

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة 8 ماي 1945
Université 8 Mai 1945 Guelma
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Sciences de la terre et de l'Univers



Mémoire En Vue de l'Obtention du Diplôme de Master

Domaine : Science de la Nature et de la Vie
Filière : Sciences Biologique
Département : Biologie
Spécialité /Option : Biologie moléculaire et Cellulaire

Thème

**Effet de l'environnement sur quelque paramètres biochimiques
dont le stress oxydatif chez les végétaux (cas de Vicia faba)**

Présenté par :

- Hafersses Aya
- Hafersses Rahma
- Tadjine Alya

Membres du jury :

Président :	AMRIS	M.C.B	Université de Guelma
Examinatrice :	BENOSMAN.S	M.C.B	Université de Guelma
Encadreur :	BENBELKACEM .S	M.C.B	Université de Guelma

Juillet 2021

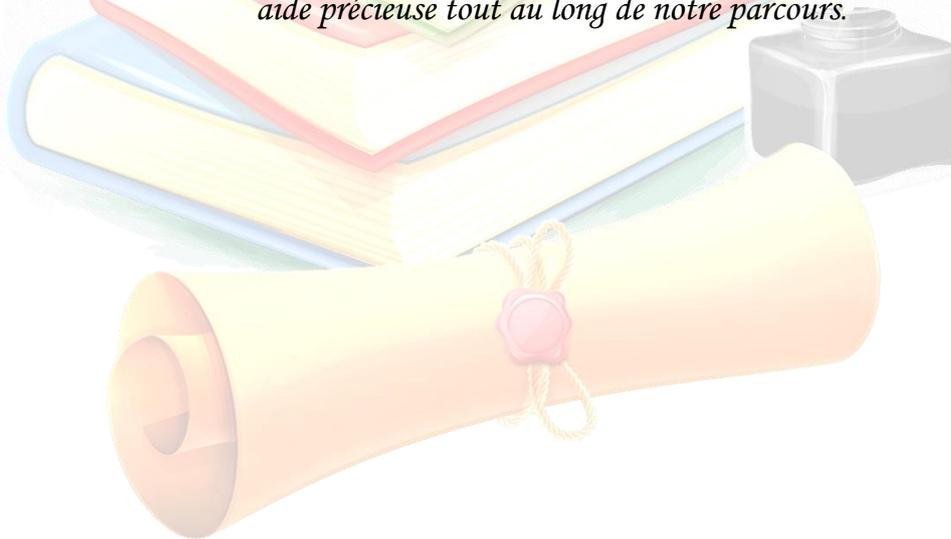


Remerciements

Notre reconnaissance, et nos sincères remerciements vont à notre encadreur Mme Benbelkacem Sofia, pour nous avoir dirigé tout au long de la réalisation de ce travail. Ses orientations, ses encouragements, sa compréhension, qui nous ont été d'une précieuse aide. Nous tenons à exprimer nos sincères remerciements à Madame Amri Sandra enseignante à l'Université du 08 mai 1945, notre présidente du jury.

Nos vifs remerciements vont également à Madame Benosmane Sana enseignante à l'Université du 08 mai 1945, pour avoir accepté d'examiner ce travail.

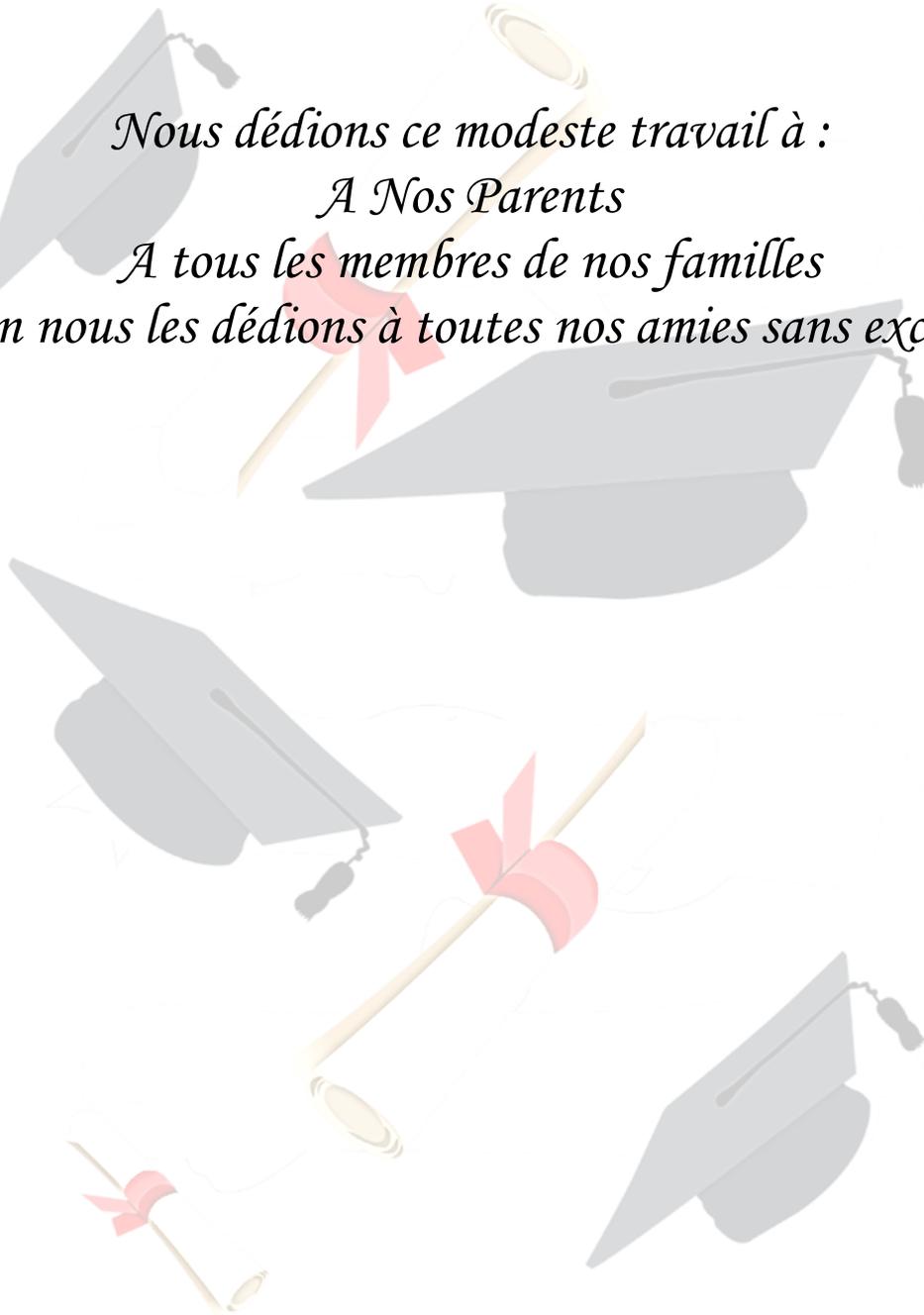
Et en fin nous remercions tous nos enseignants pour leurs bonnes orientations et pour leur aide précieuse tout au long de notre parcours.



Dédicace



Nous dédions ce modeste travail à :
A Nos Parents
A tous les membres de nos familles
En fin nous les dédions à toutes nos amies sans exception



Résumé

Ce travail est une étude bibliographique du stress oxydatif chez les végétaux, résultant des effets de l'environnement. La réaction oxydative se traduit par un déséquilibre entre les systèmes de défense antioxydants et la production de radicaux libres, qui peut être dû à un déficit en antioxydants alimentaires, à une production endogène excessive ou à une exposition à des facteurs pro-oxydants environnementaux. Le cas de cette étude sur des racines de (*vicia faba*) exposée à un stress oxydatif induit par le plomb.

Les résultats montrent que le plomb provoquait une augmentation rapide et dose-dépendante de la production de chimiluminescence. Dans cette étude, des inhibiteurs spécifiques d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) putatives ont été utilisés pour déterminer le mécanisme de génération de ROS induite par le plomb.

Mots clés : Plomb, stress oxydatif, (*vicia faba*), peroxydation lipidique, NADPH oxydase, Espèces Réactives de l'Oxygène, ROS

Abstract

his work is a bibliographical study of oxidative stress in plants, resulting from the effects of the environment. The oxidative reaction results in an imbalance between antioxidant defense systems and free radical production, which may be due to a deficiency in dietary antioxidants, excessive endogenous production, or exposure to environmental pro-oxidant factors. The case of this study on the roots of (*vicia faba*) exposed to oxidative stress induced by lead.

The results show that lead caused a rapid and dose-dependent increase in the production of chemiluminescence. In this study, putative reactive oxygen species (ROS) specific inhibitors were used to determine the mechanism of lead-induced ROS generation.

Keywords: Lead, oxidative stress, (*vicia faba*), lipid peroxidation, NADPH oxidase, Reactive Oxygen Species, ROS

ملخص

هذا العمل عبارة عن دراسة ببليوغرافية للإجهاد التأكسدي في النباتات الناتج عن تأثيرات البيئة. ينتج عن التفاعل التأكسدي خلل بين أنظمة الدفاع المضادة للأكسدة وإنتاج الجذور الحرة، والذي قد يكون بسبب نقص في مضادات الأكسدة الغذائية، أو الإنتاج الداخلي المفرط، أو التعرض للعوامل البيئية المؤيدة للأكسدة. كما هو الحال في هذه الدراسة على جذور (*vicia faba*) المعرضة للإجهاد التأكسدي الناتج عن الرصاص .

أظهرت النتائج أن الرصاص تسبب في زيادة سريعة وتعتمد على الجرعة في إنتاج اللعان الكيميائي. في هذه الدراسة، تم استخدام مثبطات أنواع الأكسجين التفاعلية المفترضة (ROS) لتحديد آلية توليد ROS الناتج عن الرصاص .

الكلمات المفتاحية: الرصاص، الإجهاد التأكسدي، (*vicia faba*)، بيروكسيد الدهون ، NADPH أو أكسيداز ، أنواع الأكسجين

التفاعلية ، ROS

LISTE DES FIGURES

Figure 1: La balance d'équilibre entre les systèmes pro et antioxydants	5
Figure 2: Version simplifiée de la structure électronique de la molécule de dioxygène et de quelques dérivés	6
Figure 3: Schématisation de la transformation énergétique ou chimique (réductions successives) de la molécule de dioxygène dans un système biologique.	7
Figure 4: Réaction d'Haber-Weiss conduisant à la formation du radical hydroxyle M correspond à un métal de transition (essentiellement le cuivre et le fer).....	8
Figure 5: Phases d'initiation, de propagation et de terminaison de la peroxydation lipidique. R• : radical initiateur (ERO) ; LH : acide gras polyinsaturé; L• : radical lipidique ; LOO• : radical peroxyde ; LOOH : hydroperoxyde ; LO• : radical alkoxyde; •OH : r	14
Figure 6: Nature de quelques modifications des chaînes latérales, d'acides aminés des protéines après attaques radicalaires.....	14
Figure 7: Lésions de l'ADN formées par attaque radicalaire du patrimoine génétique des cellules.	15
Figure 8: Chélation des radicaux libres par les flavonoïdes	19
Figure 9 : (<i>vicia faba</i> L).....	22
Figure 10 : Conditions de cultures de (<i>vicia faba</i>).	28
Figure 11 : Influence des traitements Pb sur la peroxydation lipidique chez (<i>vicia faba</i>) évaluée par Dosage FOX2 (barres gris foncé) ou dosage TBARS (barres gris clair) dans les racines (Fig. 2A) et feuilles (figure 2B).....	31
Figure 12 : Effets du Plomb sur les teneurs en chlorophylle a, b, ab et caroténoïdes dans les feuilles de (<i>vicia faba</i>).	35

LISTE DES TABLEAUX

- Tableau 1:** Présentation de quelques espèces réactives de l'oxygène (ERO) et de l'azote (ERA) radicalaires ou non 9
- Tableau 2:** Valeur des potentiels redox et gamme de concentration des principaux couples redox rencontrés dans les cellules végétales 11
- Tableau 3:** Influence des traitements Pb sur les capacités enzymatiques antioxydantes des racines de (*vicia faba*). Les valeurs sont des moyennes de trois expériences individuelles avec des triplicats \pm écart type (S.D.). Des lettres différentes indiquent des valeurs significativement différentes à une durée particulière 33

Liste d'abréviation

ADN : Acide désoxyribonucléique

APX : Ascorbate Peroxydase

Arg : Arginine

ASC : Ascorbate ou Acide L Ascorbique

ATP : Adénosine Tri Phosphate

ATP : Adénosine Tri Phosphatase

CAT : Catalase

CuZnSOD : SOD à cuivre et à zinc

Cys : Cystéine

DHA : Dehydroascorbate

E° : Potentiel Redox

ERA : Espèces Réactives à l'azote

ERO : Espèces Réactives à l'oxygène

Fe : Fer

Fe²⁺ : Fer ferreux

Fe³⁺ : Fer ferrique

Fd : ferredoxine

Fd ox : Ferrédoxine oxydée

Fd red : Ferrédoxine réduite

GPOX : Gaiacol Peroxydase

GR : Glutathion Reductase

GSH : Glutathion réduit

GSSG : Glutathion oxydé

HgCl₂ : chlorure de mercure

H₂O : Eau

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène

His: Histidine

L· : Radical pentadiényl

LO· : Radical alkoxy

LH : acide gras polyinsaturés

LOO· : Radical peroxy

LOOH : Hydroxyperoxyde lipidique

Lys : Lysine

MDA : Malondialdéhyde

Met : Méthionine

NaCl : chlorure de sodium

NADH déshydrogénase : Nicotinamide
Adénine Dinucléotide réduite
déshydrogénase

NAD (P) : Nicotinamide Adénine
Dinucléotide phosphate

NADH (P) : Nicotinamide Adénine
Dinucléotide réduite phosphate

NBT : Nitro Blue Tétrazolium

NO : Oxydenitrique

O₂ : Oxygène

O₂⁻ : Anion radical superoxyde

O₂²⁻ : Ion peroxyde

¹O₂ : oxygène singulet

O₂⁻ : ion oxyde

OH⁻ : anion hydroxyle

OH[•] : radical hydroxyle

Pb : Plomb

POX : Peroxydase

Pro : Proline

ROS : espèces réactives de l'oxygène

-SH : groupement thiol (ou sulfhydryle)

SD : standard deviation

SOD : Superoxyde Dismutase

Thr : Thréonine

Trp : Tryptophane

TRXox : Thiorédoxine oxydée

TRXred : Thioredoxine réduite

UV : Ultra-Violet

Vf : (*vicia faba*)

XO : Xanthine Oxydase

Sommaire

Résumés

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Introduction 1

Chapitre 01 : Etude bibliographique

1. Définition du stress oxydatif 4

2. Origine du stress oxydatif 5

3. Le statut redox cellulaire 5

3.1. Les Espèces Réactives de l'Oxygène 6

3.1.1. ERO ou radicaux libres ? 6

3.1.2. Les différents types d'ERO 7

3.1.2.1. Les ERO primaires 7

3.1.2.2. Les ERO secondaires 9

3.2. Potentiel redox intracellulaire : 11

4. Conséquences du stress oxydatif 12

5. Mécanismes de défense contre le stress oxydatif 15

5.1. Systèmes de défense par des enzymes antioxydants 15

5.1.1. Superoxyde dismutase 16

5.1.2. La catalase 16

5.1.3. Peroxydase (POX) 17

5.1.4. La chlorophylle 17

5.2. Les composés phénoliques et la détoxification des formes activées d'oxygène 18

5.2.1.1. Capture directe de radicaux libres 19

5.2.1.2. Inhibition enzymatique : 19

6. Principaux stress environnementaux auxquels les plantes sont confrontées 20

6.1. Stress biotique 20

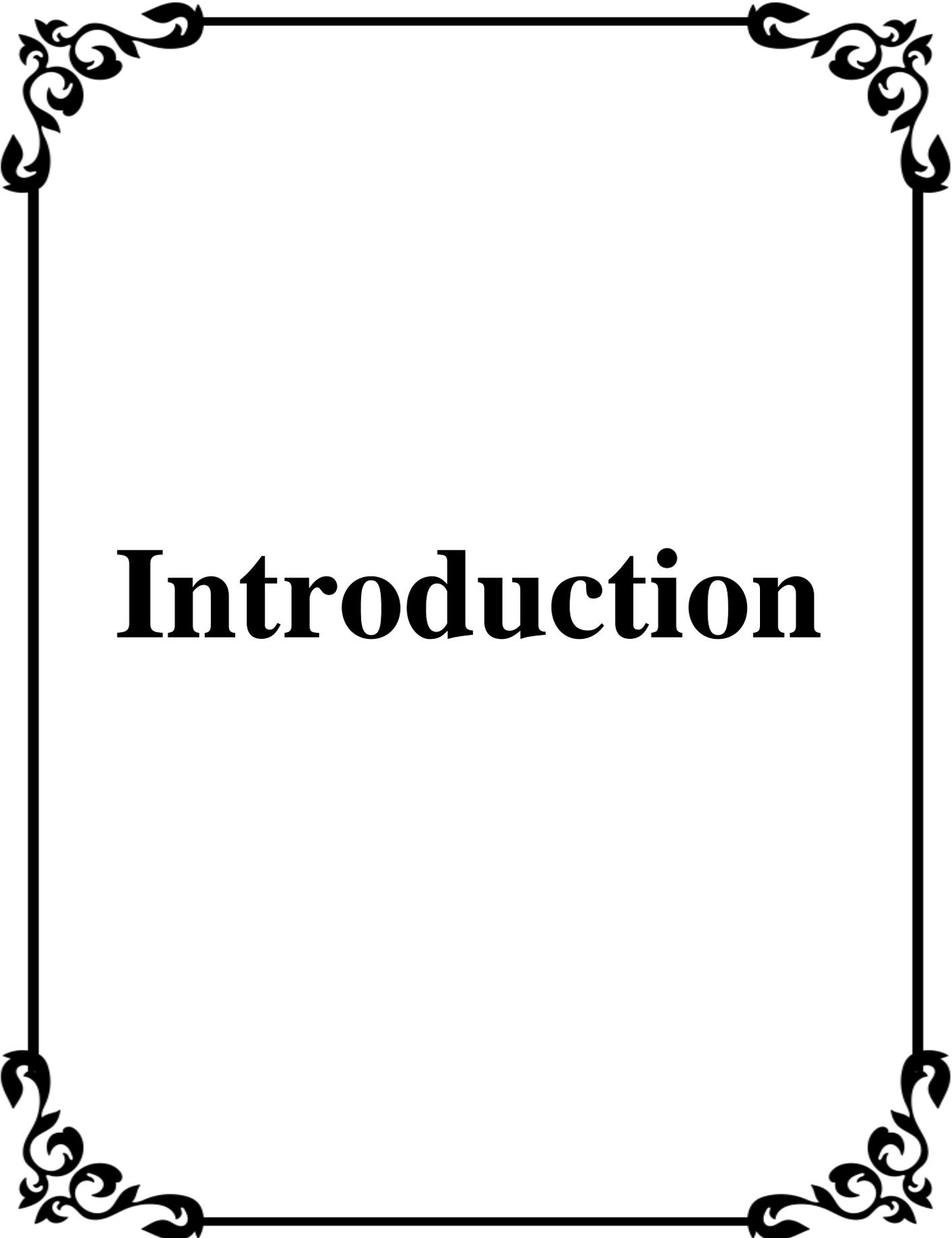
6.2. Stress abiotique : 20

6.2.1 Stress par déficit hydrique.....	20
6.2.2. Stress salin par le chlorure de sodium (NaCl)	21
6.2.3. Stress par le chlorure de mercure(HgCl ₂).....	21
7.Généralités sur la fève	21
7.1. Systématique	21
7.2. Les critères de distinction entre les variétés de (<i>vicia faba</i>)	22
7.3. Description botanique de la fève	23
7.4. Culture de la fève.....	24
7.5. Composition chimique.....	25
8. Méthode de détection de stress végétative chez les végétaux :.....	25
8.1. Spectrophotométrie	25
8.2 .TBARS ou indice TBARS Principe	26

Chapitre 02 : Analyse bibliographique

1. Condition de culture et échantillonnage.....	28
2. Paramètre étudié.....	29
2.1. Evaluation de la peroxydation lipidique.....	29
2.2. Extraction, dosage des protéines et activités enzymatiques.....	29
2.3 Extraction et dosage des pigments foliaires	30
3. Résultats et discussion	30
3.1. Evaluation de la peroxydation lipidique.....	30
3.2. Extraction, dosage des protéines et activités enzymatiques.....	32
3.2.1. Enzymes antioxydantes dans les feuilles.....	32
3.2.2. Enzymes antioxydants dans les racines	33
3.3 Extraction et dosage des pigments foliaires	35
Conclusion	38

Référence Bibliographie



Introduction

Introduction

Le stress oxydatif désigne l'ensemble de la physiologie, du métabolisme ou des troubles provoqués par des organismes (parasites, agents pathogènes) ou des organismes non vivants (salinité, sécheresse, température, pollution, etc.) dans l'organisme (**Marouf et Reynaud, 2007**).

Dans les systèmes biologiques, le stress oxydatif est le résultat d'un déséquilibre entre la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et sa destruction par le système de défense antioxydant (**Bonnefont et al., 2003**).

Le stress oxydatif est à l'origine de plusieurs stress abiotiques (sel, métaux lourds, stress hydrique...), les cellules végétales mettent donc en œuvre plusieurs systèmes de détoxification, comme les métabolites secondaires, qui jouent un rôle vital dans l'effet de détoxification réactive.

La détoxification des ERO constitue un élément clé de défense des plantes contre les stress abiotiques. Les enzymes responsables de cette détoxification nommées antioxydants incluent le superoxydedismutase (SOD), la catalase (CAT), et des enzymes du cycle ascorbate-glutathion (**Hernandez et al., 2001**).

Comme chez le règne animal, les plantes possèdent également de nombreux composés et enzymes capables d'empêcher la production des ERO ou de la contrôler.

Parmi ces composés la présence de plomb dans les plantes induit la production d'Espèces Réactives de l'Oxygène (ERO) perturbant le statut redox des cellules, ce qui occasionne un stress oxydatif (**Seregin et Ivanov.2001; Sharma et Dubey.2005**).

La fève (*vicia faba*), une plante de plus en plus utilisée en écotoxicologie et qui s'est avérée sensible à de faibles concentrations en plomb (**Loudes, 2002; Pourrut, 2003**), particulièrement les (*vicia faba*) ont des effets protecteurs importants grâce à leur teneur élevée en antioxydants (**Vangdal et Slimestad, 2006**).

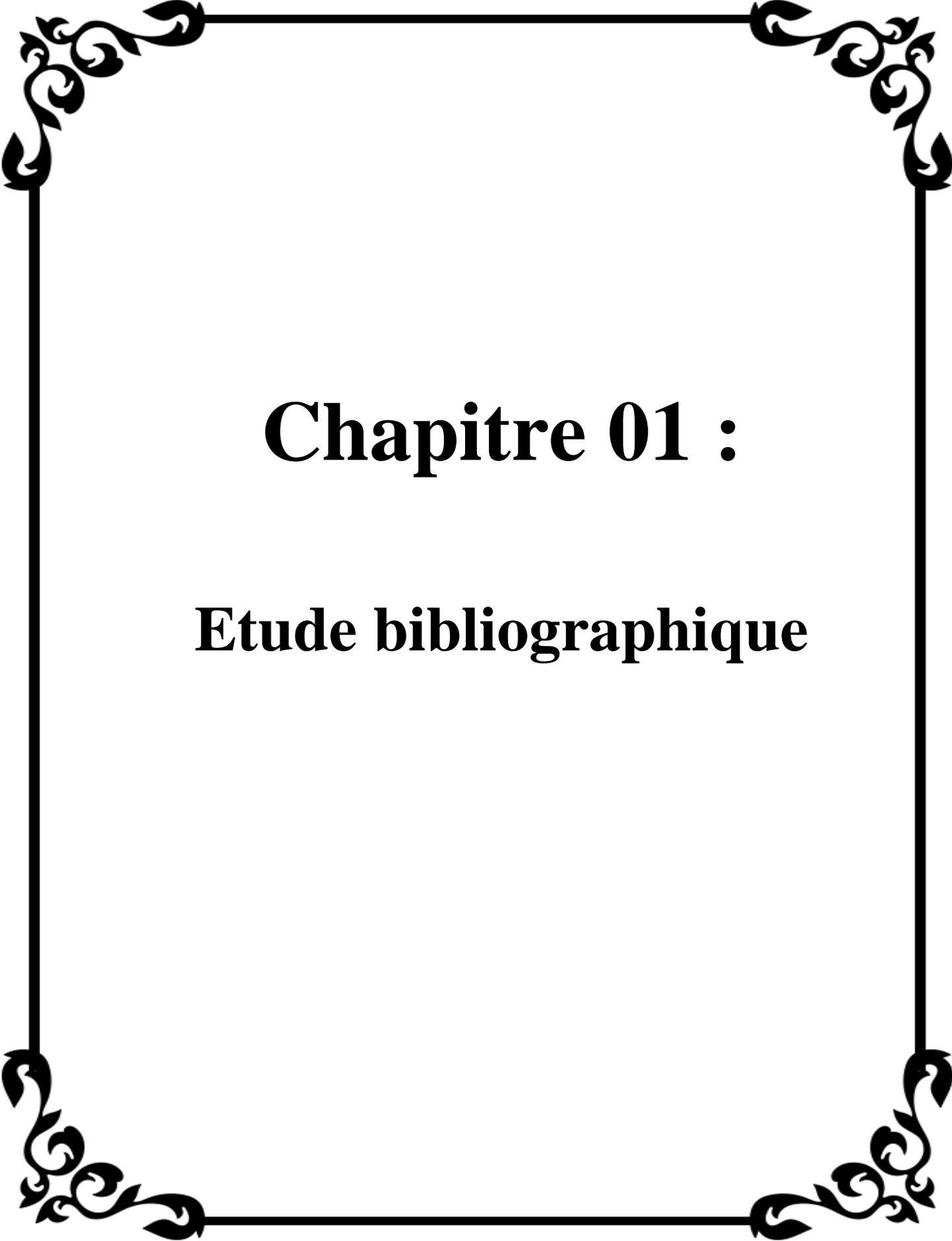
Ce travail est une étude bibliographique dont l'objectif est de voir l'effet du stress oxydatif chez les végétaux induit par un les effets de l'environnement, notre choix a été sur un travail préalablement réalisé sur les effets de l'exposition des racines de (*Vicia faba*) a au Plomb .

Nous avons divisé ce travail en deux chapitres :

Nous proposons dans le premier chapitre après l'introduction une revue bibliographique dans le sens de la compréhension de stress oxydatif et leurs effets et des mécanismes. Nous avons également présenté de façon générale la plante (*vicia faba*) (systématique, description botanique, composition chimique ect).

Dans le deuxième chapitre une analyse bibliographique, ou on expose quelques techniques pour étudier le stress oxydatif, et une petite analyse d'un travail fait sur cet axe et les résultats obtenus.

Et enfin une conclusion



Chapitre 01 :

Etude bibliographique

1. Définition du stress oxydatif

Le stress oxydatif est une condition anormale. Lorsque la génération de radicaux libres oxygénés endogènes ou exogènes dépasse sa capacité antioxydante, il traverse parfois nos cellules ou l'un de nos tissus. Les radicaux libres oxygénés sont des espèces hautement toxiques. Ce dernier est l'incapacité à neutraliser la défense système qui cause de grands dommages aux macromolécules essentielles de nos cellules, entraînant une expression anormale des gènes et des récepteurs membranaires, la prolifération et la diffusion cellulaires, la mort cellulaire, les troubles immunitaires, la mutagenèse et le dépôt de protéines dans les tissus (**Favier, 2006**) ; à cette fin, afin de se protéger des effets toxiques de l'oxygène, les organismes ont développé un système de défense capable de réguler la production de ROS (espèces réactives de l'oxygène). Ces systèmes sont composés d'antioxydants, d'oligo-éléments et de protéines (**Pincemail *et al.*, 2003**).

2. Origine du stress oxydatif

Il existe de nombreuses sources de stress oxydatif, telles que la surproduction de pro-oxydants inflammatoires endogènes, les carences nutritionnelles en antioxydants ou encore l'exposition environnementale à des facteurs pro-oxydants (tabac, alcool, drogues, rayons ultraviolets, pesticides, ozone, etc.), l'amiante, métaux toxiques) (Magder, 2006) voir Figure 1.

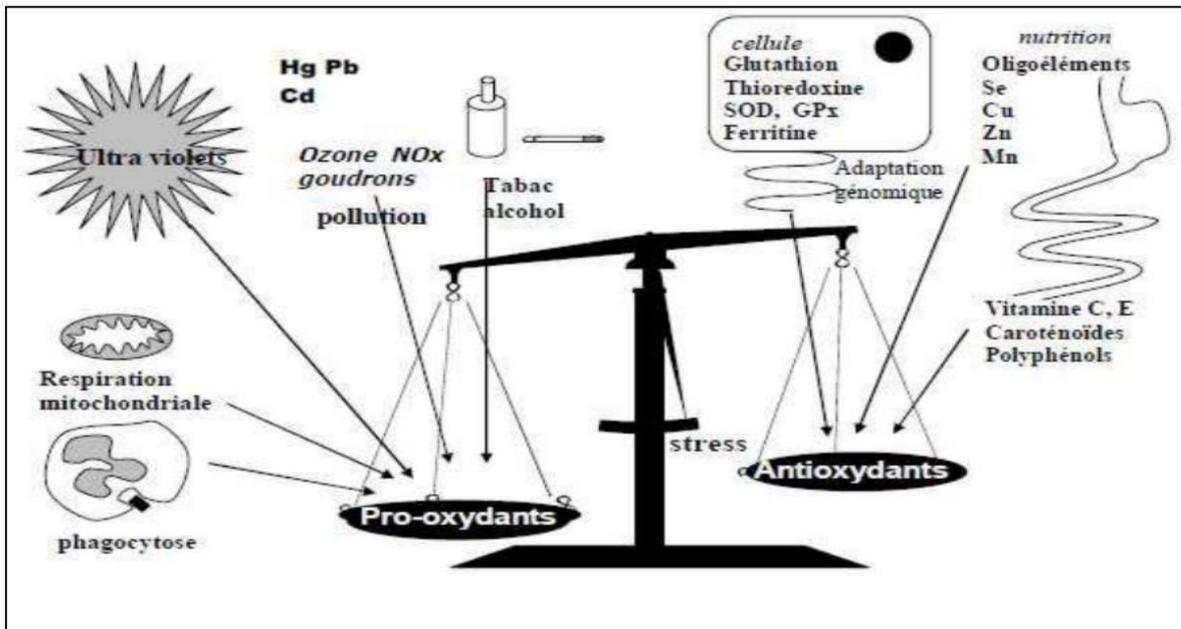


Figure 1: La balance d'équilibre entre les systèmes pro et antioxydants (Favier, 2006).

3. Le statut redox cellulaire

Commençant il y a 1,8 milliard d'années, l'augmentation progressive de la teneur en oxygène de l'atmosphère terrestre a permis le développement du métabolisme aérobie. L'émergence de ce métabolisme aérobie est une adaptation aux nouvelles contraintes environnementales. Par rapport au métabolisme anaérobie, il présente également des avantages importants car il peut augmenter considérablement la quantité d'énergie (ATP) produite. Le développement actif de l'efficacité des mécanismes de production d'énergie a favorisé le développement d'organismes multicellulaires complexes. Cependant, le peroxyde d'hydrogène n'est pas un gaz neutre et sa réactivité conduira à la formation d'oxygène actif, qui réagira avec les composés biologiques et causera un certain degré de dommages (Pourrut, 2008).

3.1. Les Espèces Réactives de l'Oxygène

3.1.1. ERO ou radicaux libres ?

Les ERO sont souvent associées aux radicaux libres. Le terme de radical libre renvoie à n'importe quelle espèce capable d'une existence indépendante (d'où le terme de libre) contenant un ou plusieurs électrons non appariés (**Halliwell, 2006**). Un électron non apparié est un électron qui occupe seul, une orbitale atomique ou moléculaire. L'exemple le plus simple de radical libre est l'hydrogène qui possède un seul électron non apparié sur sa couche orbitale externe. Ainsi, si les radicaux libres ne sont pas forcément associés à des espèces dérivant de l'oxygène, la notion de réactivité n'est pas forcément relative aux radicaux. Les ERO désignent à la fois des espèces radicalaires de l'oxygène (O_2 , $O_2^{\cdot-}$) et des espèces non radicalaires (O_2^{2-} , 1O_2) voir **Figure 2**. Ainsi, tous les radicaux oxygénés sont des ERO, mais tous les ERO ne sont pas des radicaux.

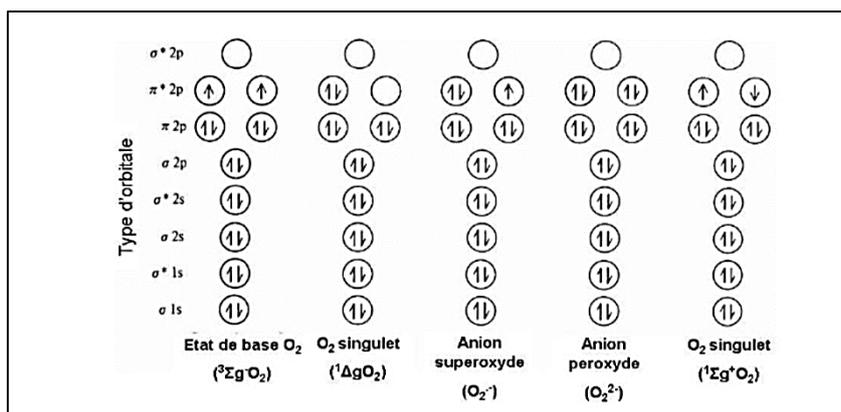


Figure 2: Version simplifiée de la structure électronique de la molécule de dioxygène et de quelques dérivés (d'après **Helliwell, 2006**)

La forme stable de dioxygène que nous connaissons, dite triplet, est un biradical libre possédant deux électrons non appariés avec des spins parallèles. Sous cette forme, le dioxygène est un puissant agent oxydant. Cependant, en vertu des règles de restriction de spin de Wigner, et du fait de sa structure électronique, l'oxygène fondamental possède une forte inertie vis-à-vis des molécules biologiques, pour la plupart non radicalaires. Sa réactivité est limitée aux molécules capables d'apporter un ou deux électrons non appariés, et dont le spin est antiparallèle aux siens (**Halliwell, 2006**).

La réactivité des espèces chimiques qui dérivent de ce dioxygène est, elle aussi, relative. En effet, l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) sont très

sélectifs dans leurs réactions avec les molécules biologiques et ne vont, par exemple, interagir qu'avec quelques enzymes. Au contraire, le radical hydroxyle ($\cdot\text{OH}$) réagit avec toutes les molécules présentes à proximité (Halliwell, 2006).

3.1.2. Les différents types d'ERO

3.1.2.1. Les ERO primaires

Différents types d'ERO, plus réactifs que l' O_2 , peuvent être formés dans les organismes vivants. Certaines, directement dérivées de la molécule de dioxygène, sont appelées ERO primaires. Dans un premier temps, un apport énergétique réorganise les électrons de la molécule de dioxygène pour former une des deux formes du dioxygène singulet (Foote *et al.*, 1985) voir Figure 2. Cependant, l'état singulet $^1\Sigma\text{g}^+\text{O}_2$ est très instable et se transforme rapidement en $^1\Delta\text{gO}_2$ voir Figure 3. Cette dernière forme singulet qui peut se retrouver dans les tissus biologiques, est plus communément écrite sous la forme $^1\text{O}_2$. Le passage à la forme singulet enlève la contrainte de restriction de spin, et $^1\text{O}_2$ peut réagir directement avec les composants cellulaires. La réactivité du dioxygène singulet étant très importante, sa concentration cellulaire peut être considérée comme négligeable (Foyer et Noctor, 2005).

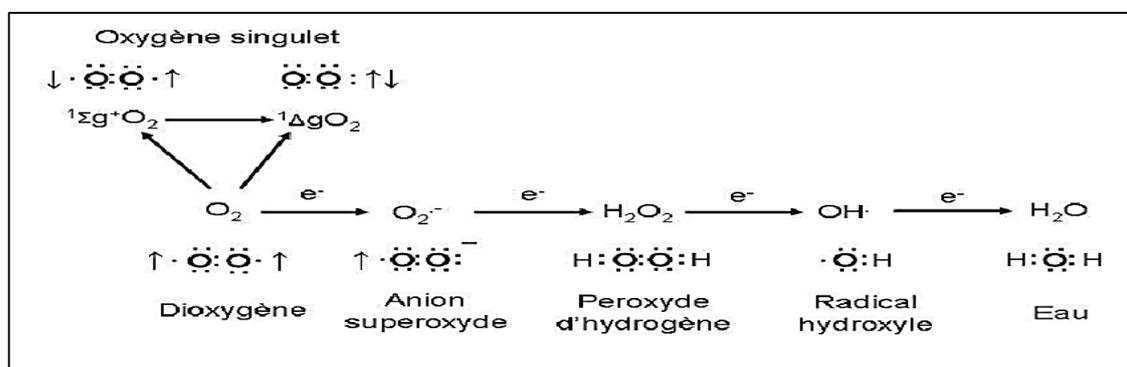


Figure 3: Schématisation de la transformation énergétique ou chimique (réductions successives) de la molécule de dioxygène dans un système biologique. (Pourrut,2008).

Au cours de divers processus physiologiques, un électron peut également être transféré au dioxygène, ce qui conduit à la formation de l'anion radical superoxyde $\text{O}_2^{\cdot-}$ (Figure 2 et Figure 3). Le potentiel redox du couple $\text{O}_2^{\cdot-} / \text{H}_2\text{O}_2$ est de +0,94V (Foyer et Noctor, 2005). Sa réactivité est limitée et spécifique à certaines molécules biologiques comme les ènes et diènes, certains acides aminés comme le tryptophane, l'histidine ou la méthionine ou les lipides, avec qui il peut former des hydroperoxydes (Van Breusegem *et*

al., 2001). L'anion superoxyde possède une demi-vie courte, d'environ 2 à 4 μ s, et ne peut pas réellement diffuser dans la cellule (Van Breusegem *et al.*, 2001). Sa concentration cellulaire est inférieure à 1 nM (Foyer et Noctor, 2005).

L'addition d'un nouvel électron au radical superoxyde permet de former l'ion peroxyde (O_2^{2-}) avec un affaiblissement de la liaison O-O. Dans les systèmes biologiques, les réactions ne s'enchaînent pas de la même manière, et la réduction de l' O_2 par deux électrons ou la réduction d' $O_2^{\cdot-}$ conduit à la formation d' H_2O_2 plutôt que d' O_2^{2-} (Figure 3). Le potentiel redox du couple H_2O_2/OH est de + 0,54 V (Foyer et Noctor, 2005). La réactivité du peroxyde d'hydrogène est faible et due essentiellement à sa capacité à oxyder les groupements thiols (-SH). Cette molécule relativement stable possède une durée de vie d'environ 1 ms, permettant une diffusion sur une certaine distance à partir du site de production (Van Breusegem *et al.*, 2001). La concentration moyenne intracellulaire en H_2O_2 est de l'ordre de 0,5 μ M (Mittler, 2002) mais peut varier de 0,1 à 100 μ M (Foyer et Noctor, 2005).

L'addition de deux nouveaux électrons élimine la liaison O-O et conduit à la formation de deux ions oxydes (O^{2-}). De la même manière, dans les systèmes biologiques, la réduction de l' O_2 par quatre électrons ou celle de l' H_2O_2 par deux électrons conduit à la formation d'eau (Figure 3).

Compte-tenu de leurs relatives faibles réactivités, la toxicité de l'anion superoxyde et du peroxyde d'hydrogène est essentiellement due à leur capacité à générer une autre ERO, le radical hydroxyle (Figure 3). Toutefois, cette génération est catalysée par la présence de métaux de transition comme le cuivre ou le fer. Dans un premier temps, $O_2^{\cdot-}$ réduit un ion métallique qui va, par la suite, pouvoir être oxydé par H_2O_2 , via la réaction de Fenton (Figure 4). La somme de ces deux réactions, appelée réaction d'Haber-Weiss, aboutit à la formation d' $\cdot OH$.

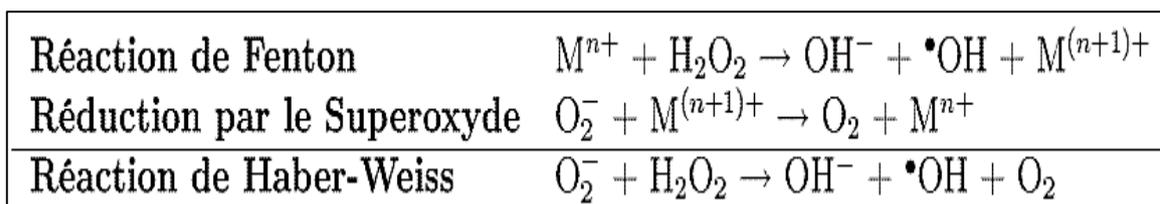


Figure 4: Réaction d'Haber-Weiss conduisant à la formation du radical hydroxyle M correspond à un métal de transition (essentiellement le cuivre et le fer). (Pourrut,2008).

Si les auteurs ne s'accordent pas sur le temps de demi-vie de ce radical hydro ($<1 \mu\text{s}$ à $<1 \text{ ns}$), tous s'entendent sur son extrême réactivité et son très fort pouvoir oxydant ($E.OH/H_2O = + 2,20\text{V}$). Il interagit fortement et très rapidement avec toutes les molécules biologiques. Ainsi, sa concentration cellulaire est considérée comme négligeable (**Foyer et Noctor, 2005**).

3.1.2.2. Les ERO secondaires

Les ERO secondaires correspondent aux ERO formées par réactions entre les ERO primaires et les composés biochimiques de la cellule. **Le Tableau 1** présente quelques ERO secondaires. Contrairement aux ERO primaires, produites de façon régulière et en quantité importante par les cellules végétales, les ERO secondaires sont seulement formées dans des conditions particulières. Mis à part certains peroxydes organiques, très peu d'études se sont intéressées à ces ERO, et leur importance biologique est discutable (**Halliwell, 2006**).

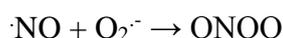
Les Espèces Réactives de l'Azote (ERA) sont également présentées dans le **Tableau 1**. Ces espèces particulières, possédant à la fois des capacités oxydantes et nitrifiantes, devraient plutôt être dénommées Espèces Réactives de l'Oxygène et de l'Azote (**Halliwell, 2006**).

Tableau 1: Présentation de quelques espèces réactives de l'oxygène (ERO) et de l'azote (ERA) radicalaires ou non (**adapté d'après Halliwell, 2006**)

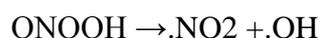
Espèces radicalaires	Espèces non radicalaires
ERO :	ERO :
Carbonate, $\text{CO}_3^{\cdot-}$	Acide hypobromeux, HOBr
Peroxyl, RO_2^{\cdot}	Acide hypochloreux, HOCl
Alkoxy, RO^{\cdot}	Peroxydes organiques, ROOH
Radical dioxyde de carbone, $\text{CO}_2^{\cdot-}$	Peroxynitrite, ONOO^-
	Peroxynitrate, O_2NOO^-
	Acide peroxyde nitreux, ONOOH
	Peroxomonocarbonate, HCOOCO_2^-
ERA :	ERA :
Oxyde nitrique, NO	Acide nitrique, HNO_2
Dioxyde nitrique, NO^2	Cation et anion nitrosyle, NO^+ et NO^-

Radical nitrate, .NO ₃	Tétraoxyde et trioxyde d'azote, N ₂ O ₄ et N ₂ O ₃
	Peroxynitrite, ONOO ⁻
	Peroxynitrate, O ₂ NOO ⁻
	Acide peroxynitreux, ONOOH
	Cation nitronium, NO ₂ ⁺
	Chlorure de nitrile, NO ₂ Cl

Ces dix dernières années, le rôle physiologique de l'oxyde nitrique (NO) a été particulièrement étudié chez les plantes (**Crawford et Guo, 2005 ; Delledonne, 2005; Shapiro et Gerald, 2005; Yamasaki et Cohen, 2006; Arasimowicz et Floryszak-Wieczorek, 2007**). Il apparaît que le NO joue un rôle essentiel en tant que molécule de signalisation. L'oxyde nitrique peut également interagir avec O₂⁻ pour former du peroxynitrite (**Beckman et Koppenol, 1996**) :



A un pH physiologique, le peroxynitrite se protone rapidement pour former de l'acide peroxynitreux. Ce puissant agent nitrifiant et oxydant peut altérer directement de nombreuses molécules biologiques. Il peut également générer des dommages indirects en subissant une fission homolytique produisant deux puissants agents oxydants, le dioxyde nitrique et le radical hydroxyle (**Beckman et Koppenol, 1996**) :



Ainsi, les voies de production d'ERO et d'ERA primaires sont fortement interconnectées. C'est pour cette raison qu'une partie des ERA est considérée comme des ERO par certains auteurs (**Tableau 1**). Néanmoins, la quantité d'OH provenant de cette voie, ainsi que la quantité d'ERA produite, est faible dans les tissus végétaux. En effet, la quantité de NO générée est de l'ordre de quelques nmol.g⁻¹.h⁻¹ (**Vanin et al., 2004**), alors que la quantité d'O₂⁻ produite est de l'ordre de plusieurs centaines de μM.s⁻¹ (**Mittler, 2002**) ; la teneur moyenne des cellules végétales en H₂O₂ est de l'ordre de plusieurs micromolaires (**Foyer et Noctor, 2005**). Pour cette raison, la suite de cette revue bibliographique sera uniquement consacrée aux ERO primaires.

3.2. Potentiel redox intracellulaire :

Les organismes aérobies les plus évolués ont dû développer des systèmes de conduction des nutriments mais également de l'oxygène, pour s'assurer de sa distribution dans l'ensemble de l'organisme (systèmes vasculaires). Posséder de tels systèmes de distribution est un avantage, car ils permettent de réguler les flux de dioxygène parvenant aux cellules. Cependant, les systèmes de régulation n'empêchent pas la production d'ERO au niveau cellulaire. La quantité d' H_2O_2 produite est assez importante, conduisant à une concentration moyenne de l'ordre du micromolaire. Cette concentration non négligeable de molécules oxydantes a conduit à des adaptations au niveau cellulaire. Toutes les cellules d'organismes aérobies contiennent des concentrations importantes de molécules possédant un fort pouvoir réducteur, comme les couples GSH/GSSG (glutathion réduit/glutathion oxydé), NAD(P)/NAD(P)H (nicotinamide adénine dinucléotide (phosphate) oxydé/réduit), TRX_{ox}/TRX_{red} (thiorédoxine oxydée/réduite) et Fd_{ox}/Fd_{red} (ferrédoxine oxydée/réduite) (**Tableau 2**). Contrairement aux cellules animales, les cellules végétales, et en particulier les cellules chlorophylliennes, contiennent de très grandes quantités d'ascorbate (Déhydroascorbate/Ascorbate) (**Foyer et Noctor, 2005**).

Tableau 2: Valeur des potentiels redox et gamme de concentration des principaux couples redox rencontrés dans les cellules végétales (**adapté d'après Foyer et Noctor, 2005**).

Couple redox (μ M)	Potentiel redox (V)	Gamme de concentration cellulaire
DHA/ASC	- 0,10	10000-20000
GSSG/GSH	- 0,24	2000-5000
NAD(P)/NAD(P)H	- 0,32	200-500
TRX _{ox} /TRX _{red}	- 0,33	10-100
Fd _{ox} /Fd _{red}	- 0,42	10-100

Le potentiel redox intracellulaire, ou statut redox, est la résultante de l'état redox des couples oxydo-réducteurs présents dans la cellule. Cette notion peut s'apparenter à la notion de pH cellulaire associée aux couples acido-basiques. En pratique, les conditions redox régnant dans la cellule sont évaluées par le rapport des concentrations des formes oxydées et réduites des couples redox prépondérants, comme ceux du glutathion et de l'ascorbate (**Noctor, 2006**). Du fait de leurs fortes concentrations cellulaires, les deux couples

GSSG/GSH et DHA/ASC agissent comme des tampons redox, à l'instar des tampons acido-basiques.

Il existe une très forte interconnexion entre les ERO et les molécules réductrices. Par exemple, le GSH et l'ascorbate sont capables de réduire directement l'anion superoxyde et le peroxyde d'hydrogène. Ils servent également de co-substrats aux enzymes antioxydantes détoxiquant les ERO. Ainsi, de par leur potentiel oxydant et via leurs interactions avec les couples redox majoritaires, les ERO contribuent à l'établissement potentiel redox intracellulaire. Il résulte, de ces diverses interactions, une homéostasie redox cellulaire. Le potentiel redox cellulaire détermine les proportions relatives des espèces oxydées ou réduites de chaque couple redox. Ces proportions dépendent des potentiels redox (E°) de ces couples. Cette fonction du potentiel redox cellulaire est particulièrement importante, car l'activité de nombreuses protéines, et en particulier de nombreux facteurs de transcription, est régulée par leur état redox (**Foyer et Noctor, 2005 ; Noctor, 2006**). Ainsi, dans des conditions normales, le cytoplasme cellulaire est un milieu très réducteur, ce qui a pour conséquence de maintenir la grande majorité des groupements thiols à l'état réduit (**Foyer et Noctor, 2005**).

4. Conséquences du stress oxydatif

Le stress oxydatif entraîne une quantité excédentaire d'oxygène (ERO) qui conduit à des dommages oxydatifs à l'ADN, protéines, lipides. (**Tomomi *et al.*, 2017**).

L'oxydation des lipides polyinsaturés, en présence d'oxygène, est un processus radicalaire de réactions en chaîne, connue sous le nom de peroxydation lipidique, qui se décompose en trois étapes : l'initiation, la propagation et la terminaison

La phase d'initiation est due à l'attaque d'une espèce radicalaire (radicaux hydroxyles, alcoxyles, peroxydes, l'oxygène singulet ou le peroxydinitrite) suffisamment réactive pour arracher un hydrogène du groupement méthylène bis-allylique situé en α d'une double liaison (hydrogène le plus labile) d'un acide gras polyinsaturé (LH) pour former un radical pentadiényle (radical centré sur l'atome de carbone L•). Ce radical se stabilise par réarrangement intramoléculaire en formant un diène conjugué capable de réagir facilement avec l'oxygène pour donner un radical peroxyde, LOO•. Ce dernier peut à son tour arracher un hydrogène d'une autre molécule d'acide gras adjacente (L'H), créant ainsi une réaction en chaîne (propagation) ; la combinaison du radical peroxyde avec l'atome d'hydrogène

conduit à la formation d'un hydroperoxyde lipidique (LOOH) qui, sous l'action des métaux (Fe^{2+} ou Cu^+), forment des radicaux alkoxy ($\text{LO}\cdot$) et hydroxyles ($\text{HO}\cdot$). Les radicaux peroxydes peuvent aussi conduire à des peroxydes cycliques. Enfin, des phases terminales de dégradation conduiront à des aldéhydes, parmi lesquels on peut citer le dialdéhyde malonique (ou malondialdéhyde ou MDA) (phase de terminaison) (**Figure 5**) (**Michel *et al.*, 2008**).

La peroxydation lipidique peut créer des altérations de la membrane telles que la modification de sa fluidité, mais aussi l'inactivation de récepteurs ou d'enzymes. Les produits de peroxydation lipidique, en particulier les produits terminaux stables, tels que des aldéhydes α , β -insaturés (malondialdéhyde ou MDA) peuvent être mesurés dans le plasma et les urines en tant que marqueurs du stress oxydant (**Dalle-Donne *et al.*, 2006**).

L'oxydation des protéines est définie comme une modification covalente d'une protéine induite par des REO ou des sous-produits du stress oxydatif. La plupart des types d'oxydes protéiques sont essentiellement irréversibles, alors que quelques-uns impliquant des acides aminés soufrés sont réversibles. La carbonylation des protéines est largement utilisée comme marqueur de l'oxydation des protéines (**Møller *et al.*, 2007**).

L'oxydation d'un certain nombre d'acides aminés protéiques, en particulier Arg, His, Lys, Pro, Thr et Trp, donne des groupes carbonyle libres qui peuvent inhiber ou modifier leurs activités et accroître leur sensibilité à l'attaque protéolytique. La carbonylation des protéines peut se produire en raison de l'oxydation directe des chaînes latérales d'acides aminés (par exemple, la proline et l'arginine) (**Shringarpure *et al.*, 2002**). Quel que soit l'emplacement de la synthèse et de l'action ERO, les ERO sont susceptibles de cibler les protéines composées par des acides aminés contenant du soufre et des groupes thiol. Cys et Met sont assez réactifs surtout avec $^1\text{O}_2$ et $\text{OH}\cdot$ (**Gill *et al.*, 2010**).

Les dommages oxydatifs de l'acide désoxyribonucléique (ADN) peuvent être causés par les dommages des ERO (**Jean, 2012**). L'ADN est une cible privilégiée pour les ERO. La guanine, par exemple, peut réagir avec $\text{OH}\cdot$ Pour former la 8-hydroxy-2'-déoxyguanosine (8-OH-dG) qui, au lieu de s'apparier avec la cytosine, s'associera avec l'adénine, entraînant des mutations au sein de l'ADN et conduisant à des altérations du message génétique impliquées dans le déclenchement du cancer et le vieillissement (**Haleng *et al.*, 2007**), voir **Figure 6**.

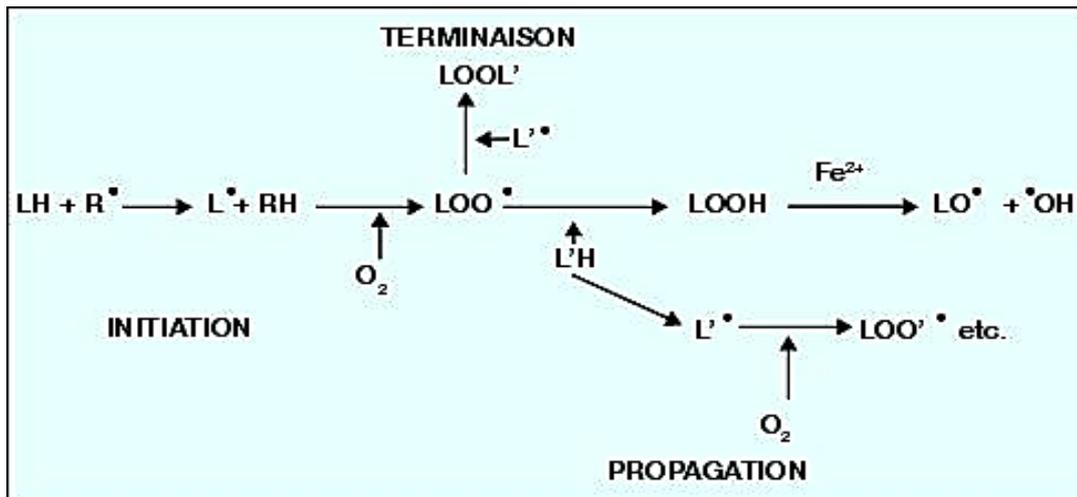


Figure 5: Phases d'initiation, de propagation et de terminaison de la peroxydation lipidique. R^\bullet : radical initiateur (ERO) ; LH : acide gras polyinsaturé ; L^\bullet : radical lipidique ; LOO^\bullet : radical peroxyde ; LOOH : hydroperoxyde ; LO^\bullet : radical alkoxyde ; $\bullet OH$: r (Michel *et al.*, 2008).

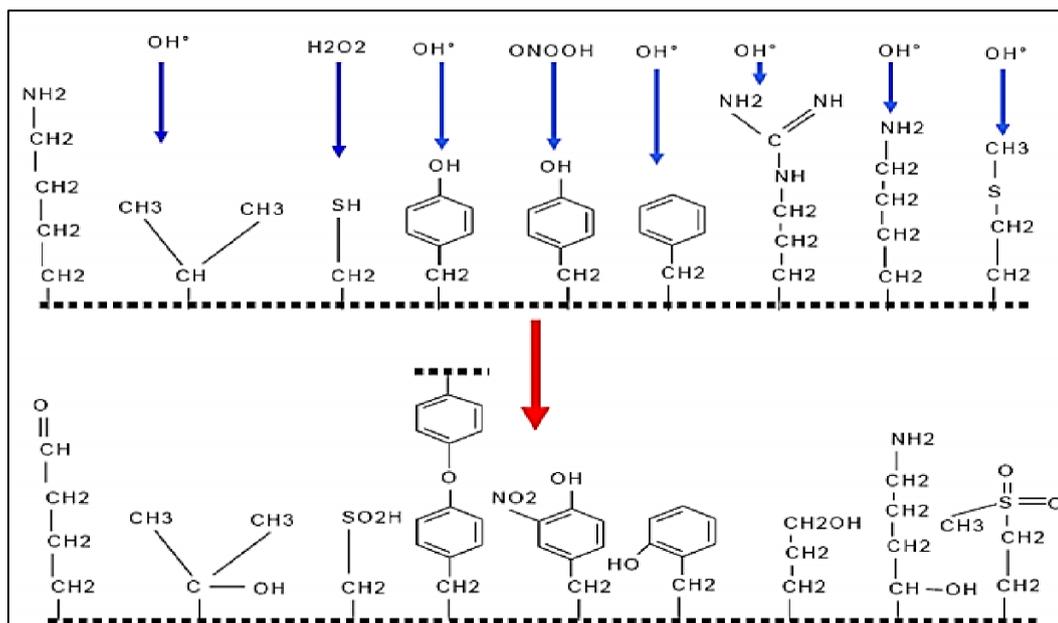


Figure 6: Nature de quelques modifications des chaines latérales, d'acides aminés des protéines après attaques radicalaires (favier, 2003).

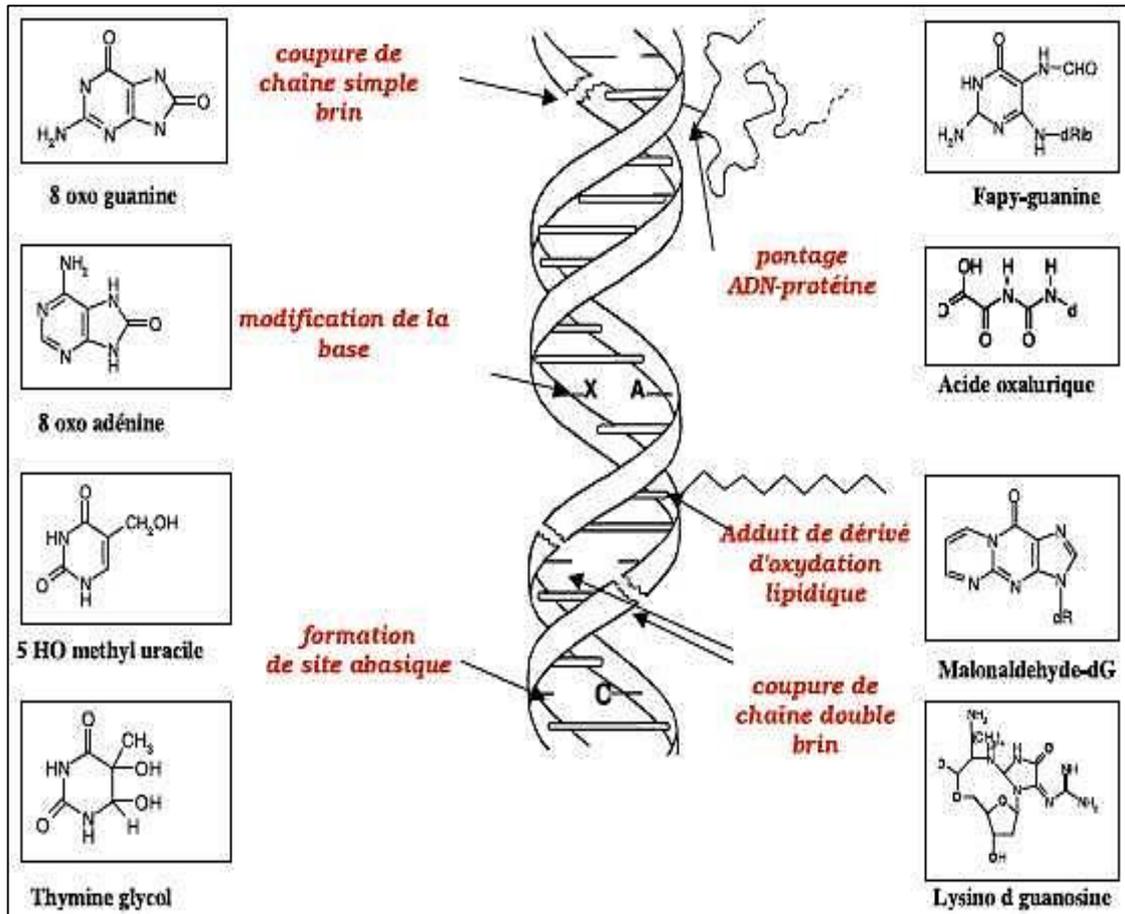


Figure 7: Lésions de l'ADN formées par attaque radicalaire du patrimoine génétique des cellules. (Favier, 2003).

5. Mécanismes de défense contre le stress oxydatif

Pour contourner les dommages causés par les ROS, la cellule fait appel à des systèmes de défense appelés antioxydants. Un antioxydant est défini comme toute substance ayant la capacité de retarder, prévenir ou réparer un dommage oxydatif d'une molécule cible (Halliwell et al., 2007). Ainsi, les antioxydants servent à contrôler le niveau des espèces réactives pour minimiser le dommage oxydatif (Tang et al., 2010).

5.1. Systèmes de défense par des enzymes antioxydants

Les enzymes antioxydantes ont une action complémentaire sur la cascade radicalaire au niveau du superoxyde et du peroxyde d'hydrogène, conduisant finalement à la formation d'eau et d'oxygène moléculaire.

5.1.1. Superoxyde dismutase

Les superoxydes dismutases (SODs) sont une classe d'enzymes apparentées qui catalysent la dégradation de l'anion superoxyde en O_2 et H_2O_2 . Les cellules humaines possèdent une enzyme SOD mitochondriale ayant le manganèse dans son site actif (MnSOD) ainsi qu'une enzyme SOD cytosolique et une SOD extracellulaire ayant le cuivre et le zinc (Cu-ZnSOD) comme coenzymes (Favier, 2003). Due à sa relative stabilité, le H_2O_2 produit par les SODs est régulé enzymatiquement par les catalases et les peroxydases. Les catalases sont des enzymes localisées dans les peroxysomes et catalysent la conversion du H_2O_2 en H_2O et O_2 .

Tandis que les glutathion peroxydases éliminent le H_2O_2 par son utilisation dans l'oxydation du glutathion réduit (GSH) en glutathion oxydé (GSSG) et requièrent le sélénium dans leur site actif pour cette activité. (Aruoma *et al.*, 1999).

5.1.2. La catalase

La catalase est une enzyme commune dans presque tous les organismes vivants. Exposé à l'oxygène (Switala *et al.*, 2002). Elle joue un rôle très important dans la protection de la cellule contre les dommages oxydatifs par des ROS et possède l'un des nombres les plus élevés de turnover de toutes les enzymes ; une molécule de catalase peut convertir des millions de molécules de peroxyde d'hydrogène en eau et oxygène chaque seconde. L'enzyme est un tétramère contenant quatre groupes de porphyrine hème (fer) qui lui permettent de réagir avec le peroxyde d'hydrogène. Son pH optimal varie entre 6.8 et 7.5 et sa température de 45 ° (Aebi *et al.*, 1984.) (Gaetani *et al.*, 1996) Le rôle cellulaire de la catalase est de convertir rapidement le peroxyde d'hydrogène, un sous-produit nocif de nombreux processus métaboliques, en d'autres substances moins dangereuses afin d'éviter d'endommager les cellules et les tissus (Gaetani, 1996). Une carence en catalase peut augmenter la probabilité de développer un diabète de type 2 (László *et al.*, 2001) La catalase se trouve généralement dans les peroxysomes, soit, les cellules végétales impliquées dans la photorespiration (l'utilisation de l'oxygène et la production de dioxyde de carbone) et la fixation symbiotique de l'azote (Alberts, 2002). Elle est appliquée dans la production du fromage et d'autres applications.

5.1.3. Peroxydase (POX)

La superfamille dite des « peroxydases de plantes, champignons et bactéries» (Welinder, 1992). Est composée de protéines présentant toutes une structure similaire tridimensionnelle (Edwards,1993) (Smulevich,2006). Elles réduisent l'eau oxygénée en eau, mais oxydent des substrats très divers. La superfamille est séparée en trois classes qui diffèrent principalement par leur séquence peptidique primaire. Les peroxydases sont des glycoprotéines contenant de la ferriprotoporphyrine IX comme groupe Prosthétique et du calcium ; elles sont majoritairement présentes dans les parois (Blee,2001) (Takabe ,2001) et jouent de grands rôles dans la croissance, le développement et le système de défense des plantes. Les peroxydases de la classe III, présentes chez les plantes, sont capables d'agir à partir de l'oxygène seul pour oxyder l'auxine (Gazaryan,1996) (Savitsky,1999). Selon la réaction suivante :



Les peroxydases exercent des fonctions diversifiées dans les plantes. Elles utilisent l'eau oxygénée comme accepteur d'électrons provenant de diverses molécules, tels les précurseurs de la lignine ou des phénole (flavonoïdes ou autres). En plus, elles peuvent catalyser l'oxydation de quelques molécules en présence d'oxygène. C'est le cas de l'auxine (acide 3-indolylacétique), une des hormones contrôlant la croissance et les systèmes de défense des plantes (Tognolli,2002). Elle a plusieurs applications comme la dégradation de certains colorants des rejets industriels.

5.1.4. La chlorophylle

Le principal récepteur (photorécepteur) des chloroplastes des plantes vertes est la chlorophylle a qui est un tétra pyrole substitué. Les quatre atomes d'azote des pyrole sont liés par coordinance à l'atome de magnésium. Ainsi la chlorophylle est une porphyrine à magnésium, tandis que l'hème est une porphyrine à fer. (Bouzaida et Debbakh , 2006).

La chlorophylle b diffère de la chlorophylle a par un groupe aldéhyde à la place d'un groupe méthyle sur l'un de ses pyroles. (Bouzaida et Debbakh ,2006) Les chlorophylles sont des récepteurs très efficaces parce qu'elles contiennent des réseaux de simples et de doubles liaisons alternées. De tels composés sont appelés ployées. Ils ont des bandes d'absorption très forte dans la région visible du spectre.

Les photons absorbés par les nombreuses chlorophylles sont canalisés vers un centre de réaction (**Bouzaida et Debbakh , 2006**).

5.2. Les composés phénoliques et la détoxification des formes activées d'oxygène

La plante est le siège d'une intense activité métabolique aboutissant à la synthèse de principes actifs les plus divers. Ce processus métabolique est lié aux conditions mêmes de vie de la plante : la plante doit faire face à de multiples agressions de l'environnement dans lequel développer un métabolisme particulier lui permettant de synthétiser les substances les plus diverses pour se défendre : les métabolites secondaires, les polyphénols constituent une famille de molécules largement présente dans le règne Végétal. Ils sont caractérisés comme l'indique le nom, par la présence de plusieurs groupements Phénoliques associés en structures plus ou moins complexes généralement de haut poids moléculaire. (**Beta et al., 2005**).

Ces composés sont le produit du métabolisme secondaire des plantes, ils sont synthétisés par l'ensemble des végétaux. Ils sont présents dans les vacuoles des tissus, participent aux réactions de défense face à différents stress biotiques ou abiotiques (pathogènes, rayonnements UV...). Leur répartition tant qualitative que quantitative dans la plante varie selon les espèces, les organes, les tissus ou encore les différents stades de développement. (**Beta et al., 2005**).

L'appellation « polyphénols » ou « composés phénoliques » englobe un vaste ensemble de plus de 8000 molécules divisées en une dizaine de classes chimiques. Ces molécules présentent toutes un point commun : la présence d'au moins un cycle aromatique à 6 carbones (phénol) lui-même porteur d'une ou plusieurs fonctions hydroxyles (OH). On distingue plusieurs familles de molécules dont la structure est relativement proche.

Les polyphénols sont communément subdivisés en plusieurs groupes (**Macheix et al., 2006**).

Les composés phénoliques (acides phénoliques, tannins et flavonoïdes) forment le groupe des composés photochimiques le plus important des plantes (**Beta et al., 2005**).

Deux grands groupes de polyphénols feront l'objet des prochains paragraphes, les coumarines et les flavonoïdes.

5.2.1. Flavonoïdes :

Le nom flavonoïde proviendrait du terme flavedo, désignant la couche externe des écorces d'orange (**Piquemal, 2008**), cependant d'autres auteurs supposaient que le terme flavonoïde a été plutôt prêté du flavus ; (flavus=jaune) (**Karaali et al., 2004 ; Malešev et Kuntić, 2007**).

Les flavonoïdes ont été isolés par le scientifique **E.Chervreul en 1814**, mais ont été réellement découverts qu'en **1930 par Albert Szent-Györgyui**, désignés sous le nom de Vitamine en raison de leur efficacité à normaliser la perméabilité des vaisseaux sanguins cette dénomination fut abandonnée lorsqu'on se rendit compte que ces substances ne correspondaient pas à la définition officielle des vitamines, il devient clair que ces substances appartiennent aux flavonoïdes (**Nijveldt et al., 2001**).

5.2.1.1. Capture directe de radicaux libres

C'est la structure chimique aromatique qui confère aux flavonoïdes leurs potentiels anti-radicalaires, c'est pourquoi les propriétés antioxydantes des flavonoïdes sont souvent associées à leurs potentiels antiradicalaires, c'est-à-dire leur capacité à piéger les espèces réactives de l'oxygène flavonoïdes (**Pokorny, 2001**).

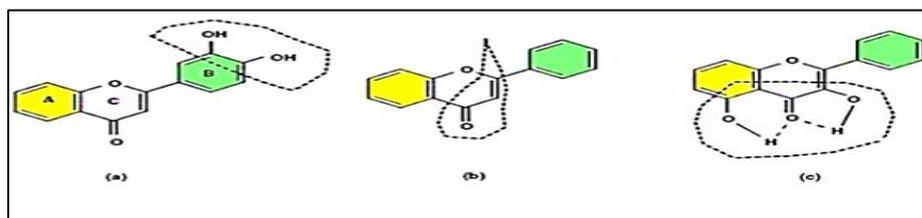


Figure 8: Chélation des radicaux libres par les flavonoïdes (**Pokorny, 2001**)

5.2.1.2. Inhibition enzymatique :

Xanthine oxydase (XO) catalyse l'oxydation de l'hypoxanthine et de la xanthine en acide urique. Plusieurs études ont montré la relation entre la structure chimique des flavonoïdes et leur activité inhibitrice de la xanthine oxydas.

6. Principaux stress environnementaux auxquels les plantes sont confrontées

De nombreuses situations de stress biotique ou abiotique peuvent être à l'origine de l'introduction ou de la production des ERO dans la cellule végétale :

6.1. Stress biotique

Deux types de stress peuvent affecter les plantes : (i) des stress biotiques causés par des organismes vivants (champignons, bactéries, virus, nématodes, insectes, etc.) De nombreux agents pathogènes pénètrent dans la plante, soit par voie mécanique en forçant la résistance physique des barrières histologiques, soit par l'excrétion d'enzymes dégradant la cuticule. Le végétal attaqué peut alors répondre par des réactions qui limitent la pénétration du parasite. (Laval-Martin et Mazliak, 1995).

6.2. Stress abiotique :

Plusieurs stress abiotiques peuvent à l'origine du stress oxydatif, parmi ces stress, le stress aux UV, le stress thermique, le stress par déficit hydrique, le stress aux métaux lourds, etc .

6.2.1 Stress par déficit hydrique

En cas de stress hydrique, on note une accumulation de radicaux libres et une peroxydation de lipides membranaires intenses. (Chen *et al.*, 2007).

Une dégradation de protéines (Jiang et Zhang, 2001) et des dommages au niveau de l'ADN (Hagar *et al.*, 1996). d'où apparition d'un stress oxydatif. Une conséquence importante des réductions de photosynthèse en cas de sécheresse est la synthèse de composés toxiques oxydants dans les cellules. Si l'énergie solaire captée par les photosystèmes de la feuille n'est plus utilisée entièrement par la photosynthèse, des formes toxiques de l'oxygène peuvent apparaître, radicaux superoxydes (O_2^-), peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et radicaux hydroxyles (OH°) (Apel et Hirt, 2004). Différents mécanismes permettent de contrecarrer cette accumulation de radicaux toxiques. Les caroténoïdes sont impliqués dans ce mécanisme via le cycle des xanthophylles (Munné-Bosch et Alegre, 2000).

6.2.2. Stress salin par le chlorure de sodium (NaCl)

La salinité constitue l'un des stress abiotiques les plus répandus au niveau de la planète et limite fortement les rendements. Les ERO sont produites au cours du stress salin qui change la perméabilité sélective des biomembranes en produisant une fuite membranaire qui change l'activité enzymatique (**ZhongQun *et al.*, 2007**)

6.2.3. Stress par le chlorure de mercure(HgCl₂)

Ces une masse atomique et supérieure à 50 , présents dans. l'environnement à l'état de traces (oligoéléments), sont très toxiques lorsque, absorbés par la plante, leur concentration endocellulaire dépasse un certain seuil. (**Heller *et al.*, 1998**).

Parmi l'ensemble des métaux lourds, une vingtaine d'entre eux sont indispensables aux processus physiologiques majeurs, en particulier la respiration, la photosynthèse ou l'assimilation des macronutriments (ex. azote, soufre, etc.) (**Kabata-Pendias et Pendias *et al.*, 2001**) Nombre de ces métaux, Cu, Zn, Ni, Fe, Co, Se et Ba sont aussi impliqués au niveau de processus moléculaires tels que le contrôle de l'expression des gènes ; la biosynthèse des protéines, des acides nucléiques, des substances de croissance, de la chlorophylle et des métabolites secondaires ; le métabolisme lipidique ou la tolérance au chlorophylle et des métabolites secondaires ; le métabolisme lipidique ou la tolérance au stress (**Rengel, 1999**).

7.Généralités sur la fève

7.1. Systématique

La fève est classée comme suit (**Dajoz, 2000**) :

- Règne : Végétal
- Embranchement : Spermaphytes
- Sous-embranchement : Angiospermes
- Classe : Dicotylédones
- Sous-classe : Dialypétales
- Série : Caliciflores

- Ordre : Rosales
- Famille : Fabacées
- Sous-famille : Papilionacées
- Genre : *Vicia*
- Espèce : (*vicia faba*)



Figure 9 : (*vicia faba L*) (anonyme)

7.2. Les critères de distinction entre les variétés de (*vicia faba*)

Dans le langage courant (*vicia faba*) major est nommée « fève », (*vicia faba*) minor « fêverole » et (*vicia faba*)equina « févette ». La différence entre les trois variétés est basée principalement sur la taille et la forme des graines (**Le Guen et Duc, 1992**).

Major (fève) :

- Taille des graines : Grosse ou très grosse (poids de 1000 graines > 1200g)
- Forme de graines : Graines larges et plates
- Taille des gousses : Gousse très longue (nombre d'ovules de 7 à 13)
- Forme des gousses : Aplatie souvent recourbée

Equina (févette) :

- Taille des graines : Moyens (poids de 1000 graines entre 800 et 1200 g)

- Forme des graines : Graines présentant une dépression latérale des cotylédons
- Taille des gousses : Gousse longue (nombre d'ovules 3 à 4)
- Forme des gousses : Moins aplatis

Minor (fève) :

- Taille des graines : Petites (poids de 1000 graines < 800)
- Forme des graines : Ovoïdes réguliers et lisses
- Taille des gousses : Gousse courte (nombre d'ovules de 2 à 3)
- Forme des gousses : Cylindrique

Il est à signaler que, pour la fève, la sphéricité décroît, alors que le Dg augmente. Contrairement à la fève où la valeur de la sphéricité augmente et celle de Dg diminue (Altuntas et Yilzid , 2007) et (El Yaakoubi, 2016).

7.3. Description botanique de la fève

La fève est une plante annuelle herbacée à croissance indéterminée (Duc, 1997). Ses feuilles sont composées et possèdent 2 à 8 folioles. La tige est creuse, rigide, avec une section carrée. Selon les conditions de culture (Le Guen et Duc, 1992) , le nombre de nœuds est compris entre 10 et 40 à partir duquel prennent naissance les feuilles. Quant à l'inflorescence, c'est une grappe de 2 à 12 fleurs axillaires qui peuvent être blanches, brunes ou violettes. Les fleurs sont hermaphrodites et présentent une structure papilionacée typique (Duc, 1997). La corolle est constituée de 5 pétales inégaux dont 1 étendard, 2 ailes latérales et 2 inférieures (la carène) qui sont soudés sur leurs bords extrêmes (Mbida, 2014) , le calice est gamosépale avec 5 sépales, les étamines sont au nombre de 10 dont 9 sont unies dans une gaine renfermant l'ovaire et la dixième haute est libre.

L'appareil reproducteur femelle possède un ovaire contenant des ovules allant de 1 à 10 (El Bakkali, 2011). Le fruit est une gousse érigée et cylindrique avec 2 à 8 petites graines ovoïdes, régulières et lisses. Le système racinaire est constitué d'une racine pivotante possédant des racines secondaires. Ces dernières présentent des nodosités blanchâtres assez nombreuses avec en symbiose des bactéries du sol du genre *Rhizobium* assurant la fixation de l'azote atmosphérique (Duc, 1997 ; Tripp, 2011). La reproduction est partiellement

allogame. La pollinisation est entomophile et assurée par les insectes. Ainsi, on peut remarquer un croisement naturel par pollinisation naturelle allant de l'ordre de 2 à 84% en fonction de la géographie, de l'espèce de l'activité des insectes pendant la floraison (**Duc, 1997**).

7.4. Culture de la fève

(*vicia faba*) est relativement résistante au froid. Bien que tolérante sur la qualité du sol, elle aime davantage un sol argileux, à tendance calcaire. Dans les régions chaudes aux hivers doux, la fève est semée à l'automne, et récoltée au printemps. Les graines sont semées sur une terre propre. La germination intervient 8 à 12 jours après. Lorsque les pieds portent suffisamment de gousses, on peut pincer les bourgeons supérieurs pour stopper la croissance de la plante ; celle-ci mettra alors toute son énergie dans la production des graines. Cette légumineuse fixe l'azote atmosphérique.

Elle n'est donc pas dépendante de la quantité d'azote présente dans la terre. En revanche, elle demande, pour être bien productive, un apport en potassium. Comme elle enrichit la terre, sa culture doit être mise en rotation avec d'autres espèces non légumineuses (**Le Guen et Duc, 1992**). Les pieds de fève attirent systématiquement les pucerons, et peuvent même servir de pièges à pucerons pour les jardins biologiques.

Facteurs qui influencent la culture de la fève

La fève est une culture des climats frais et non dans les climats secs, à partir de niveau de la mer jusqu'à une altitude de 3500 mètres d'après (**Lim, 2012**). Les facteurs qui influencent sur le développement de la fève sont :

La température : Brink et Belay (2006) rapportent qu'une température moyenne aux alentours de 13°C est optimale pour la croissance de la fève.

Le sol : Selon **Brink et Belay (2006)**, la fève préfère les sols bien drainés au pH neutre (6.5- 7.5) et à fertilité moyenne. Selon **Pédron (2006)**, la fève est peu exigeante sur le plan édaphique, elle est cultivée avec succès dans les sols sablo-argileux humifères.

L'eau : La fève nécessite une pluviométrie annuelle de 700 à 1000 mm, dont plus de 60% doivent tomber pendant la période de croissance (**Brink et Belay, 2006**).

La photopériode : La fève est une plante de jours longs. Elle forme son bourgeon à fleurs à partir du moment où la photopériode dépasse les 12 heures consécutives (**Patrick et Stoddard, 2010**).

7.5. Composition chimique

La valeur nutritionnelle de la fève est attribuée à sa teneur élevée en protéines (25 à 35%). La plupart de ces protéines sont des globulines (60%), des albumines (20%), des glutélines (15%) et des prolamines (**Larralde et Martinez, 1991**). Les graines de fève contiennent des protéines riches en lysine et faibles en méthionine, cystéine et tryptophane. De ce fait, les fèves sont souvent dans les régimes alimentaires des êtres humains comme du bétail (**Crépton et al., 2010**). Les fèves sont aussi une bonne source de glucides (50 à 60% d'amidon), de minéraux (leur teneur varie entre 1 et 3,5%, étant particulièrement riche en calcium et en fer, de fibres (7%) et de vitamines (les quantités de thiamine, tocophérols, niacine et l'acide folique sont élevées alors que la vitamine C, la riboflavine et d'autres vitamines liposolubles sont faibles. Par contre, la proportion lipidique est faible environ 1 à 2,5%, particulièrement riche en acide gras linoléique (**Larralde et Martinez, 1991**). La fève constitue une source considérable d'énergie (344 Kcal/100 g) et peut efficacement remplacer les protéines animales dans les pays pauvres (**Chaieb et al., 2011**).

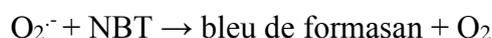
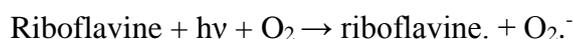
8. Méthode de détection de stress végétative chez les végétaux :

De nombreuses méthodes sont utilisées pour détecter l'accumulation d'ERO. Elles sont :

8.1. Spectrophotométrie

Les activités enzymatiques sont évaluées par spectrophotométrie, en suivant l'évolution de l'absorbance de milieu réactionnel due à l'oxydation de leur co-substrat (ascorbate pour l'APX, gaïacol pour la gaïacol peroxydase GPOX, NADPH pour la GR) ou la réduction du substrat (H₂O₂ pour la CAT). L'évaluation de l'activité SOD est différente. Le milieu réactionnel contient une molécule photosensibilisatrice (la riboflavine) et une molécule capable d'être réduite par O₂⁻ (le nitrobleu de tétrazolium). L'éclairage intense du milieu réactionnel induit l'oxydation de la riboflavine qui cède un électron au dioxygène pour former un anion superoxyde interagissant avec le NBT (**Bradford, 1976**), incolore, pour former du bleu de formasan (bleu). L'activité de la SOD limite la formation de ce bleu

de formasan et est évaluée en pourcentage d'inhibition par rapport à un contrôle dépourvu de SOD



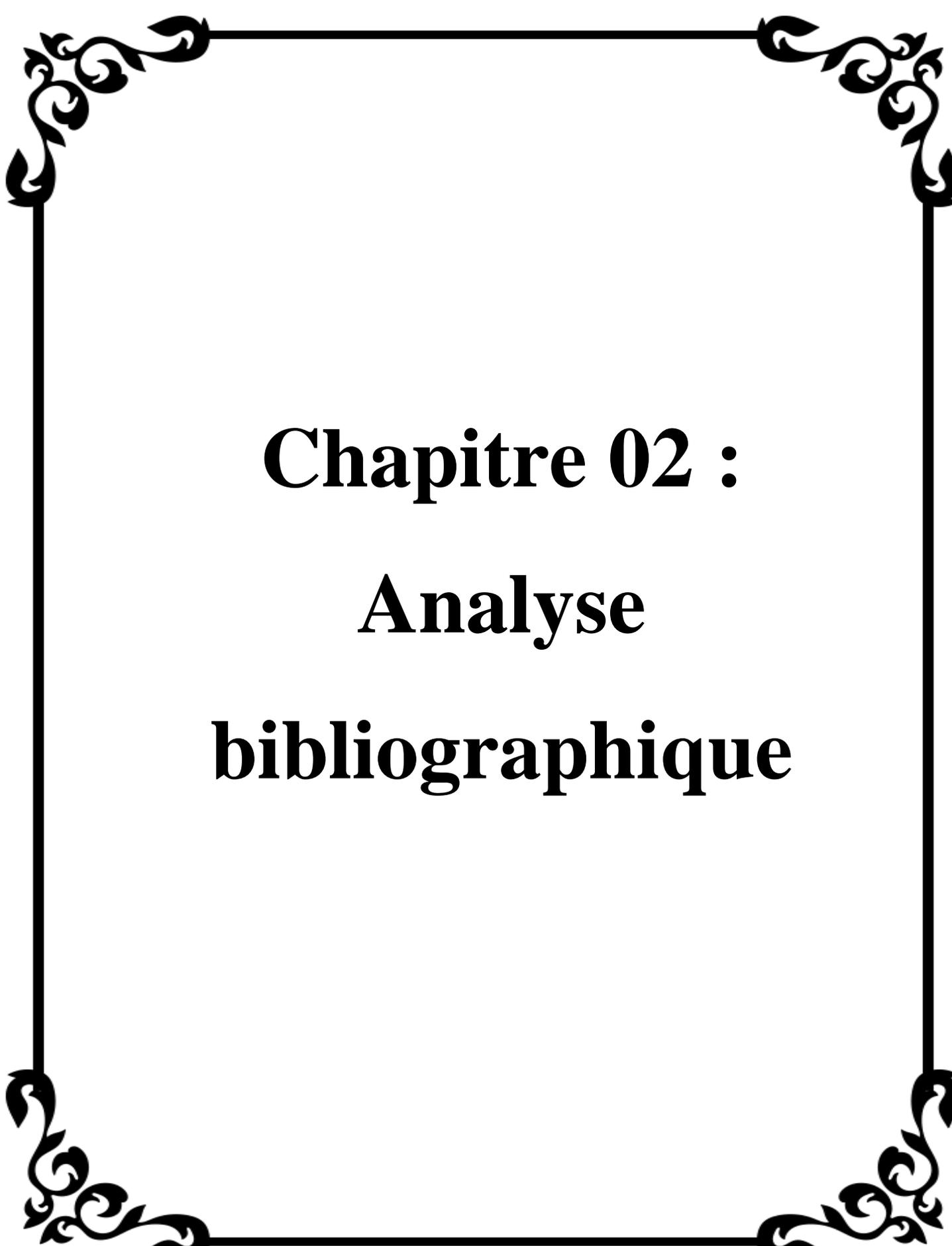
Les activités sont calculées en μmol de substrat oxydé ou réduit. $\text{min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ de protéine. L'activité SOD est donnée en unité. mg^{-1} de protéine, une unité correspondant à la capacité d'inhiber 50 % du formasan formé dans le tube témoin.

8.2 .TBArS ou indice TBArS Principe

Les TBArS (substances réactives à l'acide thiobarbiturique) sont des coproduits formés au cours de la peroxydation des acides gras insaturés (acides gras de la série omega 3 et acides gras polyinsaturés de la série omega 6). Leur détermination permet de quantifier l'état d'oxydation des échantillons. Ces composés sont généralement stables et responsables d'odeurs, ils reflètent l'état d'oxydation de l'échantillon analysé. L'indice TBArS correspond à une augmentation de l'absorbance mesurée à 530 nm suite à la réaction de l'échantillon et de l'acide 2-thiobarbiturique (**Pokorny et Dieffenbacher, 1989**). Différentes méthodes d'extraction peuvent être employées. Les trois principales méthodes sont : l'extraction en milieu acide, l'extraction par distillation et les méthodes d'analyse directe de l'échantillon .

Selon le type d'extraction, la préparation de l'échantillon est adaptée pour la récupération des espèces réactives à l'acide thiobarbiturique (TBArS) Sur les graisses pures, une méthode directe est utilisée (IUPAC 2.531) par dissolution de l'échantillon de lipide dans du butanol avant mise en présence d'acide thiobarbiturique (TBA). Au bout d'un temps de réaction de 45 minutes à 100°C, l'absorbance est mesurée à 530 nm

Le réactif FOX2 (**Griffiths et al., 2000**). La méthode au xylénol orange XO ; 3,32 - Bis[N, N-bis(carboxyméthyl) aminométhyl]-o-cresolsulfonephthalein tetrasodium) Repose sur l'oxydation en milieu acide des ions ferreux en ions ferriques par les hydroperoxydes



Chapitre 02 :
Analyse
bibliographique

Méthodologie

Cette partie est une analyse bibliographique d'un précédent travail : thèse de doctorat : par **Pourrut Bertrand (2008)**. Dont les expériences se sont faite sur (*vicia faba*)

1. Condition de culture et échantillonnage

Les graines de (*vicia faba*) de type "aguadulce", conservées à l'obscurité en chambre froide (4°C) , sont mises à hydrater pendant vingt-quatre heures dans de l'eau, à température ambiante. Puis mises à germer

Les plantules sont alors transférées dans un dispositif de culture hydroponique en phytotron permettant une croissance optimale des végétaux (**Figure 10**).

Après deux semaines, les plantes (5ème-6ème étage foliaire) sont placées en bac individuel pour subir les divers traitements. Afin d'étudier les effets du plomb après une courte exposition, les plantes sont plongées dans une solution nutritive contenant du plomb.



Figure 10 : Conditions de cultures de (*vicia faba*)(**Pourrut,2008**).

A la fin de l'expérience, un échantillonnage est effectué à la fois sur les feuilles et sur les racines immédiatement congelées dans l'azote liquide. La réponse des organes au stress peut varier en fonction de leur âge. Lors des différentes expérimentations, pour éviter de telles variations entre les feuilles de différents étages foliaires ou entre racines, les échantillons sont broyés grossièrement afin d'homogénéiser le tout.

2. Paramètre étudié

2.1. Evaluation de la peroxydation lipidique

Dans ce travail, la peroxydation lipidique a été évalué par deux techniques,

Le test FOX2 pour mesurer les hydroperoxydes , et le test TBARS (Thiobarbituric reactive species) pour mesurer le MDA , et c'est la technique dont nous allons faire l'analyse des résultats.

Le test TBARS est le test le plus couramment utilisé pour déterminer indirectement la peroxydation des lipides, en mesurant le MDA (**Hodges *et al.*, 1999**).

Le MDA est extrait dans une solution hydro-alcoolique, à 4 °C et à l'obscurité, ensuite mis à incuber à 95 °C avec l'acide thiobarbiturique, en présence d'hydroxytoluène butylé (HTB) pour éviter toute oxydation du mélange. La réaction entraîne la formation d'un complexe de couleur rouge entre deux molécules d'acide thiobarbiturique. Les teneurs, évaluées spectrophotométriquement et calculées d'après les équations de **Hodges et collaborateurs (1999)**, pour être exprimées en nanomoles de TBARS par grammes de poids frais

2.2. Extraction, dosage des protéines et activités enzymatiques

Dans ce travail le dosage des protéines s'est fait par spectrophotométrie

Après broyage des feuilles et racines de fèves dans l'azote liquide. Le broyat est suspendu dans un tampon phosphate d'extraction contenant un mélange d'anti-protéases. Après centrifugation, et afin d'éliminer les débris cellulaires, le culot est resuspendu dans ce même tampon. La concentration en protéines totales est déterminée par spectrophotométrie d'après la méthode de **Bradford (1976)**.

Les activités enzymatiques sont évaluées par spectrophotométrie, en suivant l'évolution de l'absorbance de milieu réactionnel due à l'oxydation de leur co-substrat (ascorbate pour l'APX, gaïacol pour la gaïacol peroxydase GPOX, NADPH pour la GR) ou la réduction du substrat (H₂O₂ pour la CAT).

L'évaluation de l'activité SOD est différente. Le milieu réactionnel contient une molécule photosensibilisatrice (la riboflavine) et une molécule capable d'être réduite par O₂⁻ (le nitrobleu de tétrazolium). L'éclairage intense du milieu réactionnel induit l'oxydation de la

riboflavine qui cède un électron au dioxygène pour former un anion superoxyde interagissant avec le NBT, incolore, pour former du bleu de formasan (bleu). L'activité de la SOD limite la formation de ce bleu de formasan et est évaluée en pourcentage d'inhibition par rapport à un contrôle dépourvu de SOD.

Les activités sont calculées en μmol de substrat oxydé ou réduit. $\text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ de protéine. L'activité SOD est donnée en unité. mg^{-1} de protéine, une unité correspondant à la capacité d'inhiber 50 % du formasan formé dans le tube témoin.

2.3 Extraction et dosage des pigments foliaires

Le dosage des pigments foliaires s'est fait par spectrophotométrie

Les chlorophylles a, b et les caroténoïdes, extraits à l'obscurité et à 4 °C à l'aide d'un mélange hydro-acétonique, ont été dosés par spectrophotométrie. Les teneurs calculées d'après les équations de **Lichtenthaler (1987)** ont finalement été exprimées en μg de pigment par cm^2 de feuille extraite.

3. Résultats et discussion

3.1. Evaluation de la peroxydation lipidique

Le niveau de peroxydation lipidique dans les racines (Vf) est représenté dans **la figure 11A** Le TBARS n'a présenté aucune variation significative. Cependant, le test FOX2 a révélé que le niveau des lipides d'hydroperoxydes (LHPO) était fortement augmenté après 1 h de traitement au plomb (1,6 fois plus que le niveau de contrôle) et légèrement après 8 h (1,14 fois). Cette différence entre les deux dosages : peut-être dû au fait que le malondialdéhyde ne se forme qu'à partir d'acides gras à trois ou plus de doubles liaisons (**Halliwell et Gutteridge, 1989**). Bien que les tissus des racines des plantes.

Les résultats de ce travail montrent qu'une peroxydation lipidique s'est produite deux fois au cours du premier jour de l'exposition au Pb.

Ces deux événements oxydatifs indiquent que le Pb a induit deux bouffées oxydatives distinctes dans racines pendant les 24 premières heures de traitement. D'après ces résultats et ceux de la mesure de l'absorption du plomb, un lien pourrait exister entre l'absorption du plomb et la production de ROS. En effet, n'ont été générées qu'après une période avec un taux d'absorption élevé de Pb **voire Figure 2**

D'après l'auteur la cause de cette absorption séquentielle est inconnue, mais ça a généré des ROS dépassant les capacités antioxydantes et donc causé une peroxydation lipidique. La peroxydation lipidique dans les feuilles est représenté dans **la figure 11 B**.

Contrairement aux données obtenues dans les racines, les tests FOX2 et TBARS ont présenté le même profil. Aucune variation significative n'a été observée dans les taux de LHPO et de TBARS avant 8 h de traitement. Cependant, à 8 et 12 h, ces les niveaux ont augmenté de manière significative (1,42 et 1,64 fois plus élevés que dans le contrôle), puis ont diminué à niveau basal à 24 h. Ceci suggère l'apparition d'un sursaut oxydatif dès que le plomb la concentration était significative dans les feuilles. Bien que les concentrations de Pb dans les feuilles se situent entre 10 et 35 fois plus faible que dans les racines, la poussée oxydative induite par le plomb semble être plus longue et plus intense.

Ces résultats ont montré que les feuilles de (*vicia faba*) sont très sensibles au plomb.

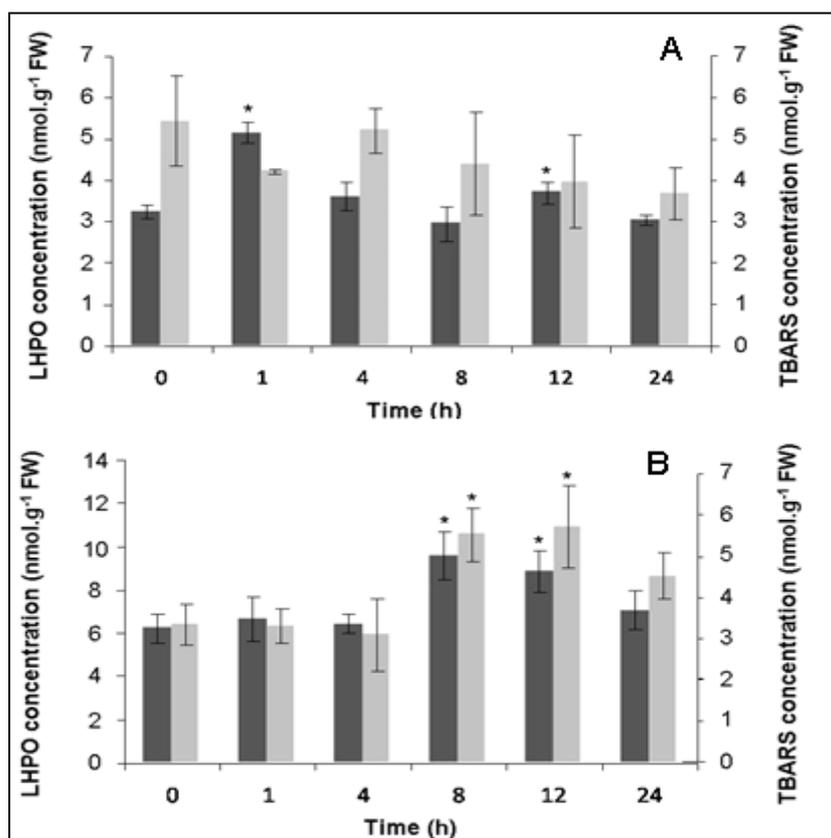


Figure 11 : Influence des traitements Pb sur la peroxydation lipidique chez (*vicia faba*) évaluée par Dosage FOX2 (barres gris foncé) ou dosage TBARS (barres gris clair) dans les racines (Fig. 2A) et feuilles (figure 2B). (Pourrut,2008).

3.2. Extraction, dosage des protéines et activités enzymatiques

3.2.1. Enzymes antioxydantes dans les feuilles

Selon les résultats obtenus dans les feuilles **voir tableau 3**, Les enzymes antioxydantes ont montré des réponses différentes au cours de l'exposition au plomb.

Dans les 8 premières heures d'exposition aucun changement significatif n'a été observé. À 8 h, l'activité SOD était 1,34 supérieure à celle du groupe témoin, mais elle était de courte durée et son activité est revenue à la ligne de base à 24 h.

Pour l'activité GPOX des cinétiques similaires ont été observé. Cependant, son activation était 2 fois plus élevée et à 24 h la GPOX était significativement inhibée (49 % du groupe témoin). En revanche, les activités GR et APX n'étaient pas affectées avant 12h, mais augmentaient entre 12h et 24h de traitement. La CAT n'a pas été affectée jusqu'à 12 heures et a persisté fortement pendant 24 heures (40,9 % du contrôle).

Dans les plantes, les enzymes SOD sont le principal piègeur des radicaux libres O_2^- et les convertissent en O_2 et H_2O_2 . Le peroxyde d'hydrogène est ensuite éliminé par diverses enzymes antioxydantes, telles que la catalase, la guaiacol peroxydase et l'ascorbate peroxydase (**Apel et Hirt, 2004**). Par conséquent, la régulation de leur activité est un indicateur indirect des niveaux de ROS. En accord avec les résultats de peroxydation lipidique des feuilles, tous ces résultats indiquent fortement que des ROS ont été produites dans les feuilles après 8 h d'exposition. Selon les activités de SOD, GPOX et APX, la production d' O_2^- est de courte durée, tandis que la production de H_2O_2 dure longtemps. Fait intéressant, ces générations coïncident avec l'arrivée du plomb sur les feuilles **voire Figure 2**.

Tableau 3: Influence des traitements Pb sur les capacités enzymatiques antioxydantes des racines de (*vicia faba*). Les valeurs sont des moyennes de trois expériences individuelles avec des triplicats \pm écart type (S.D.). Des lettres différentes indiquent des valeurs significativement différentes à une durée particulière (**Pourrut, 2008**).

		SOD (U.g ⁻¹ protein)		CAT (U.g ⁻¹ protein)		GPOX (U.g ⁻¹ protein)		APX (U.g ⁻¹ protein)		GR (U.g ⁻¹ protein)	
		Means	S.D.	Means	S.D.	Means	S.D.	Means	S.D.	Means	S.D.
		Roots	Control	23.03 h	2,10	1.83 a	0.24	15.12 c	0.80	0.63 d	0.01
Pb 1H	50,81 a		1,43	1.30 b	0.09	4.37 d	2.18	0.71 b	0.01	0.170 b	0.022
Pb 4H	47,05 a		2,04	1.24 b	0.17	35.65 a	4.36	0.65 c	0.01	0.073 c	0.010
Pb 8H	21,53 bc		1,27	0.83 c	0.07	18.99 bc	2.89	0.57 e	0.02	0.028 d	0.003
Pb 12H	17,65 cd		1,70	1.08 bc	0.08	20.56 b	0.28	0.68 b	0.02	0.157 b	0.030
Pb 24H	12,41 d		2,61	0.88 c	0.06	10.52 c	2.01	0.79 a	0.04	0.281 a	0.003
Control	41.00 bc		3.71	1.63 ab	0.13	0.037 bc	0.002	0.19 b	0.04	0.046 b	0.006
Leaves	Pb 1H	40.36 bc	2.55	1.41 ab	0.39	0.028 cd	0.011	0.13 b	0.02	0.049 b	0.001
	Pb 4H	42.87 b	3.63	1.71 ab	0.18	0.040 bc	0.009	0.16 b	0.02	0.053 ab	0.004
	Pb 8H	55.21 a	2.26	1.27 b	0.07	0.076 a	0.005	0.16 b	0.02	0.063 ab	0.002
	Pb 12H	43.73 b	3.02	1.78 a	0.13	0.050 b	0.012	0.25 a	0.02	0.069 a	0.017
	Pb 24H	32.34 c	3.51	0.67 c	0.37	0.018 d	0.005	0.31 a	0.05	0.069 a	0.032

3.2.2. Enzymes antioxydants dans les racines

Le tableau 3 montre également que la réaction enzymatique antioxydant est significativement différente dans les racines. Après 1 heure, l'activité SOD était le double de celle du témoin et restait stable jusqu'à 4 heures. Ensuite, il est tombé au niveau basal, et à 24 heures, il était significativement supprimé (53,8 % du contrôle). L'activité de la CAT a diminué tout au long de la période de traitement au plomb et a atteint sa valeur la plus faible 8 heures après le traitement au plomb (45 % du groupe témoin). Dans le cas de la racine active APX, nous avons enregistré une activation rapide et significative (10 %) après 1 heure. À 8 heures du matin, l'activité APX est tombée aux niveaux de base. Puis il augmente à nouveau et atteint sa valeur maximale (125% du contrôle) au bout de 24 heures.

En revanche, nous avons d'abord observé une diminution de l'activité GPOX (jusqu'à 70%) à 1 heure, puis l'avons induite après 4 heures, ce qui était 12,9% plus élevé que l'activité mesurée à la station de contrôle. Pendant jusqu'à 24 heures, l'activité GPOX est tombée en dessous du niveau de contrôle. La cinétique de la balle pour activer le GR est différente. L'activité GR a augmenté de manière significative (jusqu'à 560%) à 1 heure. Après 4 heures de

traitement, l'activité GR était fortement réduite, mais elle était encore 2,5 fois supérieure à celle des plantes non réduites. Par la suite, il est encore tombé à la ligne de base à 8 heures, mais a été à nouveau fortement stimulé après 12 heures et 24 heures d'exposition au plomb (590% et 1053 % du contrôle, respectivement).

De ces résultats, nous pouvons tirer plusieurs conclusions. Enzymes antioxydantes de plomb fortement modifiées (**tableau 3**). Une telle augmentation ou diminution de l'activité de ces enzymes a été rapportée avec une variété de métaux lourds (**Van Assche et Clijsters, 1990 ; Seregin et Ivanov, 2001 ; Schutzendubel et Polle, 2002**). Les nombreuses données disponibles montrent que la réponse aux antioxydants dépend de l'espèce végétale, de la concentration minérale et de la durée du traitement. Dans nos conditions, le Pb a stimulé l'activité SOD et cette augmentation est révélatrice de la présence d' O_2^- pendant les 4 premières heures de traitement au Pb. Ce résultat est cohérent avec nos précédents travaux qui ont démontré la production dépendante du superoxyde NADPH-oxydase dans les racines Vf exposées à la même concentration de plomb (**Pourrut et al., 2008**). Jusqu'à 4 h, l'activation GPOX et APX confirme la présence de H_2O_2 dans les tissus racinaires. GPOX et APX semblent fonctionner de manière complémentaire pour éliminer le H_2O_2 des racines. En effet, l'activité APX était inversement corrélée à l'activité GPOX ($r = -0,542$; $P < 0,05$). Cependant, la CAT a été inhibée tout au long de l'expérience. Cette inhibition du plomb a souvent été rapportée (**Verma et Dubey, 2003 ; Chen et al., 2007 ; Wang et al., 2007a**). L'inactivation de la CAT dépend de la dose du plomb et peut être due à une interaction directe entre le plomb et la catalase. En fait, les ions plomb peuvent déplacer les ions fer dans l'hémis catalase porphyrine.

Les résultats ont également montré que l'oxydation induite par le plomb était de courte durée, à l'exception de la CAT, toutes les activités enzymatiques sont revenues aux niveaux de base après 8 h de traitement. Cependant, selon GPOX, l'activité APX et GR du plomb semble induire une deuxième vague de H_2O_2 12 heures plus tard. Des expériences histologiques utilisant l'amidon KI + et le NBT ont confirmé la présence d' O_2^- et H_2O_2 à 1 heure et HO à 12 heures (données non présentées) Ces observations ont également été confirmées par les résultats obtenus par analyse des peroxydes lipidiques. En fait, ces deux flux d'oxydation différents correspondent aux deux pics de peroxyde précédemment décrits. Les racines de blé traitées au cuivre ont également montré deux poussées oxydatives, la première en quelques minutes et la seconde en quelques heures (**Sgherri et al., 2007**). La plante a répondu à un stress abiotique ou biotique. (**Mika et al., 2004**).

Le deuxième point à souligner est que la RG semble être l'enzyme clé contre le plomb dans les racines des plantes. L'activation de GR est continue, mais généralement importante. Étant donné que GR catalyse la réduction du glutathion oxydé dépendant du NADPH en glutathion réduit, sa sur activation peut souligner le rôle central du GSH en réponse au plomb dans les racines Vf.

3.3 Extraction et dosage des pigments foliaires

L'effet du plomb sur les pigments photosynthétiques est illustré à la **figure 12**. Les données montrent que la composition des pigments n'a pas été affectée avant 8 h. A 8h, les teneurs en chlorophylle et en carotène sont fortement modifiées mais sont également affectées par le traitement au plomb. Les teneurs en chlorophylle a, b et en caroténoïdes ont diminué à 73,4 %, 70,5 % et 72,3 %, respectivement, du groupe témoin. Après cela, la teneur en Chlo a et en caroténoïdes est restée stable, tandis que la teneur en Chlo b a légèrement augmenté jusqu'à 24 h.

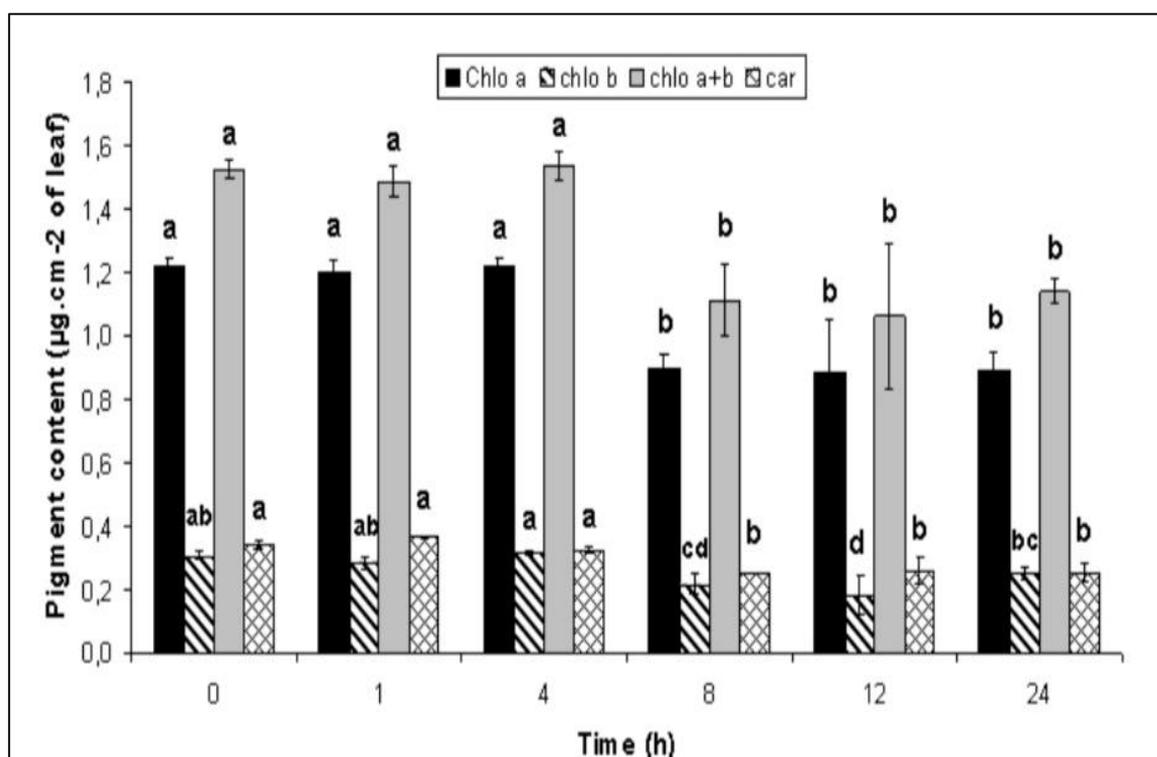


Figure 12 : Effets du Plomb sur les teneurs en chlorophylle a, b, ab et caroténoïdes dans les feuilles de (*vicia faba*). (Pourrut,2008).

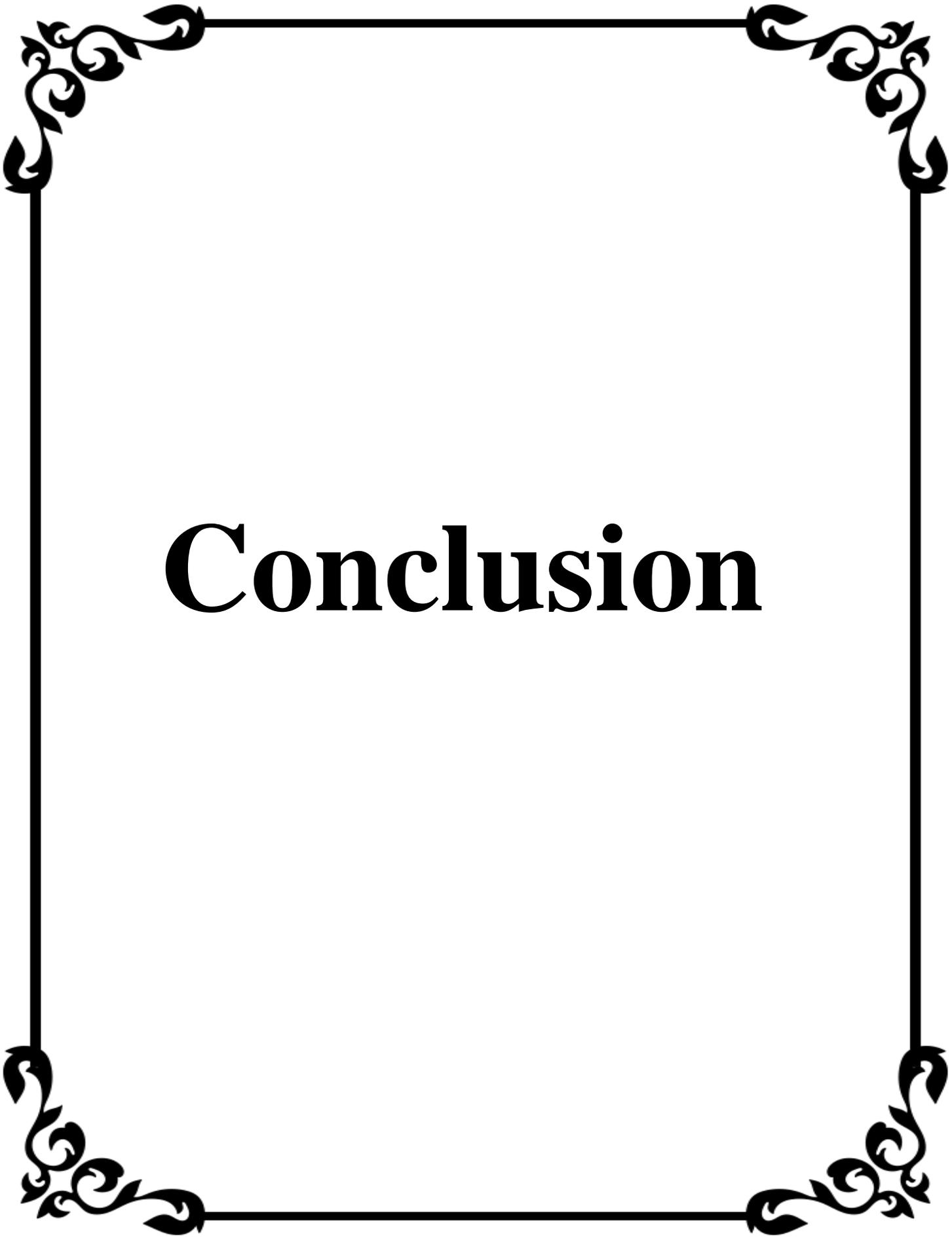
Les résultats sont la moyenne de trois expériences indépendantes \pm SD (n=3). Des lettres différentes indiquent des valeurs significativement différentes à une durée particulière.

La dégradation des chlorophylles et des caroténoïdes est un aspect bien connu de la toxicité du plomb (**Seregin et Ivanov, 2001 ; Sharma et Dubey, 2005**). De manière inattendue, dans nos conditions, la teneur en chlorophylles et en caroténoïdes a diminué rapidement, seulement 8 h après l'exposition au Pb. La toxicité du plomb sur les pigments photosynthétiques est associée à sa disponibilité pour inhiber leurs voies de biosynthèse (**Wozny *et al.*, 1995 ; Łukaszek et Poskuta, 1998**).

Cependant, dans notre cas, à en juger par la vitesse de réduction et la faible teneur en plomb des feuilles, cela est très Il est peu probable que cela soit dû à une inhibition de la biosynthèse,

Dans le cas de cette expérience, et selon la vitesse de réduction au moins dans les 8 heures. Ce résultat peut être expliqué par la stimulation par la chlorophyllase précédemment démontrée par **Drazkiewicz (1994)**. Cependant, les teneurs en pigments étaient inversement corrélées avec la peroxydation lipidique. Cette corrélation indique que l'action du Pb sur les pigments photosynthétiques peut être médiée par les ROS.

Chlo b est connu pour être plus sensible au plomb que Chlo a (**Stiborova *et al.*, 1986 ; Wozny *et al.*, 1995; Łukaszek et Poskuta, 1998**). Cependant, nos données ont indiqué que Chlo b est moins sensible à une concentration de plomb plus faible. Ce résultat est cohérent avec les résultats obtenus par **Xiong *et al.*, (2006)** concernant l'exposition du chou chinois à une faible concentration de plomb.



Conclusion

Conclusion

Les plantes sont constamment soumises à des variations environnementales. Ces changements peuvent engendrer un stress qui modifie l'homéostasie cellulaire par la production de formes réactives de l'oxygène. L'accumulation phytotoxique de ces différents radicaux oxygénés peut entraîner la mort de la plante par le Stress oxydatif (ou oxydant)

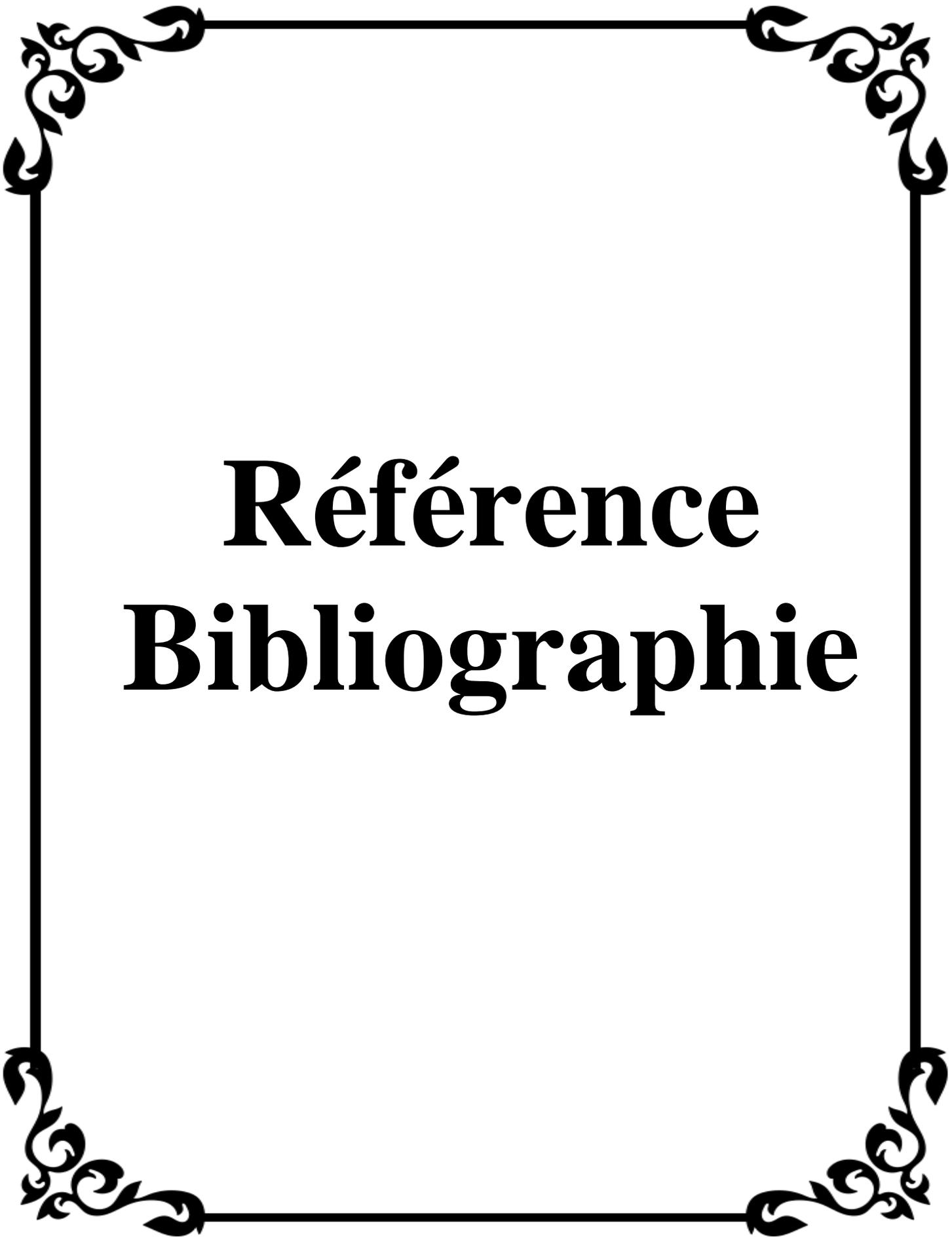
Le stress oxydatif, ou stress oxydant, est l'agression des cellules par des radicaux libres, aussi appelés « espèces réactives de l'oxygène », qui sont des atomes ou des molécules devenus très instables (réactifs) et qui peuvent interagir avec les composants des cellules et les endommager

Ce travail, qui est une étude générale sur le stress oxydatif chez les plantes, causé par des influences environnementales, par exposition des racines de (*Vicia faba*) au plomb. Notre sélection s'est faite sur plusieurs paramètres d'évaluation de la réponse oxydative, qui sont la peroxydation lipidique par la mesure des FOX et des TBARS, le dosage des protéines et des enzymes et le dosage des pigments foliaires.

Les résultats obtenus dans ce travail après les élévations du taux d'absorption de Pb, démontrent une explosion oxydative dans les racines et l'induction de peroxydation lipidique. Cette étude souligne également le faible taux de translocation du Pb entre les racines et les pousses. Cependant, les feuilles de (*Vicia faba*) sont très sensibles à cette petite quantité de Pb transférée par les racines. L'accumulation de plomb dans les feuilles a provoqué une peroxydation lipidique et une forte diminution des pigments photosynthétiques. Pour limiter cet effet négatif, de grandes quantités de phytochélatines ont été synthétisées dans les racines ainsi que dans les feuilles. Cependant, le mécanisme de l'accumulation rapide dans les feuilles et son objectif ne sont pas définis.

Des travaux supplémentaires seront nécessaires pour déterminer plus précisément l'implication de la voie (**Halliwell,Asada,Foyer**) dans la lutte contre les effets délétères du Pb, et élucider le mécanisme de la détoxification du Pb.

En conclusion, pour mener à bien cette étude, il serait intéressant d'élargir l'investigation à d'autres méthodes d'analyse et aux autres marqueurs de stress oxydatif (dosage des carbonyles, dosage des différents enzymes antioxydants, dosage de la vitamine E) ainsi que d'utiliser d'autres métaux lourds.



Référence Bibliographie

Référence Bibliographie

A

- ✂ **Aebi H.**1984. Catalase in vitro Methods in Enzymology 105:121–126.
- ✂ **Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P.**2002. Molecular Biology of the Cell (4e ed.). Peroxisomes. New York : Garland Science Ed., 615-657 p.
- ✂ **Altuntas E et Yilzid M.** 2007. Effect of moisture on some physical & mechanical properties of faba bean (*vicia faba L*) grains. Journal of Food Engineering 78 (2007) 174-183.
- ✂ **Apel K et Hirt H** .2004. "Reactive oxygen species: Metabolism, Oxidative Stress, & Signal Transduction. " Annual Review of Plant Biology 55(1) : 373-399.
- ✂ **Arasimowicz M et Floryszak-Wieczorek J.**2007. "Nitric oxide as a bioactive signalling molecule in plant stress responses. " Plant Science 172(5) : 876-887.
- ✂ **Aruoma O. I** .1999. Free radicals, antioxidants and international nutrition. Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition, 8 (1), 53-63.

B

- ✂ **Beckman J.S et Koppenol W.H** .1996. "Nitric oxide, superoxide, & peroxynitrite: the good, the bad, & ugly. " Am J Physiol Cell Physiol 271(5) : C1424-1437.
- ✂ **Beta T, Nam S, Dexter J.E, Sapirstein H.D.**2005.Phenolic content and antioxidant activity of pearled wheat and Roller-Milled fractions. Cereal Chemistry. 82, 390-393.
- ✂ **Blee K.A, Jupe S.C, Richard G, Zimmerlin A, Davies D.R, Bolwell G.P.** 2001.Molecular identification and expression of the peroxidase responsible for the oxidative burst in French bean (*Phaseolus vulgaris L.*) and related members of the gene family. PlantMolecular Biology 47: 607-620.
- ✂ **Bonnefont R.D, Therond P, Delattre J.**2003.Radicaux libres et antioxydants. Ed: Flammarion Médecine-Sciences pp,59-81.
- ✂ **Bouzaida Y, Debbakh Z** .2006.Contribution à l'étude de l'effet de la salinité sur la chlorophylle foliaire chez *Atriplex halimus L.* et *Atriplex canescens* (Pursh) Nutt.P 14
- ✂ **Bradford M.M** .1976. "A rapid & sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. " Analytical Biochemistry 72(1-2) : 248- 254.
- ✂ **Brink M et Belay G** .2006. Ressources végétales de l'Afrique tropicale 1 : céréales et légumes secs Prota, pays. Bas pp. 221-223.

C

- ✂ **Chaieb N, Bouslama M, Mars M.** 2011. Growth et yield parameters variability among faba bean (*vicia faba L*). génotype. J. Nat. Prod. Plant resour. 1(2) :81-90pp.

- ✂ **Chen J, Zhu C, Li L.p , Sun Z.y , Pan X.b.**2007. "Effects of exogenous salicylic acid on growth and H₂O₂-metabolizing enzymes in rice seedlings under lead stress." Journal of Environmental Sciences 19(1): 44-49.
- ✂ **Chen J, Zhu C, Li L-p , Sun Z-y , Pan X-b .**2007. "Effects of exogenous salicylic acid on growth & H₂O₂-metabolizing enzymes in rice seedlings under lead stress. " Journal of Environmental Sciences 19(1) : 44-49.
- ✂ **Crawford NM et Guo F-Q .**2005. "New insights into nitric oxide metabolism & regulatory functions. " Trends in Plant Science 10(4) : 195-200.
- ✂ **Crepton K, et Marget P, Peyronnet C, Carrouée B, Arese P, Duc G.**2010. Nutritionnal value of faba bean (*vicia faba L*). Seed for feed & food. Field crops research. 115 : 329_339pp.

D

- ✂ **Dajoz R.**2000. Eléments d'écologie. Ed. Bordas. Paris,5ème édition. in :. Mémoire de master. UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH. 114p, Maroc. 631pp.
- ✂ **Dalle-Donne I, Rossi R, Colombo R, et al. .**(2006) Biomarkers of oxidative damage in human disease. Clin Chem. 52 : 601-23.
- ✂ **Delledonne M.**2005. "NO news is good news for plants. " Current Opinion in Plant Biology 8(4) : 390-396.
- ✂ **Drazkiewicz M.**1994. "Chlorophyll-occurrence, functions, mechanism of action, effects of internal & external factors. " Photosynthetica 30: 321-331.
- ✂ **Duc G.** 1997. Faba bean (*vicia faba L*). Field Crops Research 53. 99-109pp.

E

- ✂ **Edwards S.L, Raag R, Wariishi H, Gold M.H, Poulos T.L.**1993. Crystal structure of lignin peroxidase. Procaryote National Academic Science 90: 750-754.
- ✂ **El Bakkali N .**2011. Amélioration génétique de la fève et de la féverole : Mesure des différents paramètres morphologiques. Mémoire de fin d'études. Université Sidi Mohamed.
- ✂ **El Yaagoubi.** 2016. Caractérisation des graines de populations locales de (*vicia faba*) et l'évaluation de leur infestation par *Bruchus rufimanus*.

F

- ✂ **Favier A .**2006. Stress oxydant et pathologies humaines. Vol 64: 390-396, N° 6.
- ✂ **Favier A.**2003. Le stress oxydant, intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. L'actualité Chimique, novembre-décembre, p : 108-115.
- ✂ **Foote C, Valentine J, Greenberg A et Liebman J .**1985. Active Oxygen in Chemistry. New York, Chapman & Hall.

- ✂ **Foyer CH et Noctor G** .2005. "Redox Homeostasis & Antioxidant Signaling: A Metabolic Interface between Stress Perception & Physiological Responses. " *Plant Cell* 17(7) : 1866- 1875.

G

- ✂ **Gaetani G, Ferraris A, Rolfo M, Mangerini R, Arena S, Kirkman H**.1996. Predominant role of catalase in the disposal of hydrogen peroxide within human erythrocytes. *Blood* 4: 1595–9.
- ✂ **Gazaryan I.G, Lagrimini L.M, Ashby G.A, Thorneley R.N**.1996. Mechanism of spectrophotometric studies on horseradish and tobacco peroxidases. *Biochemical Journal* 313: 841-847.
- ✂ **Gill S.S et Tuteja N**.2010. Reactive oxygen species & antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant physiology & biochemistry*, 48(12) , 909- 930.

H

- ✂ **Hagar H, Ueda N, Shal S.V**.1996. Role of reactive oxygen metabolites in DNA damage and cell death in chemical hypoxic injury LLC-PK1 cells. – *Amer. J. Physiol.* 271, 209-215.
- ✂ **Haleng J, Pincemail J, Defraigne J O, Charlier C, ChaPelle JP** .2007. Le stress oxydant. *Rev Med Liege.* 62 : 10 : 628-638.
- ✂ **Halliwell B , Gutteridge J** .1989. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford, Clarendon Press: 188-275.
- ✂ **Halliwell B** .2006. "Reactive Species & Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. " *Plant Physiology* 141(2) : 312-322.
- ✂ **Hernandez J.A, Ferrer M.A, Jiménez A, Barcelo A.R, Sevilla F**.2001. Antioxidant systems and O₂/H₂O₂ production in the apoplast of pea leaves. It's relation with salt-induced necrotic lesions in minor veins. *Plant Physiol*, 127: 817-831.
- ✂ **Hodges DM, DeLong J.M , Forney C.F , Prange R.K**.1999. "Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds." *Planta* 207(4): 604-611.

J

- ✂ **Jena N.R** .2012. DNA damage by reactive species :Mécanisme, mutation & repair. *JBiosci* 37 : 503-517.

K

- ✂ **Kabata-Pendias A et Pendias H** .1992. "Trace elements in soils and plants." CRC Press, Boca Raton, Florida, 2nd Edition, 209 p.
- ✂ **Kaltenbach H, Hernst D, Heller W, Sandermann H.J.R**.1998. Biochemical plant responses to Ozone. IV. Cross-induction of defensive pathways in parsley (*Petroselinum crispum* L) plants. *Plant Physiol.*, 104, 40-4.

L

- ✂ **Larralde J, Martinez J.A.**1991. Nutritionnal value of faba bean (*vicia faba L*). effet ef nutrient utilization,protein turnover & immunity. options méditerranéennes N°. 10 :111-117pp.
- ✂ **László G, Ágota L, William N.**2001. Blood Catalase Deficiency and Diabetes in Hungary. Diabetes Care 10: 1839–1840.
- ✂ **Laval-Martin D, Mazliak P.**1995. Physiologie végétale1 nutrition et métabolisme. Harmann Editeurs des sciences et des arts.
- ✂ **Le Guen J et Duc G.**1992. La féverole. In «Amélioration des espèces végétales cultivées», Gallais A. , Bannerot H. (Eds.) : 189-203.
- ✂ **Lichtenthaler HK** .1987. "Chlorophylls & carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. " Methods in Enzymology 148: 350-382.
- ✂ **Lim T. K** .2012. (*vicia faba*). Fruits. 2 :925-936.
- ✂ **Loudes J.P** .2002. Mise au point de biotests sur les plantes pour mettre en évidence un effet toxique ou agronomique de substances exogènes (Zinc, Plomb, Substances Humiques). ENSAT. Rapport DEA.
- ✂ **Lukaszek M et Poskuta J.**1998. "Development of photosynthetic apparatus & respiration in pea seedlings during greening as influenced by toxic concentration of lead. " Acta Physiologiae Plantarum 20(1) : 35-40.

M

- ✂ **Macheix et al.,**2006.Les polyphénols en agroalimentaire, Lavoisier 1-28.
- ✂ **Malešev D, Kuntić V, Karaali et al.,**2004. Investigation of metal-flavonoiddetermination offlavonoids via chelates and the metal-flavonoid complexing reactions. Journal of the serbian.
- ✂ **Marouf A et Reynaud J.** 2007. La botanique de A à Z 1662 définitions.Edition.Dunod
- ✂ **Mbida F.**2014. Evaluation de populations locales de fèves et féveroles vis-à-vis du stress hydrique. Mémoire. Université Sidi Mohamed Ben Abdellah. Ben Abdellah, Maroc.
- ✂ **Michell F et Bonnefont-Rousselot D, Mas E, Drai J, Thérond P.**2008. Biomarqueurs de la peroxydation lipidique : aspects analytiques. Annales de Biologie Clinique. 66 : N 6.
- ✂ **Mika A, Minibayeva F, Beckett R , Lüthje S** .2004. "Possible functions of extracellular peroxidases in stress-induced generation and detoxification of active oxygen species." Phytochemistry Reviews 3(1): 173-193.
- ✂ **Mittler R** .2002. "Oxidative stress, antioxidants & stress tolerance. " Trends in Plant Science 7(9) : 405-410.
- ✂ **Møller I.M, Jensen P. E ,Hansson A.** 2007. Oxidative modifications to cellular components in plants. Annu. Rev. Plant Biol. , 58, 459-481.

- ✂ **Munné Bosch S , Alegre L.**2000. The significance of beta-carotene, alpha- tocopherol and the xanthophylls cycle in droughted *Melissa officinalis* plants. *Aust J. Plant.*

N

- ✂ **Nijveldt R. J, Van Nood E, Van Hoorn D. E. C, Boelens P. G, Van Norren K, Van Leeuwen P. A. M.** 2001. Flavonoids : a review of probable mechanisms of action and potential applications. *American journal of clinical nutrition.*, 74 : 418-425.
- ✂ **Noctor G .**2006. "Metabolic 44atalyzed in defence & stress: the central roles of soluble redox couples. " *Plant, Cell & Environment* 29: 409-425.

P

- ✂ **Patrick J.W, Stoddard F. L .**2010. Phydology of flowering & grain filling in faba bean *Field Crops Research.* 115: 234-242.
- ✂ **Pincemail J , Lecomye J , Collart E , Castiaux J.P, Dfraise J.O.**2003. Stress oxidant, antioxidant etexercice physique. *Médecine Interne.* Vol. 8 :56-59.
- ✂ **Pincemail J, Degrune F, Voussure S, Malherbe C, Paquot N ,Defraigne J.O.**2007. Effet d'une alimentation riche en fruits et légumes sur les taux plasmatiques en antioxydants et des marqueurs des dommages oxydatifs. *Nutrition Clinique et Métabolisme* 21 : 66-75.
- ✂ **PiquemalG.** 2008. Les 44atalyzed44 (en lign:http://www.detoursante.com/index.php?Option=com_content&view=article&id=166&Itemid=215).
- ✂ **Pokorny J, Yanishlieva N , Gordon M.H.**2001. Antioxidants in food: practical applications. Cambridge: Woodhead Publishing Limited. New York, USA p. 108- 109.
- ✂ **Pourrut B, Perchet G, Silvestre J, Cecchi M, Guiresse M , Pinelli E.**2008. "Potential role of NADPH-oxidase in early steps of lead-induced oxidative burst in (*Vicia faba*) roots." *Journal of Plant Physiology* 165(6): 571-579.
- ✂ **Pourrut B.** 2008. Implication du stress oxydatif dans la toxicité du plomb sur une plante modèle, (*vicia faba*) (Doctoral dissertation).
- ✂ **Pourrut B.**2003. Etude des profils d'expression de peroxydases chez une plante sentinelle en fonction d'un stress métal lourd, ENSAT. Rapport de DEA: 34 pp.

R

- ✂ **Rengel Z, Batten G.D, Crowley D.E .**1999. Agronomic approaches for improving the micronutrient density in edible portions of field crops. *Field Crops Res* 60:27–40.

S

- ✂ **Savitsky P.A, Gazaryan I.G, Tishkov V.I, Lagrimini L.M, Ruzgas T, Gorton L.** 1999. Oxidation of indole-3-acetic acid by dioxygen 44atalyzed by plant peroxidases: specificity for the enzyme structure. *Biochemical Journal* 340: 579-583.

- ✂ **Schutzendubel A et Polle A** .2002. "Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization." *Journal of Experimental Botany* 53(372): 1351-1365.
- ✂ **Seregin I.V et Ivanov V.B** .2001. "Physiological Aspects of Cadmium & Lead Toxic Effects on Higher Plants." *Russian Journal of Plant Physiology* 48(4) : 523-544.
- ✂ **Sgherri C, Quartacci M.F ,Navari-Izzo F**.2007. "Early production of activated oxygen species in root apoplast of wheat following copper excess." *Journal of Plant Physiology* 164(9): 1152- 1160.
- ✂ **Shapiro A.D et Gerald L**.2005. *Nitric Oxide Signaling in Plants. Vitamins & Hormones*, Academic Press. Volume 72: 339-398.
- ✂ **Sharma P et Dubey R.S**.2005. "Lead toxicity in plants." *Brazilian Journal of Plant Physiology* 17: 35-52.
- ✂ **Shringarpure R et Davies K. J**.2002. Protein turnover by the proteasome in aging & disease 1, 2. *Free Radical Biology & Medicine*, 32(11) , 1084-1089.
- ✂ **Smulevich G, Jakopitsch C, Droghetti E, Obinger C**.2006. Probing the structure and bifunctionality of catalase-peroxidase (KatG). *Journal of Inorganic Biochemistry* 100: 568-585.
- ✂ **Stiborova M, Doubravova M ,Brezinova A, F. A**.1986. "Effect of heavy metal ions on growth & biochemical characteristics of photosynthesis of barley (*Hordeum vulgare* L.)." *Photosynthetica* 20(4) : 418-425.
- ✂ **Switala J, Loewen P.C**.2002. Diversity of properties among catalases. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 401: 145–154.

T

- ✂ **Takabe K, Takeuchi M, Sato T, Ito M, Fujita M** .2001. Immunocytochemical localization of enzymes involved in lignification of the cell wall. *Journal of Plant Research* 114: 509-515.
- ✂ **Tang S.Y et Halliwell B** .2010. Medicinal plants and antioxidants: What do we learn from cell culture and *Caenorhabditis elegans* studies, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 394, 1-5.
- ✂ **Tognolli M, Penel C, Greppin H, Simon P**.2002. Analysis and expression of the class III peroxidase large gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Gene* 288 : 129-138.
- ✂ **Tomomi M, Masamitsu S, Hideaki H**.2017. *Retinal Diseases Associated with Oxidative Stress & the Effects of a Free Radical Scavenger (Edaravone)* ,Molecular Pharmacology, Department of Biofunctional Evaluation, Gifu Pharmaceutical University, Gifu, Japan, 1-14.
- ✂ **Tripp R**.2011. *The Impacts of Food Legume Research in the CGIAR: A Scoping Study*. Pédrón J-Y(2006). *Références Productions légumières*. Lavoisier 2^{ème} édition, Paris, pp. 366-367.

V

- ✂ **Van Assche F et Clijsters H** .1990. "Effects of metals on enzyme activity in plants." *Plant cell and Environment* 13: 195-206.
- ✂ **Van Breusegem F,Vranova E,Dat J.F,Inze D**.2001. "The role of active oxygen species in plant signal transduction. " *Plant Science* 161(3) : 405-414.
- ✂ **Vangdal E et Slimestad R** .2006. Methods to determine antioxidative capacity in fruit. *Journal of fruit and Ornamental Plant Research* 14 (2): 123-131.
- ✂ **Vanin A.F, Svistunenko D.A, Mikoyan V.D, Serezhnikov V.A, Fryer M.J, Baker N.R, Cooper C.E**.2004. "Endogenous Superoxide Production & the Nitrite/Nitrate Ratio Control the Concentration of Bioavailable Free Nitric Oxide in Leaves. " *Journal of Biological Chemistry* 279(23) : 24100-24107.
- ✂ **Verma S et Dubey R.S**.2003. "Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants." *Plant Science* 164(4): 645-655.

W

- ✂ **Wang C, Wang W , Tian Y, Yu H, Gu X, Du W , Zhou H** .2007. "Oxidative stress, defence response and early biomarkers for lead-contaminated soil in (*Vicia faba*) seedlings." *Environmental Toxicology and Chemistry*: 1.
- ✂ **Welinder K.G**.1992. Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases. *Current Opinion in Structural Biology* 2: 388–393.
- ✂ **Wozny A, Schneider J , Gwozdz E.A**.1995. "The effects of lead & kinetin on greening barley leaves. " *Biologia Plantarum* 37(4) : 541-552.

X

- ✂ **Xiong Z, Zhao F , Li M**.2006. "Lead toxicity in *Brassica pekinensis* Rupr. : Effect on nitrate assimilation & growth. " *Environmental Toxicology* 21(2) : 147-153.

Y

- ✂ **Yamasaki H, Cohen M.F**.2006. "NO signal at the crossroads: polyamine-induced nitric oxide synthesis in plants?" *Trends in Plant Science* 11(11) : 522-524.

Z

- ✂ **Zhang J.X , Jiang M.B**.2001. Drought stress induced changes in activities Of superoxide dismutase, catalase,and peroxidase in wheat species. *Plant Cell Physiol*. 35.
- ✂ **Zhong C, Mei S, Jie X, Qiong L , Harold C**.2007. Structure–radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants *Life Sciences*, 78, 2872 – 2888.

Site d'Internet

<https://www.pinterest.fr/pin/41025046592125766/> (*vicia faba L*) (consulté le :6 Juillet 2021)