS (CA 19116)

La réduction des paramètres de germinations (taux et cinétique de germination, la vitesse de germination et la moyenne de germination) est observée lorsque les graines sont soumises aux stress métallique cas de cobalt et zinc.

L'influence du stress appliqué par les ETM est démontrée auniveau de la vitesse de germination ou il y a une réduction pour la luzerne par rapport au témoin, contrairement à l'effet de zinc chez le trèfle qui fait augmenter la vitesse de germination par des concentrations appliquées du moins élevées au plus élevées. La cinétique de germination suit celle du témoin, ce qui explique le rôle indispensable et majeur de ces métaux pour le bon déclanchement de ce processus, et on peut dire que le zinc est un oligo-élément toléré par les graines même à des concentrations élevées. Dans notre expérience, le cobalt est plus toxique que le zinc, avec une réduction de la vitesse et le taux de germination.

D'après les résultats obtenus, les traitements par le Zinc et le Cobalt ont montré un effet inhibiteur au niveau de la germination chez les graines de la luzerne. Cependant, pour le trèfle le Zinc montre un effet stimulant de germination, cet effet est observé chez le Cobalt à 0.8g/l.

En effet, nos résultats soulignent que l'excès de cobalt et/ou de zinc dans le milieu provoque une toxicité réversible. Il est de même pour la vitesse, la moyenne ainsi que la cinétique de germination.

A différentes concentrations comparées aux plantes témoins non traité. L'activité de l' $\alpha$ -amylase, quant à elle, est nettement accélérée par le Cobalt et le Zinc. Une dépression significative de la teneur en ADN, on observe une diminution de la teneur en ADN des graines de la luzerne sous l'effet du stress métallique cas de cobalt (0.8 ;1.2 g/l) et du zinc à (0.7 ;1 g/l), contrairement aux graines de trèfle où on a obtenu une teneur en ADN élevé.

La teneur en ADN est indicatrice de tolérance aux stress abiotiques selon Bouzid (2009). De fortes concentrations en Cobalt induisent une faible teneur en ADN ce qui se traduit par une sensibilité au ETM. La luzerne est donc plus sensible aux Cobalt et au Zinc.

Enfin, le stress testés (cobalt et zinc) a joué un rôle physiologique important dans le déclenchement du processus de germination qui est une étape vulnérable. Le stress appliqué dans cette étude montre que la germination n'est affectée que par certaines concentrations en métaux cas du zinc. Les ETM sont des éléments qui assurent la bonne nutrition à la plante mais un excès ou une carence dans la concentration affect un stress a la plante. De ce fait il serait intéressant de pousser les expérimentations vers l'étude des mécanismes de translocation des ETM dans le végétal et ça contribution au priming des graines de plantes à intérêt socio-économique.

# **ANNEXES**

## ANNEXES

### ANNEXE 1

#### SOLUTION NUTRITIVE

(Solution de Hoagland) (Hoagland et al. 1933)

Elément	Concentration
<b>Macroéléments (pour 999 ml)</b>	
KNO <sub>3</sub>	0,006 M
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,004 M
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,002 M
Fe-EDTA	0,001 M
<b>Solution stock des Microéléments * 5 ppm*</b>	
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2,86 g/l
MnCl <sub>2</sub> . 4H <sub>2</sub> O	1,81 g/l
ZnSO <sub>4</sub>	0,22 g/l
CuSO <sub>4</sub>	0,08 g/l
MoO <sub>3</sub>	0,02 g/l

\* Prendre un millilitre (1ml) de la solution stock des microéléments et l'ajouter à 999 ml de la solution de macroélément.

## ANNEXE 2

### ANALYSE STATISTIQUE

#### ANOVA à 1 facteur

		Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
MDG	Inter-groupes	3,84	13,00	0,30	14,04	0,00
	Intra-groupes	1,47	70,00	0,02		
	Total	5,31	83,00			
TG	Inter-groupes	18815,48	13,00	1447,34	14,04	0,00
	Intra-groupes	7216,67	70,00	103,10		
	Total	26032,14	83,00			

#### ANOVA à 1 facteur

##### TMG

		Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Inter-groupes		143,57	13,00	11,04	52,97	0,00
Intra-groupes		14,59	70,00	0,21		
Total		158,16	83,00			

#### ANOVA à 1 facteur

		Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
ADN ( $\mu\text{mol/g MS}$ )	Inter-groupes	28453,05	12,00	2371,09	8,18	0,00
	Intra-groupes	6957,54	24,00	289,90		
	Total	35410,59	36,00			
Amylase (U/ml)	Inter-groupes	0,00	13,00	0,00	1007,72	0,00
	Intra-groupes	0,00	27,00	0,00		
	Total	0,00	40,00			

## ANOVA à 1 facteur

Pourcentage d'inhibition %						
	Plante	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Trèfle	Inter-groupes	3917,67	5,00	783,53	5,09	0,00
	Intra-groupes	4618,69	30,00	153,96		
	Total	8536,35	35,00			
Luzerne	Inter-groupes	13703,34	5,00	2740,67	14,60	0,00
	Intra-groupes	5631,51	30,00	187,72		
	Total	19334,85	35,00			



## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abdelguerfi A., 2001. Sources Génétiques D'intérêt Pastorale Et/Ou Fourragère ; Distribution Et Variabilité Chez Les Légumineuses Spontanées (*Medicago*, *Trifolium*, *Scorpiurus*, *Hedysarium* Et *Onobrachis* ) En Algérie, These De Doctorat, Ina, El-Harrach, P325
- Adriano DC. 2001. Trace elements in terrestrial environments: biogeochemistry, bioavailability and risks of metals. 2nd Edition Springer- Verlag , New York, Berlin, Heidelberg, p 867.
- Akiko Ike, Rutchadaporn S.,2006. Bioremediation Of Cadmium Contaminated Soil Using Symbiosis Between Leguminous Plant And Recombinant Rhizobia With The Mtl4 And The Pcs Genes
- Anzala F. J,2006 - Contrôle De La Vitesse De Germination Chez Le Maïs (*Zea Mays*) : Étude De La Voie De Biosynthèse Des Acides Aminés Issus De L'aspartate Et Recherche De Qtls. Thèse De Doctorat ; Université D'angers ; 148 P.
- Aoun, Michel. 2008. « Action du cadmium sur les plants de moutarde indienne [*Brassica juncea* (L.) Czern] néoformés à partir de couches cellulaires minces et issus de semis. Analyses physiologiques et rôle des polyamines. » Université de Bretagne occidentaleBrest.
- Baker, Alan JM, et Paul L. Walker. 1990. « Ecophysiology of metal uptake by tolerant plants ». Heavy metal tolerance in plants: evolutionary aspects 2: 155–165.
- BARCELO J., POSCHENRIEDER CH. (1990): Plant water relations as affected by heavy metal stress: a review. J. Plant Nutr., 13: 1–37.
- Barceló, Juan & Poschenrieder, Charlotte. (2008). Plant Water Relations as Affected by Heavy Metal Stress: A Review. Journal of Plant Nutrition. 13. 1-37. 10.1080/01904169009364057.
- Barceloux, D.G. (1999). Cobalt. Clin. Toxicol. 37, 201–216
- Baudoin J.P., 2001. Contribution Des Ressources Phytogénétiques À La Sélection Variétale De Légumineuses Alimentaires Tropicales. Biotechnol. Agron. Soc. Environ. 2001 N°5, Pp : 221-230.
- Behanzin, Gbèssohèlè Justin, Euloge S. Adjou, Abdou Ganiou Yessoufou, E. Dahouenon Ahoussi, et A. Sezan. 2015. « Effet des sels de métaux lourds (chlorure de Cobalt et chlorure de Mercure) sur l'activité des hépatocytes ». Journal of Applied Biosciences 83 (1): 7499–7505.
- BEINHART G. (1962) : Effet de la température et de l'intensité lumineuse sur l'absorption de CO<sub>2</sub>, la respiration et la croissance du trèfle blanc, Pl. Physiol., Lancastre 37, 709-15. Quelques graminées
- Benavides, María P., Susana M. Gallego, et María L. Tomaro. 2005. « Cadmium toxicity in plants ». Brazilian Journal of Plant Physiology 17 (1): 21–34.

- Bewley D.J. , Seed Germination And Dormancy, Plant Cell 9 (1997) 1055–1066
- Bewley J.D Et Black M., 1994 - Seeds: Physiology Of Development And Germination. Péplum Press. New York (Ny). 445 P.
- Birouk A., Bouizgaren A. et Baya B. “Luzerne (Medicago sativa L.)”In: “Production et utilisation des cultures fourragères au Maroc”, Edt. G.Jaritz et M. Bounejmate, INRA Maroc, (1997), 126-139.
- Bolton J. L., “Alfalfa-botany cultivation and fertilisation”, Interscience Publ., New York, (1962), 474p.
- Bolton J.L., Goplen B.P., Baenzinger H., “World distribution and historical developments, Ch. 1, In Alfalfa science and technology, Monographie” N°15, American Society of Agronomy, 1-34.
- Boussadi M., Hammadache A., “Essai de comportement de 11 variétés de luzerne pérenne (Medicago sativa L) en zone sub-humide.” Revue Céréaliculture, n°24, (1991), 25-30.
- Bouzid S., 2009. Étude De L’effet De La Salinité Et De La Présence Du Molybdène Sur Le Comportement Écophysologique De Deux Variétés De Plantes De L’espèce Phaseolus Vulgaris L. Thèse De Magister.
- Bray E.A., Bailey-Serres J. And Weretilyk E., 2000 - Molecular Mechanisms Of Potassium And Sodium Uptake In Plants. Plant Soil 247: 43-54.
- Bresson, C., Lamouroux, C., Sandre, C., Tabarant, M., Gault, N., Poncy, J.L., Lefaix, J.-L., Den Auwer, C., Spezia, R., Gageot, M.-P., Ansoborlo, E., Mounicou, S., Fraysse, A., Deves, G., Bacquart, T., Sez nec, H., Pouthier, T., Moretto, P., Ortega, R., Lobinski, R., Moulin, C., 2006. An interdisciplinary approach to investigate the impact of cobalt in a human keratinocyte cell line. Biochimie 88, 1619–1629.
- Briat J.F., Lebrun M, 1999. Plant responses to metal toxicity. Plant Biology and Pathology 322: 43-54
- Burton K . A Study Of The Conditions And Mechanism Of The Diphenylamine Reaction For The Colorimetric Estimation Of Deoxyribonucleic acid (1956). Biochem. J 62, 315- 322.
- Cakmak, I., et Horst, W.J., 1991. Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxidedismutase, catalase and peroxidase activities in root tips of soybean (Glycine max). Physiol.Plant 83: 463-468.
- Chaabena A., Abdelguerfi A., “Situation de la luzerne pérenne dans le Sahara et comportement de quelques populations locales et variétés introduites dans le sud-est du Sahara algérien.” XVe Réunion Eucarpia du Groupe Medicago spp.Zaragoza et Lleida.Espagne, 12au 12.09. 2001, 57-60.

- Chaabena A., Abdelguerfi A., Eddoud A., Chehma A., Babahani S., Bradai L., Benamor O., Souta H., Rahmani A., Benhania A., Bouziani I., Maamri K., Touati A., Trabelsi H., Achour L. (2006). Importance des Fabaceae dans la flore saharienne : cas des régions de Ouargla et Oued Righ. Workshop International sur la diversité des Fabacées fourragères et de leurs symbiotes : Applications Biotechnologiques, Agronomiques et Environnementales. ITGC, Alger, du 19 au 22 Février 2006. 49-51.
- Chatterjee C., Nautiyal N., Agarwala S.C (1985): Metabolic Changes In Mustard Plant Associated With Molybdenum Deficiency. New Physiologist. Vol.100, N°4, Pp. 511-518.
- Chaussat R., 1999 - Productions Végétales : Croissance Et Développement Des Plantes. Ed. Paris ; P. 5-16.
- Cheng, Y., Zhou, Q., 2002. Ecological toxicity of reactive X-3B red dye and cadmium acting on wheat (*Triticum aestivum*). J. Environ. Sci. China 14, 136–140.
- Chugh L.K. & Sawhney S.K. 1996. Environ. Pollut. 92:1–5.
- 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): 1-5.
- Clemens S, 2001. Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. Planta 212: 475-486
- Come D., 1970 - Les Obstacles À La Germination. Ed. Masson Et Cie.162 P.
- Degaichia H. 2015 . Essai de rhizodégradation des éléments de traces métalliques (cas du cuivre et du cadmium) par *Bradyrhizobium* sp. prélevé sur *Lotus ornithopodioides* et analyse de son activité antifongique. Université blida 1. Mémoire de Magister. 72,78p
- Delgado M.J. Et Ligeró F. (1994). Effect Of Salt Stress On Growth And Nitrogen Fixation By Pea. Faba-Bean. Common Bean And Soybean Plants. Soil Biol. Biochem. 26: 371 - 376.
- Demarquilly C. et Weiss, P.H., "La valeur alimentaire des fourrages verts", Revue, Fourrage, n°43, (1970), 30p.
- Demirevska-Kepova, K., Simova-Stoilova, L., Stoyanova, Z., Holzer, R., Feller, U., 2004. Biochemical changes in barley plants after excessive supply of copper and manganese. Environ. Exp. Bot. 52, 253–266. doi:10.1016/j.envexpbot.2004.02.004
- Di Benedetto, M., S. Anfossi, E. Billiard, M. Bonnet, F. Henriot, F. Kraemer, L. Lechenne, M. Le Herissier, et S. Lorin. 1997. « Méthodes spectrométriques d'analyse et de caractérisation ». Dossier SAM, les métaux lourds. Axe « Génie des Procédés », centre SPIN, Ecole des Mines de Saint-Etienne.
- Donald G. Barceloux & Dr. Donald Barceloux, Pages 201-216 | Published online: 06 Aug 1999. Journal of toxicology : clinical toxicology volume 37, 1999-issue 2.

- El allaoui A. La fertilisation minérale des cultures, les éléments majeurs Bulletin mensuel d'information et de liaison, Revue : Transfert de technologie en agriculture, institut agronomique et vétérinaire Hassan 2, Rabat, 2007, 24p
- Ercal, N., Gurer-Orhan, H., and Aykin-Burns, N. (2001). Toxic metals and oxidative stress
- Ernst W.H.O., Effects Of Heavy Metals In Plants At The Cellular And Organismic Level Ecotoxicology, In : S. Gerrit, M. Bernd (Eds.), Iii. Bioaccumulation And Biological Effects Of Chemicals, John Wiley & Sons And Spektrum Akademischer Verlag, 1998, Pp. 587–620
- Fernandes J.C., Henriques F.S., Biochemical, Physiological And Structural Effects Of Excess Copper In Plants, Bot. Rev. 57 (1991) 246–273
- Finch-Savage W.E., Leubner-Metzger G., 2006 - Seed Dormancy And The Control Of Germination. New Phytol. 171: 501-523
- Flesh V., 1991 - Etude Du Développement Végétatif Et De L'accumulation En Métabolites Terpeniques De Ginkgo Biloba L. En Conditions Contrôlées Et Naturelles. Thèse De Doctorat ; Université De Paris ; 262 P.
- Garty, J., Y. Karary, et J. Harel. 1992. « Effect of low pH, heavy metals and anions on chlorophyll degradation in the lichen Ramalina duriaei (De Not.) Bagl. » Environmental and experimental botany 32 (3): 229–241.
- Gimeno-Gilles C., 2009 - Étude Cellulaire Et Moléculaire De La Germination Chez Medicago Truncatula. Thèse De Doctorat. Université D'angers. 174p.
- Gopal R, Rizvi AH. 2008. Excess lead alters growth, metabolism and translocation of certain nutrients in radish. Chemosphere. 70(9), 1539–1544.
- Grenier G., Huguet L., Guy P., Sauvion A., Traineau R., "Influence du rythme d'exploitation et du génotype sur la qualité de la luzerne" Revue Fourrages, n°76, (1978), 73-83.
- Hall, J.L. (2002). Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. J. Exp.Bot. 53, 1–11.
- Hamadach A., 1998. Les Fourrages Verts : Un Imperatif Au Développement De La Production Laitière ; Résultats De Recherche Sur Le Trèfle D'alexandrie (Bersim). Céréaliculture. Itgc. N°39, Pp 113
- Heller R., Robert E., Claude L.. 1998 - Physiologie Végétale. Vol. (1) Nutrition; Edit. Dunod. Paris. 322 P.
- Herrieche, O., 2004. Impact du cadmium et l'interaction cadmium-calcium sur la germination et la croissance du blé dur (Triticum durum Dsf., Var. Vitron). Effet sur la

respiration des racines. Mémoire de Magister en toxicologie. Département de Biologie. Université Annaba: 120 pages.

- Heuzé V., Tran G., Bastianelli D., Lebas F., 2019. Murier blanc (*Morus alba*). Feedipedia, programmé par INRAE, CIRAD, AFZ and FAO. dernières mises à jour 13, 2019, 17 :47.
- Hnatyszyn, M. et Guais, A., “Les fourrages de l'éleveur. Agriculture d'aujourd'hui, techniques et applications”, Ed, J-B Baillière, (1988), 440p.
- Hoagland D.R. ; Snyder W.C. (1933). “Nutrition of strawberry plant under controlled conditions. (a)Effects of deficiencies of boron and certain other elements, (b) susceptibility to injury from sodium salts”. Proceeding of American Society for Horticultural Science. 30 : 288-294
- Hopkins W. G., 2003 - Physiologie Végétale. Traduction De La 2ème Édition Américaine Par Serge R. Ed. De Bocck ; P. 66-81 ; 309-362.
- Houmani M. 1999. Situation Alimentaire Du Bétail En Algérie. Recherche Agronomique , N°4,P35-41
- Huyghe C. Place des légumineuses fourragères à grosses graines dans les systèmes de production en France. Workshop international sur « Diversité des Fabacées fourragères et de leur symbiotes : Application biotechnologiques, agronomiques et environnementales », Edt. A. Abdelguerfi, Alger 19-22 fév. (2006), 163-174.
- Huygue P., “Les sorghos fourragers”, Revue Fourrages, n°27, (1966), 71-107.
- INRA Maroc, “Les cultures fourragères irriguées au Maroc”, INRA Rabat, (1965), 28p.
- Kabata-Pendias, Alina. 2010. Trace elements in soils and plants. CRC press.
- Kavuličová, J., Kaduková, J., Ivánová, D., 2012. The Evaluation of Heavy Metal Toxicity in Plants Using the Biochemical Tests. Nov. Biotechnol. Chim. 11, 101–110. doi:10.2478/v10296-012-0011-2
- Kranner, I., Colville, L., 2011. Metals and seeds: Biochemical and molecular implications and their significance for seed germination. Environ. Exp. Bot. 72, 93–105. doi:10.1016/j.envexpbot.2010.05.005
- Lagadic, C., Caquet, T., 1996. Marqueurs biologiques de pollution : des outils au service de l'écotoxicologie. INRA Mens. 34–38.
- Lamhamdi Mostafa, Ahmed Bakrim , Ahmed Aarab , René Lafont , Fouad Sayah. Lead Phytotoxicity On Wheat (*Triticum Aestivum* L.) Seed Germination And Seedlings Growth . C. R. Biologies 334 (2011) 118–126
- Lapeyronie A. Les productions fourragères méditerranéennes. Tome-1- Généralité, caractères botaniques et biologiques. Techniques agricoles et productions méditerranéennes. (1982), Ed. G.P. Maison neuve et la rose, Paris, France, 425p.

- Lasat, Mitch M., Nicole S. Pence, David F. Garvin, Stephen D. Ebbs, et Leon V. Kochian. 2000. « Molecular physiology of zinc transport in the Zn hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* ». *Journal of Experimental Botany* 51 (342): 71–79.
- Lavoigne M. et Peres M., “Intérêt des associations fourragères, graminée-luzerne pour économiser la fumure azotée.”, *Revue Fourrages*, n°134, (1993). 121-144.
- Leboeuf J., Shorti R., Tan C., Verhallel A., 2008 – Etablissement d’un calendrier d’irrigation pour les tomates – Introduction. Spécialiste de culture des légumes, MAAARO, Ridgeway Bureau régional du Nord de l’Ontario. Ministère de l’Agriculture, de l’Alimentation et des affaires rurales. Note technique. 12p.
- Lemaire G., Allirand J.M., “Relation entre croissance et qualité de luzerne : Interaction génotype-mode d’emploi.” *Revue Fourrages*, n°134, (1993), 121-144.
- Lemaire G., Cruz P., Goss G., Chartier M., “Etude des relations entre la dynamique de prélèvement d’azote et la dynamique de croissance en matière sèche d’un peuplement de luzerne ”, *Revue Agronomie*, n°5(8), (1985), 685-692.
- 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 Regul.* 46, 45–50. doi:10.1007/s10725-005-6324-2
- Liu, Cheng & Kroeze, C. & Hoekstra, Arjen & Gerbens-Leenes, Winnie. (2014). Liu-et-al-2012-WPL2000.
- Lugan R.. 2008 - Phénotypage Métabolique Des Réponses Aux Stress Abiotiques Chez *Arabidopsis Thaliana*. Analyse Fonctionnelle Et Intégrative Du Métabolome Et Phénotypage Métabolique Des Réponses Aux Stress Abiotiques Chez *Arabidopsis Thaliana*. Thèse De Doctorat; Université De Rennes. 139 P.
- Malki M., Hamadache A.. 1999 - Les Légumineuses Alimentaires En Algérie : Situation Actuelle Et Perspectives. Collectif, 1999. 150 P. Ed. Itgc.
- Marcato, Claire-Emmanuelle. 2007. « Origine, devenir et impact du cuivre et du zinc des lisiers porcins. Rôle de la digestion anaérobie »
- Mauriès M. (1994a) La luzerne aujourd’hui : Vaches laitières, vaches allaitantes, chèvres, brebis, chevaux. 254 p.
- Mauriès M. et Paillat J. “Culture et utilisation de la luzerne: pratiques des éleveurs de bovines du centre de la Charente” *Revue Fourrages*, n°149, (1997), 69-79.
- Mihoub Asma, Abdelilah Chaoui, Ezzedine El Ferjani , Changements Biochimiques Induits Par Le Cadmium Et Le Cuivre Au Cours De La Germination Des Graines De Petit Pois (*Pisum Sativum* L.) *C. R. Biologies* 328 (2005).
- Milner, Matthew J., et Leon V. Kochian. 2008. « Investigating heavy-metal hyperaccumulation using *Thlaspi caerulescens* as a model system ». *Annals of botany*

102 (1): 3–13

- Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 7,405–410.
- Moosavi S.G., Seghatoleslami M.J., Moazeni A. (2012): Effect of planting date and plant density on morphological traits, LAI and forage corn (Sc. 370) yield in second cultivation. *International Research Journal of Applied and Basic Sciences*, 3, 1, 57-63.
- Moosavi, S.A., Gharineh, M.H., Afshari, R.T., Ebrahimi, A., 2012. Effects of Some Heavy Metals on Seed Germination Characteristics of Canola (*Barassica napus*), Wheat (*Triticum aestivum*) and Safflower (*Carthamus tinctorious*) to Evaluate Phytoremediation Potential of These Crops. *J. Agric. Sci.* 4, 11–19. doi: <http://dx.doi.org/10.5539/jas.v4n9p11>
- Moulis, J.-M. (2010). Cellular mechanisms of cadmium toxicity related to the homeostasis of essential metals. *BioMetals* 23, 877–896.
- Nacef M., Ait Lounis Y., 2009. Etude De Quelques Espèces Légumineuses Spontanées : Evaluation De L'enherbement Et Biométrie, Évaluation De La Digestibilité. Département D'agronomie. Blida. P103.
- Neiman (1965) In Katterman F. (1990): *Environmental Injury To Plants*. Ed. Academic Press Inc. P.264
- Nivot N., 2005 - Essais De Germination Et De Bouturage De Six Espèces Indigènes Sciaphytes Du Canada. Thèse De Doctorat; Université De Saint Yacinthe (Québec). 116 P.
- Nouar S., 2007 - Réponse Physiologique De La Fève (Vicia Faba L.) Au Stress Thermique. Thèse De Magister ; Ina. El-Harrach; 86 P.
- Picard J. "Les légumineuses dans la production fourragère française ; évolution au cours des vingt dernières années", *Revue Fourrages*, n°90, (1982), 17-26.
- Planquert P., "L'exploitation de la luzerne", *Revue Fourrage*, n°26, (1966), 34-48.
- Prnovost M., 2010 - Isolation And Characterization Of A Na<sup>+</sup> / H<sup>+</sup> Antiporter Gene From The Halophyte *Atriplexgmelini*. *Plant Molecular Biology*. 46: 35-42.
- Quariti O., H. Govia, M.H. Ghorbal Response of bean and tomato plants to cadmium, growth mineral nutrition and nitrate reduction *Plant Physiol. Biochem.*, 35 (1997), pp. 347-354
- Rauser WE, 1999. Structure and function of metal chelators produced by plants: the case for organic acids, amino acids, phytin, and metallothioneins. *Cell Biochem Biophys* 31: 19-48.
- Redondo-Gómez, S., Mateos-Naranjo, E., Vecino-Bueno, I., Feldman, S.R., 2011. Accumulation and tolerance characteristics of chromium in a cordgrass Cr-hyperaccumulator, *Spartina argentinensis*. *J. Hazard. Mater.* 185, 862–9.



doi:10.1016/j.jhazmat.2010.09.101

- Remon, E., 2006. Tolérance et accumulation des métaux lourds par la végétation spontanée des friches métallurgiques : vers de nouvelles méthodes de bio-dépollution.
- Rout, Gyana Ranjan, et Premananda Das. 2009. « Effect of metal toxicity on plant growth and metabolism: I. Zinc ». In *Sustainable Agriculture*, 873–884. Springer.
- Sadeghzadeh, B. 2013. « A review of zinc nutrition and plant breeding ». *Journal of soil science and plant nutrition* 13 (4): 905–927.
- Sandalio LM, Dalurzo HC, Gomez M, Romero-Puertas MC, Del Rio LA. 2001. Cadmium induces changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. *Journal of Experimental Botany*. 52, 2115-2126.
- Seo M., Nam B Ara E., Choi G. Et Yamagushi S., 2009 - Interaction Of Light And Hormone Signals In Germinating Seeds. *Plant Mol Biol*. 69: 463-472.
- Sharma S.S. Et 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, Pallavi, Ambuj Bhushan Jha, Rama Shanker Dubey, et Mohammad Pessarakli. 2012a. « Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions ». *Journal of Botany* 2012.
- Sinskaya E.N. "Flora of cultivated plants of the USSR.XIII Perennial Legumes plants. Part I. Medic, sweet clover, and fenugreek." Traduit par Israel program for Scientific Translation, (1950), Jerusalem.
- Sobkowiak R, Deckert J. 2003. Cadmium-induced changes in growth and cell cycle gene expression in suspension-culture cells of soybean. *Plant Physiology and Biochemistry*. 41, 767-772.
- Somasegaran P., Hoben H.J., 1994: *Handbook For Rhizobia*. Springer Verlage New York. Inc .Pp 450.
- Srivastava L.M., 2002 - *Plant Growth And Development. Hormones And Environment*. Ed. Academie Press. San Diego (Ca). 772 P.
- Tangahu, B.V., Sheikh Abdullah, S.R., Basri, H., Idris, M., Anuar, N., Mukhlisin, M., 2011. A review on heavy metals (As, Pb, and Hg) uptake by plants through phytoremediation. *Int. J. Chem. Eng.* doi:10.1155/2011/939161
- Thenard V., Mauriès M, Trommenschlager J.M. "Intérêt de la luzerne déshydratée dans les rations complètes pour vaches laitières en début de lactation" *INRA, Prod. Anim.* N°15, (2002), 119-124.
- Thot J., 2005 - *Plant Cellular And Molecular Responses To High Salinity*. *Plant Cell Rep.* 20: 463-468.

- Tsonev, Tsonko, et Fernando Jose Cebola Lidon. 2012. « Zinc in plants-An overview ». Emirates Journal of Food and Agriculture 24 (4): 322.
- Vallee C., Bilodeau G. Et Joliette-D-L C., 1999 Les Techniques De Culture En Multicellules. Ed. Presses Université Laval; 394 P.
- Weeks, J.M., 1995. The value of biomarkers for ecological risk assessment: academic toys or legislative tools? Weeks. 1995. value biomarkers Ecol. risk Assess. Acad. toys or Legis. tools?. Appl. Soil Ecol. 2 215-216. 4, 215–216
- Whyte R.O., Nilsson- Leissner G., Trumble H., “Les légumineuses en agriculture”, Etude agricole de la FAO, n°21, (1955).
- Wilsie P., “Crop adaptation and distribution, Freeman, San Fransisco et Londres”, (1962).
- Woolhouse H.W., Toxicity And Tolerance In The Responses Of Plants ToMetals, In : O.L. Lange, P.S. Nobel, C.B. Osmond, H. Ziegler (Eds.), Encyclopaedia Of Plant Physiology, New Series 12c, Springer-Verlag, Berlin, 1983, Pp. 245–300.
- Xu, Q., Shi, G., Zhou, H., Xu, N., Zhang, X., Zeng, X., 2003. Effect of Cd and Zn combined pollution on chlorophyll content and scavenging system of activated oxygen in leaves of *Ottelia alismoides* (L.) pers. Chin. J. Ecol. 22 (2), 5–8.
- Young J.A. Et Young C.G., 1986 - Collecting, Processing And Germinating Seeds Of Wild Land Plants. Ed. Timber Press, Portland (Or); 236 P.
- Zaghouane O., 1991 - The Situation Of Faba Bean (*Vicia Faba* L.) In Algeria. Options Méditerranéennes: Série Séminaires 10: 123-125.
- Zhizhuang Xiao, Reginald Storms, Adrian Tsang. A Quantitative Starch–Iodine Method For Measuring Alpha-Amylase And Glucoamylase Activities, Anal. Biochem 351. (2006) 146-148